

Aus der Klinik für Gynäkologie mit Zentrum für onkologische Chirurgie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

ICAM-1 und VCAM-1 Expression in Tumorgewebe und Plasma
von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Saba Suhail Arain
aus Pattoki

Datum der Promotion: 18.09.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	7
Abstrakt Deutsch.....	8
Abstrakt Englisch.....	9
1 Einleitung.....	10
1.1 Ovarialkarzinom	10
1.1.1 Epidemiologie	10
1.1.2 Einteilung und Klassifizierung.....	10
1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren.....	12
1.1.4 Symptome und Früherkennung	13
1.1.5 Tumorstadium der FIGO- und TNM-Klassifikation	13
1.1.6 Grading.....	15
1.1.7 Therapiemanagement	16
1.1.8 Prognosefaktoren.....	17
1.2 Die Immunglobulin-Superfamilie.....	20
1.3 Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1).....	21
1.3.1 Vorkommen und Funktion	21
1.3.2 VCAM-1 und maligne Tumore	23
1.3.3 VCAM-1 und Ovarialkarzinome	24
1.4 Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1).....	25
1.4.1 Vorkommen und Funktion	25
1.4.2 ICAM-1 und maligne Tumore	27
1.4.3 ICAM-1 im Ovarialkarzinom.....	28
2 Fragestellung.....	29
3 Material und Methoden	31
3.1 Patientenkollektiv OVCAD (“Ovarian Cancer- Diagnosis of a Silent Killer”)	31
3.2 Probengewinnung und Konservierung.....	31
3.2.1 Gewebeproben.....	31
3.2.2 Plasmaproben.....	32
3.3 Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien.....	32
3.4 Kits für ELISA.....	32

3.5	Prinzip des Sandwich-Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA).....	34
3.6	ELISA-Protokoll.....	36
3.7	Statistik	37
3.8	Cutoff-Werte-Berechnung mit dem „Cutoff-Finder“	39
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Patientenkollektiv	40
4.2	Klinische und pathologische Patientencharakteristika	40
4.3	Plasma- und Gewebekonzentrationen von ICAM-1, VCAM-1 und der.....	42
	Ratio ICAM-1/VCAM-1	42
4.4	Korrelationen zwischen ICAM-1 und VCAM-1 Expression im Plasma und Gewebe	42
4.5	Korrelation der ICAM-1- und VCAM-1 Expression und der Ratio ICAM-1/VCAM-1 mit klassischen Prognosefaktoren	43
4.5.1	Alter	45
4.5.2	CA-125.....	46
4.5.3	FIGO-Stadium.....	47
4.5.4	Aszites	48
4.5.5	Metastasen	49
4.5.6	Histologischer Subtyp.....	49
4.6	Überlebensanalysen.....	49
4.7	Ergebnisse der Cutoff-Wertfindung durch den Cutoff-Finder	50
4.8	Kaplan-Meier-Kurven	51
4.8.1	Gesamtüberleben.....	51
4.8.2	Progressionsfreies Überleben	57
4.9	Cox multivariate schrittweise Regressionsanalyse	63
4.9.1	Gesamtüberleben.....	63
4.9.2	Progressionsfreies Überleben	65
4.10	Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse.....	67
5	Diskussion.....	68
5.1	ICAM-1 und VCAM-1 Expression und die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma und Ovarialkarzinomgewebe.....	71
5.1.1	ICAM-1 und VCAM-1 im Gewebe.....	72
5.1.2	ICAM-1 und VCAM-1 im Plasma	73
5.2	Korrelation zwischen der ICAM-1 und VCAM-1 Expression im Plasma und Gewebe	74
5.3	Korrelation mit klassischen etablierten Prognosefaktoren	76

5.3.1	Alter bei Diagnosestellung.....	76
5.3.2	CA-125.....	77
5.3.3	FIGO-Stadium.....	77
5.3.4	Metastasen	78
5.3.5	Aszites	79
5.4	Gesamtüberleben.....	80
5.5	Progressionsfreies Überleben	81
5.6	Die Rolle von ICAM-1 und VCAM-1 im Ovarialkarzinom	83
5.7	Allgemeine Diskussion	88
6	Zusammenfassung.....	90
7	Literaturverzeichnis	94
8	Eidesstattliche Versicherung	100
9	Lebenslauf.....	101
10	Publikationsliste.....	103
11	Danksagung.....	104

Abkürzungsverzeichnis

BCA *Bicinchoninic acid*
BRCA1/2 *Breast cancer 1/2-Gen*

CA *Capture Antibody*
CCC *Klarzelliges Karzinom*
CD 106 *Cluster of differentiation 106*
CD54 *Cluster of differentiation 54*

DA *Detection Antibody*
EOC *Epitheliales Ovarialkarzinom*
EDTA *Ethylendiamintetraessigsäure*
ELISA *Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay*
ENOC *Endometrioides Karzinom*
ERM *Ezrin/Radixin/Moesin*

FIGO *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*

HGSOC *High grade seröses Karzinom*
HNPPC-Syndrom *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*
HRP *Streptavidin Horseradish-Peroxidase*

ICAM-1 *Interzelluläre Adhäsionsmolekül 1*
IL-1 *Interleukin-1*

kDa *Kilodalton*

LFA-1 *Lymphocyte function-associated antigen 1*

LGSC *Low grade seröses Karzinom*
LMP *Low malignant potential*
LNE *Lymphonodektomie*
LPAM-1 *$\alpha4\beta7$ -Integrine*

MC *Muzinöses Karzinom*
MLH1 *SiMutL homolog 1ehe*
MSH2 *MutS protein homolog 2*
MUC-1 *Mucin-1*

OP *Operation*
OS *Gesamtüberleben*

PCOS *Polyzystisches Ovarsyndrom*
PFS *Progressionsfreies Überleben*

Rac1 *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
RNA *Ribonucleinsäure*

SNP *Einzelnukleotid-Polymorphismen*
STIC *Serous tubal intraepithelial carcinoma*

TBS *Tris buffered saline*
TNBC *Triple negative breast cancer*
TNF-alpha *Tumornekrosefaktor-alpha*
TOC *Tumorbank Ovarial Carcinoma*

VCAM-1 *Vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1*
VLA-4 *Sivery-late antigen*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Struktur der membranständigen Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (links) und ICAM-1 (rechts) modifiziert aus (26).....	23
Abbildung 2: Eine schematische Darstellung der molekularen Struktur von ICAM-1 modifiziert aus (45).....	26
Abbildung 3: Schematische Darstellung der endothelialen Signaltransduktion von ICAM-1 und VCAM-1. Modifiziert aus (46).....	26
Abbildung 4: Schematische Darstellung des ELISA Prinzips der Firma R&D Systems. Modifiziert aus R&D Systems (26).....	35
Abbildung 5: Legende für Abbildung 4 aus R&D Systems (26).....	35
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Erstellung der Verdünnungsreihe für die Erstellung einer Standardkurve aus R&D Systems (26).....	37
Abbildung 7: Exemplarisches Beispiel für eine Standardkurve am Beispiel von ICAM-1 aus R&D Systems (26).....	37
Abbildung 8: Workflow zur Cutoff-Wertberechnung durch den "Cutoff-Werte-Finder". Modifiziert aus (64).....	39
Abbildung 9: Bloxplots für die ICAM-1 Expression im Gewebe unterteilt nach Altersklassen.....	45
Abbildung 10: Boxplots für die Gruppen mit CA-125 < 35 U/L und > 35 U/L.....	46
Abbildung 11: Boxplots für die Gruppen FIGO-Stadium II, III und IV.....	47
Abbildung 12: Boxplots für die Gruppen mit Aszites < 500ml und > 500ml.....	48
Abbildung 13: Boxplots für die Gruppen mit Metastasen (M1) und ohne Metastasen (M0).....	49
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der VCAM-1-Expression im Plasma.....	52
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1-Expression im Plasma.	53
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der VCAM-1-Expression im Gewebe.	54
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1-Expression im Gewebe.	55
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio im Plasma.	56
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio im Gewebe.	57
Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der VCAM-1-Expression im Plasma.	58
Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1-Expression im Plasma.	59
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1-Expression im Gewebe.	60
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der VCAM-1-Expression im Gewebe.	61

Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio im Plasma. 62

Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio im Gewebe. 63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fünf histologische Hauptsubtypen der Ovarialkarzinome epithelialen Ursprungs und deren Häufigkeitsverteilung	10
Tabelle 2: Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom.....	12
Tabelle 3: TNM- und FIGO-Klassifikation der Tumore des Ovars Teil 1 (11)	14
Tabelle 4: TNM- und FIGO-Klassifikation der Tumore des Ovars Teil 2 (11)	15
Tabelle 5: Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien der Firma R&D Systems (26)	32
Tabelle 6: Kits für ELISA	32
Tabelle 7: Inhalt für das Kit "Duo Set für humanes ICAM-1/CD 54"	33
Tabelle 8: Inhalt für das Kit "Duo Set für humanes VCAM-1/CD 106"	33
Tabelle 9: Klinische und pathologische Patientencharakteristika	40
Tabelle 10: Plasma- und Gewebekonzentrationen von ICAM-1, VCAM-1 und der Ratio ICAM-1/VCAM-1 in ng/ml	42
Tabelle 11: Spearman's Korrelation von Plasma- und Gewebekonzentrationen von ICAM-1, VCAM-1 und der Ratio ICAM-1/VCAM-1.	43
Tabelle 12: Korrelation von ICAM-1, VCAM-1 und der Ratio ICAM-1/VCAM-1 mit den klassischen Prognosefaktoren	44
Tabelle 13: Ergebnisse der Cutoff-Werteberechnung mittels Cutoffwert-Finder für ICAM-1, VCAM-1 und die Ratio ICAM-1/VCAM-1 für das OS und PFS	50
Tabelle 14: Ergebnis der Cox schrittweisen multivariaten Regressionsanalyse für VCAM-1 im Gewebe und Plasma für das OS	64
Tabelle 15: Ergebnis der Cox schrittweisen multivariaten Regressionsanalyse für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Gewebe und Plasma für das OS	65
Tabelle 16: Ergebnis der Cox schrittweisen multivariaten Regressionsanalyse für VCAM-1 im Gewebe für das PFS	66
Tabelle 17: Ergebnis der Cox schrittweisen multivariaten Regressionsanalyse für ICAM-1 im Gewebe für das PFS	67

Abstrakt Deutsch

Hintergrund: Das Ovarialkarzinom ist das gynäkologische Malignom mit der schlechtesten Prognose mit einer 5-Jahresmortalität von 30-40 %. Es fehlen Tumormarker für die Früherkennung, Zielmoleküle im Sinne einer „targeted therapy“ und Marker zur Prognose- und Therapieabschätzung für eine individualisierte Therapie. Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sind Zellmembranproteine, die bei der Kommunikation zwischen Zellen und Matrixgewebe und bei der Zellmigration jenseits des Epithels, welches die Grundlage für eine Metastasierung darstellt, eine entscheidende Rolle spielen. Aufgrund dieser Funktionen sind sie daher ein erfolgversprechendes Zielmolekül. Für zahlreiche andere Malignome konnte eine abnorme ICAM-1 und VCAM-1 Expression gezeigt werden. Ziel dieser Untersuchung war die Evaluation der Bedeutung von ICAM-1 und VCAM-1 für das epitheliale Ovarialkarzinom (EOC). **Material, Methoden und Ergebnisse:** 231 Gewebe- und Plasmaproben von Patientinnen aus dem OVCAD-Register mit fortgeschrittenem EOC wurden auf die Proteinexpression von ICAM-1 und VCAM-1 mittels ELISA untersucht. Es erfolgte eine Korrelation im Plasma und Gewebe und mit etablierten Prognosefaktoren für das EOC. Abschließend wurde die prognostische Bedeutung der Proteinexpression für das Gesamtüberleben (OS) und das progressionsfreie Überleben (PFS) evaluiert. In jeder untersuchten Probe konnten ICAM-1 und VCAM-1 nachgewiesen werden. Die mediane Konzentration im Gewebe lag für ICAM-1 bei 766 ng/ml (Range: 16,7-2061 ng/ml) und für VCAM-1 bei 279 ng/ml (Range: 1,59-1141 ng/ml). Im Plasma lagen die Werte für ICAM-1 bei 353 ng/ml (Range: 135-966 ng/ml) und für VCAM-1 bei 1451 ng/ml (Range: 539-3894 ng/ml). Die VCAM-1 Expression korrelierte mit der von ICAM-1 im Plasma ($p = 0,275$, $p < 0,0001$) und im Gewebe ($p = 0,62$, $p < 0,001$). Bei der Korrelation mit den klassischen Prognosefaktoren zeigte sich für ICAM-1 im Gewebe eine negative Assoziation mit dem Alter ($p = 0,036$) und eine positive mit CA-125 ($p = 0,026$), FIGO-Stadium ($p = 0,032$), Vorhandensein von Aszites ($p = 0,018$) und Metastasen ($p = 0,036$). Nach Adjustierung für die klassischen Prognosefaktoren in der multivariaten Analyse konnten ICAM-1 im Gewebe ($p = 0,042$) und VCAM-1 im Gewebe ($p = 0,001$) als unabhängige Prognosefaktoren für das PFS identifiziert werden. Eine prognostische Bedeutung für das OS konnte nicht gezeigt werden. **Schlussfolgerung:** Die Proteinexpression im Plasma korrelierte nicht mit der im Gewebe und hatte keine prognostische Bedeutung für das OS oder PFS. Die ICAM-1 und VCAM-1-Expression im Gewebe konnte als unabhängiger Prognosefaktor für das PFS identifiziert werden und kann spezifisch für das Ovarialkarzinom sein. ICAM-1 im Gewebe korrelierte mit fünf etablierten Prognosefaktoren. Die hier erhobenen Ergebnisse müssen nun in einer prospektiven Studie mit einer größeren Patientenzahl bestätigt und weiter differenziert untersucht werden.

Abstrakt Englisch

Background: Ovarian cancer is the gynecological malignancy with the worst prognosis with a 5-year mortality of 30-40 %. There are no tumor markers for early detection, target molecules in the sense of “targeted therapy” and markers for prognosis and therapy assessment to ensure an individualized therapy. The adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 are cell membrane proteins that play a crucial role in the communication between cells and matrix tissue and in cell migration beyond the epithelium, which is the basis for metastasization. Because of these functions, they are therefore a promising target molecule. Abnormal ICAM-1 and VCAM-1 expression have been shown for numerous other malignancies. The aim of this study was to evaluate the role of ICAM-1 and VCAM-1 for epithelial ovarian cancer (EOC). **Material, methods and results:** 231 tissue and plasma samples from patients from the OVCAD study with advanced EOC were examined in regards of the protein expression of ICAM-1 and VCAM-1 by ELISA. We did a correlation in plasma and tissue and with established prognostic factors for the EOC. Finally, the prognostic importance of protein expression for overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) was evaluated. ICAM-1 and VCAM-1 were detected in each sample examined. The median tissue concentration was 766 ng/ml (range: 16,7-2061 ng/ml) for ICAM-1 and 279 ng/ml (range: 1,59-1141 ng/ml) for VCAM-1. The plasma values for ICAM-1 were 353 ng/ml (range: 135-966 ng/ml) and for VCAM-1 1451 ng/ml (range: 539-3894 ng/ml). VCAM-1 expression correlated with that of ICAM-1 in plasma ($p = 0,275$, $p < 0,0001$) and in tissue ($p = 0,62$, $p < 0,001$). When correlated with the classic prognostic factors, ICAM-1 showed a negative association with age ($p = 0,036$) and a positive association with CA-125 ($p = 0,026$), FIGO stage ($p = 0,032$), presence of ascites ($p = 0,018$) and metastases ($p = 0,036$). After adjustment for the classic prognostic factors the multivariate analysis showed a significant correlation for ICAM-1 in tissue ($p = 0,042$) and VCAM-1 in tissue ($p = 0,001$) for the PFS. A prognostic meaning for the OS could not be shown. **Conclusion:** There was no correlation between protein expression between plasma and tissue. Protein expression in plasma had no prognostic meaning for OS or PFS. Tissue ICAM-1 and VCAM-1 expression has been identified as an independent prognostic factor for PFS and may be specific for ovarian cancer. Tissue ICAM-1 correlated with five established prognostic factors. The results obtained here must now be confirmed in a prospective study with a larger number of patients and examined further.

1 Einleitung

1.1 Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist das zweithäufigste Malignom des weiblichen Genitaltraktes und der siebenthäufigste Tumor bei Frauen weltweit. Im Bereich der genitalen Krebserkrankungen hat es die höchste Mortalitätsrate. Die Inzidenz liegt bei jährlich ca. 239.000 neu diagnostizierten Fällen und 152.000 Todesfällen bedingt durch das Ovarialkarzinom weltweit (1). Allein in Deutschland wird jährlich bei ca. 7.500 Patientinnen ein Ovarialkarzinom diagnostiziert. Die Wahrscheinlichkeit, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken steigt mit dem Alter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 68 Jahren (2). Das EOC stellt die häufigste Form (90 %) dar und wird in fünf histologische Hauptsubtypen, welche sich in der Entstehung, Pathogenese, Molekularbiologie, Risikofaktoren und Prognose unterscheiden, unterteilt. Das Lebenszeitrisiko einer Frau an einem Ovarialkarzinom zu erkranken liegt bei 1 zu 75, das Risiko daran zu versterben bei 1 zu 100. Die Erkrankung wird bei ca. 75 % der Patientinnen erst in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO III und IV) diagnostiziert, sodass die 5-Jahres-Überlebensraten bei lediglich 29 % liegen. In wenigen Fällen (15 %) erfolgt die Diagnose im FIGO Stadium I mit einem lokal begrenzten Tumor. Hier ist die Prognose deutlich besser mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 92 %. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate für alle Subtypen ist niedrig und liegt bei 30-40 % weltweit. Diese hat sich mit einer lediglich minimalen Zunahme von 2-4 % trotz verbesserter OP-Techniken und Chemotherapien seit 1995 leider nur unwesentlich verbessert (1).

1.1.2 Einteilung und Klassifizierung

Das Ovarialkarzinom wird abhängig vom Ursprungsgewebe in drei Gruppen eingeteilt. In Industrieländern sind über 90 % der primären Ovarialtumore epithelialen Ursprungs, 5-6 % sind Keimzelltumore und 2-3 % entfallen auf Keimstrang-Stroma-Tumore (3).

Fünf histologische Hauptsubtypen der Tumore epithelialen Ursprungs:

Tabelle 1: Fünf histologische Hauptsubtypen der Ovarialkarzinome epithelialen Ursprungs und deren Häufigkeitsverteilung

Histologischer Subtyp	Häufigkeit
1. High grade seröses Karzinom (HGSOC)	70 %
2. Endometrioides Karzinom (ENOC)	10 %

3. Klarzelliges Karzinom (CCC)	10 %
4. Muzinöses Karzinom (MC)	3-5 %
5. Low grade seröses Karzinom (LGSOC)	< 5 %
6. Borderline-Tumore oder Low malignant potential (LMP)	< 1 %

Diese histologischen Subtypen unterscheiden sich nicht nur morphologisch, sondern auch auf molekularer Ebene, durch ihre Ätiologie, ihr Therapieansprechen und ihre Prognose. Das HGSOE beeinflusst die epidemiologischen Daten aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens am stärksten. Im Rahmen des Cancer Genome Atlas Projektes erfolgte eine genetische Analyse des HGSOE. Hier konnte in fast allen untersuchten Proben eine p53-Mutationen nachgewiesen werden. Daneben zeigten sich in ca. 25 % der Proben eine Mutation im Breast Cancer 1/2-Gen (BRCA1/2). Eine weitere Auffälligkeit war die vergleichsweise hohe chromosomale Instabilität des HGSOE. Diese ist mutmaßlich auch eine wichtige Ursache für die Sensitivität gegenüber einer zytotoxischen Chemotherapie (4). Die übrigen histologischen Subtypen weisen andere spezifische molekulare Besonderheiten auf. So finden sich im LGSOC häufig B-RAF und K-RAS-Mutationen, ENOC und CCC entstehen häufig in Endometriosen und MC enthalten häufig K-RAS-Mutationen. Innerhalb der histologischen Kategorien 1-5, jedoch am häufigsten bei serösen und muzinösen Tumoren, gibt es Tumore mit unbekanntem malignem Potenzial. Diese werden Borderline-Tumore genannt. Hierbei handelt es sich um Vorläuferläsionen, die maligne Atypien aufweisen, aber nicht destruktiv invasiv wachsen (1).

Aufgrund der neuen Erkenntnisse über die molekularen und histopathologischen Grundlagen des EOC konnte ein neues Modell für die Karzinomentwicklung mit einer neuen Einteilung in Typ 1 und Typ 2 Ovarialkarzinome für die am häufigsten vorkommenden Arten etabliert werden. Können histologisch klar Vorläuferläsionen im Ovar beschrieben werden, handelt es sich um einen Typ 1. Beim Typ 2 können diese Vorläuferläsionen nicht eindeutig beschrieben werden und die Tumore entwickeln sich möglicherweise de novo aus dem Tuben- oder Ovariepithel. Zu den Typ 1 Tumoren gehören die meist gut differenzierten low grade serösen Tumore, die muzinösen, endometrioiden, klarzelligen und Übergangszellkarzinome (TCC). Zu den Typ 2 Tumoren gehören die high grade serösen Tumore, die undifferenzierten und die Karzinosarkome (5).

1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Über 90 % der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf. Bei lediglich 10 % der Patientinnen lässt sich eine genetische Prädisposition mit Mutationen in der Keimbahn als mögliche Genese nachweisen. Hierzu gehören Mutationen in den Genen BRCA1 (BReast CAncer 1) oder BRCA2 (BReast CAncer 2), seltener in MLH1 (MutL homolog 1) oder MSH2 (MutS protein homolog 2) und im Protein p53. Inwiefern die BRCA-Mutation Einfluss auf das Überleben hat, wird widersprüchlich diskutiert. Gut belegt ist jedoch, dass das kumulative Risiko für BRCA1- und BRCA2-Mutationsträgerinnen mit steigendem Alter zunimmt. So liegt das kumulative Risiko für BRCA1 im 50. Lebensjahr am Ovarialkarzinom zu erkranken bei 14 % und im Alter von 70 Jahren bei 43 %. Insgesamt ist das Risiko für BRCA2-Mutationsträgerinnen um ein Vielfaches niedriger als für BRCA1. Obwohl nur bei einem Bruchteil der Patientinnen eine genetische Prädisposition nachzuweisen ist, stellt das Auftreten eines Ovarial- oder Mammakarzinoms bei Verwandten ersten Grades den wichtigsten Risikofaktor dar (6). Als weitere Risikofaktoren für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms gilt eine hohe Ovulationshäufigkeit, durch z. B. eine früh einsetzende Menarche und ein spätes Eintreten der Menopause, sowie Nulliparität. Der Einfluss der Ovulation auf die Inzidenz des EOC wird erklärt durch eine Überexpression der Ovariepithelzellen mit Östrogenen aus der Follikelflüssigkeit und das Mikrotrauma am Ovar durch die Ovulation. Daneben wirkt sich eine postmenopausale Hormonersatztherapie negativ aus. Protektive Faktoren sind Geburten, Stillen und Gebrauch oraler Kontrazeptiva. Die Assoziation der oben genannten Faktoren ist unterschiedlich, abhängig vom vorliegenden histologischen Subtyp. Dies gilt insbesondere für das muzinöse Ovarialkarzinom, was auf die unterschiedliche Ätiologie zurückzuführen sein könnte. Das endometrioides und klarzellige Ovarialkarzinom teilen beide ein ähnliches Muster von Risikofaktoren mit erhöhtem Risiko bei Frauen mit Endometriose und erniedrigtem Risiko nach Tubenligatur. Der Stellenwert anderer oft diskutierter Risikofaktoren wie einer Hysterektomie, Beckenentzündung, Polyzystischen Ovarsyndrom (PCOS) sind nicht eindeutig geklärt. Weitere mögliche diskutierte Risikofaktoren beinhalten Umwelt- und Lebensstilfaktoren sowie eine Asbestose, Talkumpuder und Nikotinabusus (1).

Viele dieser Risikofaktoren können nicht modifiziert werden, wie z. B. genetische Faktoren und das Alter. Das individuelle Risiko stellt letztlich die Summe der Exposition aller Risikofaktoren dar. Hierzu hat die EPIC-Studie ein Modell erstellt, mit dem das individuelle Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken anhand oben genannter Risikofaktoren berechnet werden kann (7).

Tabelle 2: Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom

Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom
Positive Familienanamnese mit Häufung von Ovarial- und Brustkarzinomen

BRCA1- und BRCA2-Mutationen
Lebensalter
Nulliparität
Ovulation
Abstammung aus westlichen Industrieländern

1.1.4 Symptome und Früherkennung

Frühsymptome fehlen häufig oder sind unspezifisch. Dies erklärt auch, warum die Diagnosestellung meist erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium erfolgt. Eine Heilung ist dann nicht möglich. Maßnahmen zur systematischen Früherkennung, zum Beispiel durch Screeningprogramme mittels Sonografie oder Seruntumormarker, waren bisher nicht erfolgreich (8).

Symptomatisch werden die Patientinnen häufig erst durch ein Fortschreiten der Erkrankung, wie z. B. mit einer Zunahme des Bauchumfanges aufgrund von malignem Aszites bei Peritonealkarzinose. Eine Studie der Mayo Clinic identifizierte Abdominalkrämpfe als das häufigste Symptom bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Die Beschwerden sind unterschiedlich abhängig vom Stadium. Patientinnen im Stadium I und II klagten am häufigsten über Harnblasenbeschwerden und über unspezifische Abdominalbeschwerden. Im Stadium III und IV hingegen traten am häufigsten Abdominalschmerzen und eine Bauchumfangszunahme auf. Die Tumoren wurden lediglich in 15 % während Routineuntersuchungen oder als Zufallsbefund im Rahmen einer Untersuchung wegen anderer Beschwerden entdeckt (9). Des Weiteren klagten Patientinnen über Blutungsanomalien bzw. postmenopausale Blutungen, die sich entweder durch die Hormonaktivität des Tumors oder durch eine Infiltration des Uterus erklären lassen. Zusammenfassend zeigten sich in systematischen Untersuchungen, dass lediglich 11 % im Stadium I bzw. II und im Stadium III bzw. IV lediglich 3 % der Patientinnen vor Diagnosestellung keinerlei Beschwerden hatten (10). Weitere Symptome durch eine stattgehabte Metastasierung können ein Subileus, Dyspnoe bei Vorliegen eines malignen Pleuraergusses, vaginale Blutungen oder Hämaturie durch lokale Infiltration des Tumors sein (9).

1.1.5 Tumorstadium der FIGO- und TNM-Klassifikation

Die prognostische Bedeutung des Tumorstadiums für die Überlebensrate beim Ovarialkarzinom ist in verschiedenen Studien untersucht und belegt worden (11). Die Stadieneinteilung ist zum einen für die Therapieplanung von Bedeutung, zum anderen lässt sich auf diese Weise die Prognose abschätzen. So ist beispielsweise die statistische Überlebenswahrscheinlichkeit nach fünf Jahren vom Tumorstadium abhängig. Die Tabellen 3 und 4 fassen die aktuelle TNM- und FIGO-Klassifikation

für Tumore des Ovars seit Januar 2014 zusammen. In dieser Arbeit findet die vorherige Klassifikation Verwendung, welche zum Zeitpunkt der Datenerfassung und -auswertung dem aktuellen Stand entsprach.

Tabelle 3: TNM- und FIGO-Klassifikation der Tumore des Ovars Teil 1 (11)

TNM	FIGO	Definition
TX		Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
T0		Kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor auf die Ovarien oder Tuben beschränkt
T1a	IA	auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1b	IB	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1c	IC	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte:
T1c1	IC1	iatrogene Kapsel- (Serosa-)ruptur
T1c2	IC2	präoperative Kapsel- (Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
T1c3	IC3	maligne Zellen im Ascites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien

Tabelle 4: TNM- und FIGO-Klassifikation der Tumore des Ovars Teil 2 (11)

TNM	FIGO	Definition
T2b	IIIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3	A	retroperitoneale Lymphknotenmetastasen und/oder mikroskopische Metastasen außerhalb des kleinen Beckens
N1	IIIA1	ausschließlich retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Metastasen ≤ 10 mm
N1b	IIIAii	Metastasen > 10 mm
T3a	IIIA2	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b	IIIB	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c	IIIC	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
M1a	IVA	Pleuraerguß mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens

1.1.6 Grading

Folgendes Grading, d. h. die Beurteilung des histopathologischen Differenzierungsgrads vom Tumorgewebe, wird beim Ovarialkarzinom durchgeführt:

- G1 – gut differenziertes Gewebe
- G2 – mäßig differenziertes Gewebe
- G3 – schlecht bis undifferenziertes Gewebe

1.1.7 Therapiemanagement

Die Standardtherapie des Ovarialkarzinoms besteht aus zwei Säulen, der Operation mit radikaler Tumormassenreduktion und der adjuvanten Chemotherapie. Alle Patientinnen müssen sich initial einer Operation zum Staging unterziehen. Das Staging bildet dann die Grundlage für die weitere operative und medikamentöse zytotoxische Therapie. Das Staging findet über eine Längsschnittlaparotomie statt, um alle Bereiche des Abdomens optimal explorieren zu können. Zur Hauptoperation gehört die Hysterektomie mit Adnexektomie, infragastrische oder infrakolische Omentektomie, die Appendektomie bei muzinösem oder unklarem Tumortyp, sowie eine systematische pelvine und paraaortale Lymphonodektomie. Patientinnen mit EOC in einem frühen Stadium und komplettem operativen Staging haben ein besseres progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) im Vergleich zu Patientinnen mit inkomplettem Staging: 5-Jahres-PFS 79 % vs. 61 %, 5-Jahres-OS 89 % vs. 71 % (11).

Die Prognose wird wesentlich durch das Ausmaß der operativen Tumorentfernung bei der Primäroperation bestimmt. Anders als bei anderen Malignomen ist eine Besonderheit des Ovarialkarzinoms, dass die vollständige Entfernung aller makroskopisch sichtbaren Tumormanifestationen mit einem längeren Überleben verbunden ist. Grenzen der Radikal-OP sind, z. B. bei ausgedehntem Befall der Dünndarmwand oder ausgeprägtem Befall des Mesenteriums mit Infiltration der Mesenterialwurzel, gegeben. In diesem Fall kann eine Tumorfreiheit nicht erreicht werden und alle operativen Maßnahmen dienen lediglich der Tumorreduktion. Eine makroskopische Komplettresektion verlängert das mediane Gesamtüberleben von Patientinnen mit Stadium FIGO IIB-IIIB um ca. 60 Monate, im Stadium FIGO IIIC um ca. 47 Monate und selbst im Stadium FIGO IV konnten 30 Monate gewonnen werden (11,12). Für die systematische Lymphonodektomie (LNE) scheint der größte Benefit bei Patientinnen in einem fortgeschrittenen Stadium, die eine intraabdominal komplette Tumorresektion erhalten haben zu liegen. Bei Patientinnen, bei denen eine komplette Tumorresektion nicht möglich war und ein makroskopisch sichtbarer Tumorrest von $1 > \text{cm}$ bleibt, ist der erwartete Benefit niedriger einzustufen. Bei Patientinnen mit größerem extranodulären Tumorrest in eine systematische LNE nicht sinnvoll. Auf Basis mehrerer randomisierter Phase-III Studien lässt sich mittlerweile eine klare Empfehlung für die primäre Debulking-Operation und gegen eine neoadjuvante Chemotherapie gefolgt von einer Intervall-OP und einer postoperativen Chemotherapie aussprechen. Bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Stadium IA Grad 1 nach komplettem operativen Staging soll keine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. In den Studien ICON1 und ACTION konnte keine Mortalitätsreduktion für platinhaltige Chemotherapien gezeigt werden. Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Stadium IC oder

IA/B und Grad 3 sollen eine platinhaltige Chemotherapie über 6 Zyklen erhalten. Bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Stadium IA G2 oder IB G1/2 kann eine platinhaltige Chemotherapie angeboten werden. Die Erstlinientherapie für Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (IIb-IV) soll aus Carboplatin AUC 5 und Paclitaxel für insgesamt 6 Zyklen alle 3 Wochen im Anschluss an die Operation bestehen. Beim weiter fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (IIIB-IV) kann eine zusätzliche Behandlung mit Bevacizumab erwogen werden (11).

75 % der Patientinnen sprechen auf eine adjuvante Chemotherapie an, das heißt, sie bleiben mehr als sechs Monate nach Abschluss der Chemotherapie rezidivfrei und gelten damit als „platinsensible“. Dennoch erleidet der größte Teil von ihnen im späteren Verlauf ein Rezidiv. In den FIGO-Stadien III und IV sind es 65 %. In der Rezidivsituation besteht wieder die Option einer radikalen Tumoresektion gefolgt von einer Chemotherapie. Hier rückt jedoch neben der Prognose vor allem die Lebensqualität in den Vordergrund (11).

1.1.8 Prognosefaktoren

Die Prognose des Ovarialkarzinomes ist insgesamt schlecht. Dies ist zum einen auf eine sehr späte Diagnosestellung in einem bereits fortgeschrittenen Krankheitsstadium zurückzuführen, in dem die Heilungschancen sehr gering sind. 75 % der Patientinnen werden erst in den Stadien FIGO III und IV diagnostiziert. Zum anderen gibt es keine spezifischen Symptome, keine etablierten Vorsorgeprogramme sowie keine spezifischen diagnostischen Tests für die Früherkennung. Dennoch ist die 5-Jahresüberlebensrate im frühen Stadium FIGO I gut mit 80-90 %, verglichen mit der schlechten Prognose im fortgeschrittensten Stadium IV mit nur noch 11 % (11,13).

Zu den Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom gibt es in der Literatur kontroverse Angaben. Bislang sind vorwiegend klinische Faktoren wie das FIGO-Stadium, Alter bei Diagnosestellung, das platinfreie Intervall, CA-125 (Cancer Antigen 125) und der postoperative Tumorstest nach Primäroperation etablierte unabhängige Prognosefaktoren für das Überleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom (11). Unter den tumorbiologischen Parametern haben bislang allein der histologische Subtyp und das Grading prognostische Relevanz. Das Vorhandensein von Aszites und auch ein positiver Lymphknotenstatus gelten als Prognosefaktor, werden in der Literatur jedoch teils unterschiedlich bewertet (1,11).

1.1.8.1 Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie

Das Ansprechverhalten auf die platinhaltige Chemotherapie (Response to Platinum) stellt einen weiteren Prognosefaktor dar. Man unterscheidet zwischen Patientinnen, die innerhalb von sechs

Monaten nach Ende der Chemotherapie ein Rezidiv entwickeln („platinresistent“) und Patientinnen, die erst nach den ersten sechs Monaten nach Ende der Chemotherapie erneut erkranken („platinsensibel“). Diese Unterscheidung ist für die weitere Therapieplanung und Prognose entscheidend. Dieses ist auch abhängig vom postoperativ verbliebenen Tumorrest. U. a. konnten Champer et al. zeigen, dass bei einem PFI von < 6 Monaten verglichen mit Patientinnen mit einem PFI > 12 Monate das OS signifikant schlechter war (14).

1.1.8.2 Tumorstadium

Die Tumorausbreitung bei der Erstdiagnose hat sich als entscheidend für die Prognose der Patientinnen erwiesen. Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Stadium FIGO I haben eine 5-Jahresüberlebensrate von 80-90 %. Im Stadium FIGO III liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei 25-40 %, im Stadium FIGO IV nur noch bei 11 % (11).

1.1.8.3 Postoperativer Tumorrest

Neben der präoperativen Tumorlast ausgedrückt im Tumorstadium, haben mehrere Studien die prognostische Bedeutung des postoperativ verbliebenen Tumorrests zeigen können. Der postoperativ verbliebene Tumorrest hat sich als der stärkste, unabhängige prognostische Parameter erwiesen. Patientinnen, die tumorfrei operiert werden können, leben signifikant länger als Patientinnen, bei denen ein Tumorrest verbleibt. Die erreichten Überlebensraten und die verbleibende Überlebenszeit hängen entscheidend von der Radikalität der Operation ab (15). Bei fortgeschrittenen Erkrankungen mit einer Tumorausdehnung über das kleine Becken hinaus (Stadium III) ist der postoperative Tumorrest der entscheidende Prognosefaktor. Dabei haben Patientinnen ohne makroskopischen Tumorrest die beste Prognose, gefolgt von Patientinnen mit Tumorresten < 1 cm. Maximale Tumorreduktion ist zudem eine wichtige Voraussetzung für eine optimale Wirkung der anschließenden Chemotherapie. Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Reduktion des postoperativ verbliebenen Tumorrestes der Anteil der durch die Chemotherapie erreichten histologischen Komplett-Remissionen zunimmt. Deshalb ist es wichtig, große minder vaskularisierte Tumorareale weitestgehend zu entfernen, um die Wirksamkeit der Chemotherapie zu erhöhen (1,3,10).

1.1.7.3 Alter und Allgemeinzustand der Patientin

Das Alter und der Allgemeinzustand sind weitere bedeutende Prognosefaktor, die sich in epidemiologischen Erhebungen und Beobachtungsstudien nachweisen lassen. Sowohl höheres Lebensalter als auch ein reduzierter Allgemeinzustand, im Sinne eines reduzierten präoperativen

Karnofsky-Indexes < 70 %, korrelieren mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit. Die genauen Gründe hierfür sind bislang nicht geklärt, allerdings spielen vermutlich weniger tumorbiologische als vielmehr physiologische und therapeutische Begleitfaktoren sowie Komorbiditäten eine wichtige Rolle. Auch kann es sein, dass weniger das Alter an sich, sondern eine konservativere Therapiestrategie in den höheren Altersklassen zu einem reduzierten OS beitragen. Aktuelle Leitlinien empfehlen, nicht allein anhand des numerischen Alters Einschränkungen der Therapie vorzunehmen. Jedoch ist es sinnvoll, in Einzelfällen abhängig vom Alter und Allgemeinzustand kritisch abzuwägen (1, 11).

1.1.7.4 Histologischer Subtyp und Tumorgrading

Der histologische Subtyp und das Grading sind von gesicherter prognostischer Relevanz. Klarzellige und muzinöse Tumoren weisen eine signifikant ungünstigere Prognose auf als die serös-papillären und endometrioiden Karzinome und sprechen schlechter auf eine konventionelle platinhaltige Kombinationschemotherapie an. Somit ist eine klarzellige oder muzinöse Histologie ein negativer Prädiktionsfaktor für ein Ansprechen auf eine platinbasierte Chemotherapie, was allerdings aufgrund mangelnder etablierter Alternativen bislang keine klinischen Auswirkungen hat. Für das histopathologische Grading gilt: Mit steigender Entdifferenzierung zeigt sich eine ungünstigere Prognose. In der klinischen Praxis hat das Grading lediglich eine Wertigkeit beim gut differenzierten (G1) frühen lokal begrenzten Ovarialkarzinom im Stadium FIGO IA: Hier wird auf eine adjuvante Chemotherapie nach erfolgter Operation verzichtet (11).

1.1.8.4 CA-125

Ein normaler CA-125-Spiegel liegt bei < 35 U/ml. Ein Grenzbereich besteht für Werte zwischen 35-60 U/ml und von einer Erhöhung spricht man bei Werten > 60 U/ml. Es gibt eine Vielzahl von benignen und malignen Erkrankungen, welche mit einem erhöhten CA-125-Spiegel einhergehen können.

Ein Screening mit CA-125 konnte bisher keine Reduktion der Mortalität zeigen und wird daher in der Vorsorge auch klar nicht empfohlen. Auch eine Kombination aus CA-125 und transvaginalen Ultraschall konnte bisher keine Mortalitätsreduktion zeigen. CA-125 ist zwar bei etwa 80 % der EOC aller FIGO-Stadien erhöht. Problematisch ist jedoch, dass zum einen im Anfangsstadium (FIGO I) nur die Hälfte der Patientinnen erhöhte Werte aufweisen und zum anderen eben auch bei benignen Erkrankungen des Ovars erhöhte Werte auftreten. Daher ist CA-125 auch für die

Differenzialdiagnostik nicht geeignet. Die CA-125-Bestimmung hat jedoch einen Stellenwert in der markergesteuerten Nachsorge und ist deswegen in der Therapieverlaufskontrolle etabliert. Wie oben genannt ist bereits bei 80 % der Patientinnen mit Ovarialkarzinom zum Zeitpunkt der Erstdiagnose CA-125 erhöht. Bei Tumorprogress zeigt sich eine proportionale Erhöhung der CA-125-Konzentration zur Tumormasse. Die Therapie- und Verlaufskontrolle nach Operation bzw. Chemotherapie ist daher das relevanteste Einsatzgebiet für die Anwendung CA-125. Bei den meisten Patientinnen korreliert der CA-125-Spiegel mit dem Therapieverlauf. In großen Untersuchungen konnte sogar gezeigt werden, dass der Anstieg des CA-125-Spiegels dem klinischen Nachweis eines Rezidivs 3 Monate vorausgeht. Dennoch empfiehlt die "Kommission Ovar" der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie keinen Routineeinsatz in der Nachsorge. Für gewisse Bereiche kann die Verlaufskontrolle mit CA-125 Vorteile bringen. Voraussetzung ist die Aufklärung der Patientin über den Stellenwert der CA-125-Bestimmung. Bei einem fehlenden Abfall des CA-125, was auf ein fehlendes Ansprechen auf eine Chemotherapie hinweisen kann, kann diese frühzeitig gewechselt oder eingestellt werden (1,11). Zusammenfassend besteht die Notwendigkeit, einen Marker zu etablieren, der für Prognose und Therapieverlauf verwendet werden kann.

1.2 Die Immunglobulin-Superfamilie

Die Immunglobulin-Superfamilie beinhaltet eine Gruppe von Immunglobulin-ähnlichen Proteinen mit einer Länge von 90-100 Aminosäuren, die als endotheliale Liganden für Integrine fungieren, die auf Leukozyten und Thrombozyten exprimiert werden. Sie vermitteln ebenso homotype Zell-Zell-Assoziationen, sind an der Signaltransduktion und Zellmigration aus dem intravaskulären Kompartiment beteiligt. Die Prototypen dieser Superfamilie sind das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1). Die VCAM-1- und ICAM-1-Subfamilie fungieren als transmembranöse Adhäsionsmoleküle und als Liganden für Integrine. Sie vermitteln die Interaktion von Zellen untereinander oder mit der extrazellulären Matrix über eine Rezeptor-Ligand-Bindung. Dadurch ermöglichen sie Zellen, wichtige transmembranale Signale für Migration, Wachstum und Differenzierung zu erhalten (16).

Für die Pathogenese von vielen verschiedenen Erkrankungen spielt die Inflammation und damit das Immunsystem eine wesentliche Rolle. Eine Entzündung ist eine schützende biologische Reaktion, bei der Immunzellen, Blutgefäße und molekulare Mediatoren rekrutiert werden, um schädliche Reize wie Bakterien, Viren oder eben auch beschädigte Zellen, die maligne entartet sind zu eliminieren (17). Das Endothel spielt eine entscheidende Rolle als Nahtstelle zwischen Blut und Gewebe. Damit hat es multiple Funktionen im immunologischen Bereich, wie Antigenpräsentation und Expression von Zelladhäsionsproteinen oder anderen Oberflächenmolekülen (18, 19). Für die Proteine ICAM-1

und VCAM-1 wurde dieser Zusammenhang bereits für z. B. Sklerodermie, rheumatoide Arthritis und die koronare Herzerkrankung gezeigt (20,21). Aus vorausgegangenen Studien ist bekannt, dass Zelladhäsionsmoleküle über ihre Rolle im Immunsystem eine Rolle in der Tumorphathogenese spielen. Dies wird zusammengefasst unter dem Begriff der Tumorimmunologie (17). Für das Ovarialkarzinom ist z. B. das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) ein erfolgsversprechendes Ziel für neue zielgerichtete Therapien. Beispielsweise bindet der trifunktionale Antikörper Catumaxomab an EpCAM und kann das punktionsfreie Überleben bei Ovarialkarzinompatientinnen mit Aszites als vorherrschendem Symptom signifikant verlängern (22). Daneben ist z. B. der monoklonale Antikörper Bevacizumab ein etablierter Bestandteil in der Therapie des Ovarialkarzinomes. Die Fähigkeit eines Tumors neue Gefäße bilden zu können, die Tumorangiogenese, ist entscheidend für das Tumorwachstum. Das Signalmolekül VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ist ein zentraler Akteur bei der Regulierung der Tumorangiogenese. Bevacizumab bindet an das Signalmolekül VEGF und hemmt so die Angiogenese (11). Speziell für das EOC kann einem alternativen Forschungsansatz als dem klassischen genomischen für die Forschung an neuen Therapien eine besondere Bedeutung zu kommen. Die Annahme, dass alle Tumoren gezielt behandelt werden können, wurde in Bezug auf den Ansatz des EOC kontrovers diskutiert. Die Genomanalyse zeigt, dass diese Tumoren, insbesondere das hochgradige seröse Karzinom genomisch instabil sind und keine umsetzbaren Treiber Mutationen aufweisen, ähnlich wie HER2 bei Brust- und Magenkrebs. Die Interpretation von Genomdaten beim EOC stellt sich daher als sehr komplex dar. Sie erfordert daher einen sehr sorgfältigen Ansatz, der eine genauere Untersuchung der Daten über das bloße Vorhandensein oder Fehlen von Mutationen hinaus erfordert. Die umfangreichen genomischen Veränderungen in der DNA müssen im Ganzen betrachtet werden über die Rolle im Tumor hinaus (4).

1.3 Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1)

1.3.1 Vorkommen und Funktion

Das humane vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) oder auch Cluster of Differentiation 106 (CD 106) genannt ist ein transmembranöses Typ 1 Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 100-110 kDa, bestehend aus 715 Aminosäuren. Abbildung 1 zeigt eine schematische Struktur mit intra- und extrazellulärem Teil von VCAM-1. Es gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie und gehört zu den Adhäsionsmolekülen. Die Funktion liegt in der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen

und deren Extravasation aus dem Blut über das Endothel hinaus ins umliegende Gewebe. Auch ist eine Beteiligung in der interzellulären Signaltransduktion bekannt.

Vorrangig wird es in niedriger Ausprägung auf Endothelzellen exprimiert. Durch zahlreiche inflammatorische Zytokine, wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) und Interleukin-1 (IL-1), kann die Expression jedoch deutlich erhöht werden (16). Nachrangig wird es aber auch auf Neurozyten (23), glatten Muskelzellen (24), Fibroblasten und Makrophagen (25) exprimiert. Funktionell bindet VCAM-1 mit hoher Affinität sowohl $\alpha 4\beta 1$ -Integrine, ebenfalls bekannt als very-late antigen (VLA-4) als auch $\alpha 4\beta 7$ -Integrine (23). Diese Integrine bzw. VCAM-1-Liganden werden auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert. VLA-4 ist auf der Oberfläche von allen Leukozyten mit der Ausnahme von Neutrophilen zu finden (23). Daher spielt diese Interaktion eine Schlüsselrolle in der Leukozytenextravasation (7). VCAM-1 spielt eine entscheidende Rolle in der Entzündungsreaktion durch Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsorten. Der kleine intrazelluläre Teil des VCAM-1-Moleküls interagiert mit Ezrin (Cytovillin oder Villin-2), einem Mitglied der ERM-Proteinfamilie (Ezrin/Radixin/Moesin). ERM sind zyttoplasmatische Adapterproteine, die eine Reihe von transmembranösen Proteinen mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden. In Endothelzellen kommt es durch VCAM-1-Clustering, entweder durch Antikörper-Crosslinking oder durch Integrinbindung, zu einer Aktivierung von Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) (24). Die Aktivierung von Rac1 führt zu einem Umbau im Zytoskelett. Dieses wiederum kann die Tight Junctions zwischen den vaskulären Endothelzellen verändern und dadurch eine transendotheliale Migration ermöglichen (26). Abbildung 3 stellt die Signaltransduktionskaskade für VCAM-1 schematisch dar.

Zusammenfassend besteht die Hauptfunktion von VCAM-1 im inflammatorischen Bereich in der Leukozytenadhäsion und transendothelialen Migration zum Ort der Antigenpräsentation. Im Bereich von Tumoren sind wesentliche Prozesse, an denen VCAM-1 beteiligt ist die Angiogenese und die Metastasierung (17). Weitere postulierte, aber nachrangigere Funktionen für VCAM-1 sind die Regulation der Osteoklastenreifung (25) und das Anheften von Sichelzellen an das Gefäßendothel im Rahmen einer Hypoxie (27).

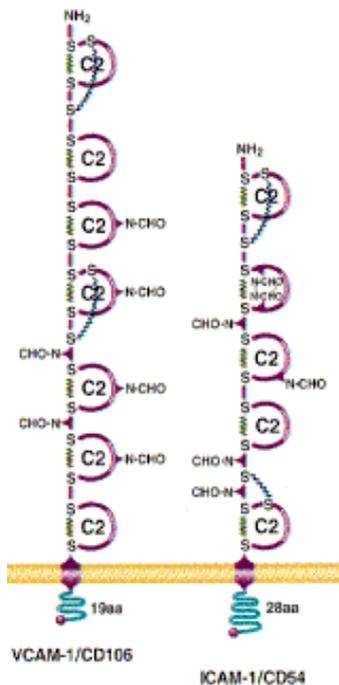


Abbildung 1: Molekulare Struktur der membranständigen Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (links) und ICAM-1 (rechts) modifiziert aus (26)

1.3.2 VCAM-1 und maligne Tumore

In mehreren Übersichtsarbeiten ist die Rolle von VCAM-1 und malignen Tumoren beschrieben worden (25-27). Hauptmechanismen von VCAM-1 sind hierbei wie oben beschrieben seine Rolle in der Passage des Endothels, der Angiogenese und der Metastasierung (17). Erhöhte Serumkonzentrationen für VCAM-1 konnten bei Patienten für verschiedene Tumore gezeigt werden. Hierzu gehören das kolorektale Karzinom, Bronchialkarzinom, Blasenkarzinome, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome, Ösophagustumoren, Nieren- und Brustkrebs (28). Die Expression von VCAM-1 konnte ferner in Magen- und Nierenzellkarzinomen und in Melanomen nachgewiesen werden. Hier wird eine vergleichbare Rolle vermutet wie in Brusttumorzellen (29, 30),

VCAM-1 wird in einigen Arbeiten als potenzielles therapeutisches Target in Metastasen diskutiert (31). Interaktionen zwischen Tumorzellen und umliegenden gesunden Gewebszellen sind entscheidend für die Fähigkeit eines Tumors sich auszubreiten und Metastasen zu bilden. Es konnte gezeigt werden, dass VCAM-1 in Brustkrebszellen signifikant höher exprimiert wird und metastasenfördernde Interaktionen zwischen Tumor und gesundem Gewebe möglich macht. Es wurde gezeigt, dass VCAM-1 auf zwei unterschiedliche Wege beim Brustkrebs, zum einen in der Lunge und zum anderen im Knochen, die Bildung von Metastasen ermöglicht. In der Lunge bindet

VCAM-1 auf der Zelloberfläche von Tumorzellen das Gegenstück zu sich selbst, das VLA-4. Über auf Metastasen assoziierte Makrophagen triggert VCAM-1 die Aktivierung der PI3K-Signalwege in Tumorzellen. Im Knochenmark lockt und bindet Tumor-VCAM-1 an Osteoklastenprogenitorzellen, die Integrin $\alpha 4\beta 1$ exprimieren, und beschleunigt damit deren Reifung zu multinukleären Osteoklasten, die die Bildung osteolytischer Metastasen ermöglichen. Dies verdeutlicht, dass nicht nur das VCAM-1 direkt, sondern auch eine Modulation der Interaktion zwischen Integrin $\alpha 4\beta 1$ oder anderer Schritte in der Signalkaskade ein mögliches Ziel von neuen Therapieansätzen sein können (29).

1.3.3 VCAM-1 und Ovarialkarzinome

Die Rolle von VCAM-1 im Ovarialkarzinom ist noch nicht ausreichend untersucht und verstanden. Die VCAM-1-Expression wurde bisher mit unterschiedlichen Methoden u. a. mittels immunhistochemischer Methoden, mittels Tissue Microarray, Westernblot (28), photometrischer Durchflusszytometrie (32) und im Mausmodell (21) untersucht. In einer Studie von Huang et al. wurde die VCAM-1-Expression in RAS-transformierten ovariellen epithelialen Zelllinien und zwei high grade Ovarialkarzinom-Tumorzelllinien unterdrückt, um der Bedeutung dieses Proteins in dem Stoffwechsel von Ovarialtumorzellen nachzugehen. Hierfür wurden die Zellmigration und das Tumorwachstum untersucht. Es zeigte sich bei VCAM-1-Unterdrückung ein geringeres Tumorwachstum und geringere Zellmigration. In einer multivariaten Analyse konnte zusätzlich gezeigt werden, dass VCAM-1 in Tumorzellen einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Überleben darstellt. Im Mausmodell konnte bei hoher Expression ein größeres Tumorwachstum und im Zellmodell mehr Migration im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gezeigt werden (28). Die Metastasierung für das Ovarialkarzinom ist vergleichsweise leicht, da nur eine Zellschicht durchdrungen werden muss, die die Ovarien von der Peritonealhöhle trennt. Das Vorhandensein von Metastasen wiederum ist mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Blockade von VCAM-1 mittels Antikörper die Tumorlast der Tiere verringerte und das Überleben der Tiere verlängerte (21). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die VCAM-1-Expression mit dem Tumorstadium der Ovarialkarzinome positiv korreliert. Obwohl alle Patientinnen im fortgeschrittenem Stadium VCAM-1 positiv waren, zeigten sich innerhalb der Gruppe mit neoadjuvanter Chemotherapie niedrigere Konzentrationen. Dies könnte auf eine Rolle der Chemotherapie in der Regulation der VCAM-1-Expression deuten. In vitro konnte nach Cisplatin-Exposition eine Reduktion der VCAM-1-Expression gezeigt werden. Diese erholte sich jedoch nach 16 Stunden wieder auf die ursprünglichen Werte. Im Mausmodell, in

welchem platinsensitive Tumore ebenfalls eine Cisplatintherapie durchliefen, zeigten sich nach der Chemotherapie niedrigere VCAM-1-Werte und kleinere Tumormassen (33). Eine kleine Studie am Menschen von Scalici et al. konnte zudem zeigen, dass die persistierende VCAM-1-Expression im Mesothel in Patientinnen mit platinhaltiger Chemotherapie ein Marker für eine Platinresistenz ist. Zusammenfassend konnte in den bisherigen Untersuchungen eine erhöhte VCAM-1-Expression mit dem EOC in Zusammenhang gebracht werden. Die VCAM-1-Expression korrelierte positiv mit dem FIGO-Tumorstadium und der Platinresistenz (33), dem Tumorwachstum und Tumorzellmigration (21, 28). Daneben war eine VCAM-1-Expression prognostisch ungünstig für das Gesamtüberleben (21, 28).

1.4 Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1)

1.4.1 Vorkommen und Funktion

Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) oder ebenfalls bekannt als Cluster of Differentiation 54 (CD54) ist ein fast ubiquitär vorkommendes Typ 1 transmembranöses Glykoprotein. Es besteht aus einem großen extrazellulären Anteil mit 5 glykosylierten Domänen mit mehreren Loops, einem kleinen transmembranösen Anteil und einem zytoplasmatischen, intrazellulärem Anteil. Abbildung 1 zeigt eine schematische Struktur mit intra- und extrazellulärem Teil von ICAM-1.

Primär wird es auf Endothelzellen und Zellen des Immunsystems exprimiert. Es spielt eine Schlüsselfunktion in der Leukozytenmigration und -aktivierung aus dem Blut über die Epithelzellen ins Gewebe. Daneben ist es Teil von Signaltransduktionskaskaden (16, 34, 35). Die Hauptbindungspartner von ICAM-1 sind die Leukozyten Integrine Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) und Mac-1 (CD11b/CD18). Daneben bindet ICAM-1 mehrere Nicht-Integrin-Liganden wie CD43/Sialophorin, Fibrinogen, Hyaluron, Rhinoviren und Plasmodium falciparum-infizierte Erythrozyten. Durch Inflamationsreaktion und damit Ausschüttung von Zytokinen wie TNF-alpha, Interferon-gamma und IL-1 wird die Expression von ICAM-1 auf Endothel- und Epithelzellen deutlich hoch reguliert. Die Bindung an ICAM-1 verlängert die Antigenpräsentation auf Dendrozyten und fördert die T-Zellproliferation und Zytokinausschüttung. Die ICAM-1-Aktivierung ist ebenfalls beteiligt an der Angiogenese, Wundheilung und im Knochenstoffwechsel (36). Erhöhte Werte für die lösliche Form von ICAM, werden in Verbindung mit koronarer Herzerkrankung, Diabetes mellitus Typ 2, oxidativem Stress, abdominellem Fett, Bluthochdruck, Leberzirrhose und mehreren Malignomen gebracht (37-43). Dadurch, dass ICAM-1 auf Epithelzellen des Respirationstraktes exprimiert wird und das Rhinovirus binden kann, hat es möglicherweise eine wesentliche Rolle in der Entstehung von viralen Infekten der oberen Atemwege, wie z. B. Erkältungen. Hierbei soll es sich primär um proinflammatorische Signalwege handeln. Weiterhin wird

eine Rolle bei Allergien des Auges, aufgrund der Fähigkeit proinflammatorische Lymphozyten und Mastzellen zu rekrutieren, vermutet. Für das Gen, das für ICAM-1 codiert, sind einige Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) bekannt. Es wird vermutet, dass sie das Risiko für die Entwicklung von Tumorerkrankungen erhöhen (44). Zusammenfassend besteht die Hauptfunktion auch von ICAM-1 im inflammatorischen Bereich in der Leukozytenadhäsion und Migration zum Ort der Antigenpräsentation. Weitere beschriebene Funktionen liegen im Bereich der Angiogenese und der Metastasierung (17). Abbildung 3 stellt die Signaltransduktionskaskade für ICAM-1 schematisch dar.

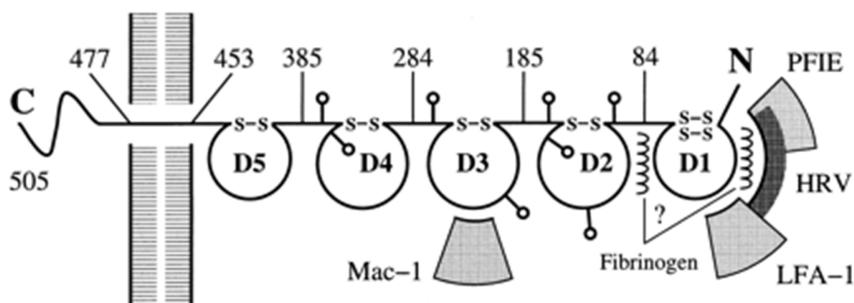


Abbildung 2: Eine schematische Darstellung der molekularen Struktur von ICAM-1 mit der typischen Loopstruktur und den Bindungsstellen für LFA-1, Mac-1, humanes Rhinovirus, Fibrinogen und Plasmodium falciparum-infizierte Erythrozyten (PFIE) modifiziert aus (45).

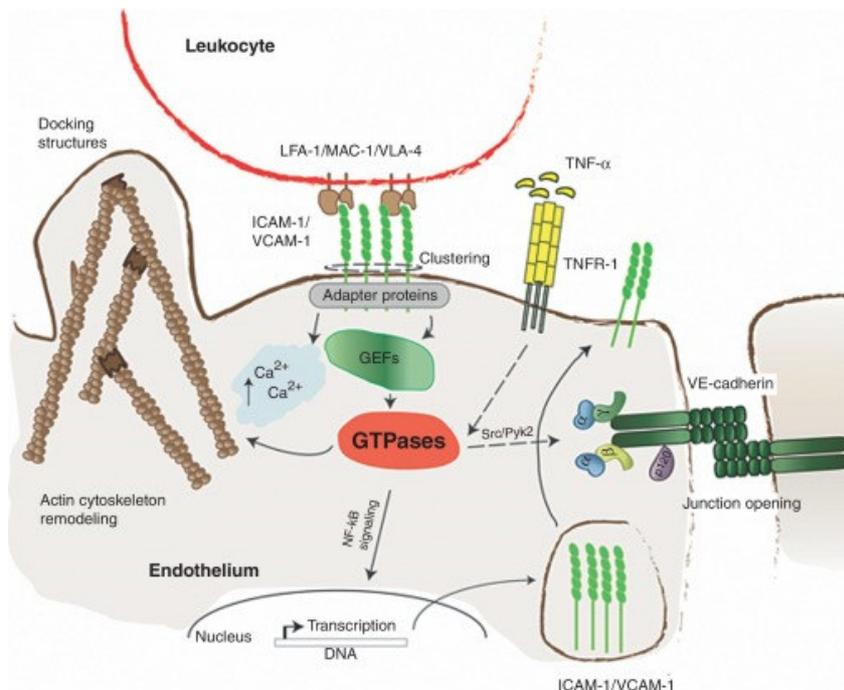


Abbildung 3: Schematische Darstellung der endothelialen Signaltransduktion von ICAM-1 und VCAM-1. Darstellung der endothelialen Signaltransduktion die Rho-GTPase mit einbeziehend, die die Leukozytenextravasation über einen

parazellulären Weg reguliert. Clustering von ICAM-1 und VCAM-1 resultiert in einer Kaskade von Signalen, die im Endothel initiiert werden. Hierzu gehören eine Erhöhung der Calciumwerte, Aktivierung der kleinen Rho-GTPase und Aktivierung des Phosphorylierungspathways. All dieses führt zu einer transienten Öffnung der endothelialen Zell-Zell-Junktions. Diese wiederum ermöglichen eine parazelluläre Passage von Leukozyten. Zusätzlich kann es durch ein Clustering von ICAM-1/VCAM-1 zu einer Zunahme der Genexpression von ICAM-1/VCAM-1 kommen, was einem positiven Feedback entspräche. Modifiziert aus (46).

1.4.2 ICAM-1 und maligne Tumore

Die Rolle, die ICAM-1 bei der Fähigkeit eines Tumors maligne zu entarten spielt, ist noch nicht vollständig verstanden. Zahlreiche Studien haben die Rolle von ICAM-1 in der Tumorentstehung und -ausbreitung untersucht und kamen hierbei zu unterschiedlichen Feststellungen (47). Es wird vermutet, dass solide Tumorzellen an endotheliales ICAM-1 via Mucin-1 (MUC-1) binden. Durch die Tumorbinding kommt es zu einer Autohochregulation von Tumor-ICAM-1, was weitere Botenstoffe ausschüttet, die Makrophagen anlocken. Diese wiederum binden an Tumor-ICAM-1 und setzen weitere Chemokine und Zytokine frei, die letztendlich über verschiedene Zwischenschritte die Integrität des Endothels aufheben und damit eine Invasion der malignen Zellen ins Gewebe möglich machen. Die Tumorzell-ICAM-1-Expression bestimmt dadurch das Potenzial Metastasen zu bilden und bestimmt damit letztlich die Aggressivität der Tumorerkrankung. Roland et al. konnten zeigen, dass durch die Inhibition von ICAM-1 durch einen Antikörper das Wachstum von Melanomzellen im Mausmodell gehemmt wurde. Der genaue Mechanismus ist nicht vollständig verstanden. Jedoch kann es sein, dass der entscheidende Schritt für die Metastasierung die Penetration des Endothels ist (47). Das Ausmaß der ICAM-1-Expression korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung. Diesbezüglich wurden bereits mehrere Malignome und deren Potenzial zur Metastasierung und invasivem Wachstum untersucht. Gesunde Mukosa des Magens exprimiert kein ICAM-1. Anders jedoch konnte bei Tumorzellen des Magens ICAM-1 nachgewiesen werden. Die Konzentrationen von löslichem ICAM-1 im Plasma dieser Patienten korreliert mit einem schlechteren Outcome und einer höheren Rate an positivem Lymphknotenbefall (48). Ähnlich ist es bei den dünnen Melanomen (< 0,75 mm). Auch diese exprimieren kaum ICAM-1. Hingegen kann bei den dickeren Melanomen (> 1 mm), die deutlich invasiver wachsen, eine hohe Konzentration von ICAM-1 nachgewiesen werden (49). Ähnliches konnte beim Adenokarzinom der Gallenblase nachgewiesen werden. Um maligne entarten zu können, muss der Tumor ICAM-1 exprimieren (50). Auch für das kolorektale Karzinom wurde nachgewiesen, dass die Fähigkeit ICAM-1 zu exprimieren Voraussetzung für ein invasives Wachstum und für eine Metastasierung ist. Für das kolorektale Karzinom wurden erhöhte Werte von ICAM-1 bei positivem Lymphknotenbefall nachgewiesen (47).

Im Gegensatz zu den oben genannten Ergebnissen gibt es aber auch zahlreiche Studien für unterschiedliche Tumorentitäten, die das genaue Gegenteil zeigten. Für Lymphome, das kolorektale Karzinom, Kopf- und Halstumore zeigten sich ein geringeres Tumorwachstum und eine niedrigere Metastasierungsrate, sowie eine insgesamt bessere Prognose bei Patienten mit ICAM-1-positiven Tumoren im Vergleich zu ICAM-1 negativen Tumoren (51-53).

Selbst für die gleiche Tumorentität zeigen sich teilweise divergierende Befunde. In einer Untersuchung aus dem Jahr 2014 wurde ICAM-1 als Zielmolekül für das dreifach negative Mammakarzinom (Triple negative breast cancers- TNBCs) untersucht (54). TNBCs haben eine hohe Mortalitätsrate aufgrund der aggressiven Proliferation und Metastasierung und der mangelnden therapeutischen Möglichkeiten. Für diese Tumore wurde in humanen TNBC-Zelllinien und -Geweben eine Überexpression von ICAM-1 beschrieben. Dadurch kann ICAM-1 als potenzielles Zielmolekül für Chemotherapien und als Biomarker zur Therapie- und Verlaufskontrolle infrage kommen (54). In einer anderen Brustkrebsstudie konnte gezeigt werden, dass die ICAM-1-Expression auf den Tumorzellen mit einer niedrigeren Aggressivität des Tumors korrelierte (55). Eine andere vergleichbare Studie zeigte hingegen das genaue Gegenteil (56).

Die genaue Rolle von ICAM-1 in der Tumorphathologie ist letztlich nicht endgültig geklärt und es gibt keine plausible Erklärung für die teilweise konträr scheinenden Rollen. Die Grundfunktionen liegen in Inflammationsreaktionen, Leukozytenmigration, Angiogenese und Metastasierung. Diese divergierenden Befunde bisheriger Studien zur ICAM-1-Funktion müssen weiter differenziert untersucht werden (57).

1.4.3 ICAM-1 im Ovarialkarzinom

In unserer Literaturrecherche fanden sich nur zwei Arbeiten, die sich mit dem Thema ICAM-1 und EOC beschäftigt haben. Beide Arbeiten konnten eine reduzierte ICAM-1 Expression mit dem Ovarialkarzinom in Zusammenhang bringen. De Groote et al. beschreiben eine reduzierte Expression von ICAM-1 in Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu gesunden Ovarzellen und solchen mit einer reduzierten Kanzerogenität (58). Auch Arnold et al. beschrieben im Jahr 2001 für einige Ovarialkarzinomzelllinien und für primäre Ovarialtumore eine reduzierte Expression von ICAM-1 im Vergleich zu gesundem Ovargewebe (59). In den beiden bisher veröffentlichten Arbeiten wurde die Expression auf genetischer Ebene mit Quantifizierung der entsprechenden RNAs untersucht. Eine Proteinanalyse mittels ELISA ist bisher nicht erfolgt.

2 Fragestellung

Das Ovarialkarzinom hat die höchste Mortalität unter den gynäkologischen Tumoren (1). Gründe für die schlechte Prognose sind Fehlen von spezifischen Symptomen und fehlende Biomarker für das Screening und Fehlen von Früherkennungsprogrammen, was in der Großzahl der Fälle eine Diagnosestellung in einem sehr fortgeschrittenen Stadium zur Folge hat. Eine Heilung ist dann nicht mehr möglich (11). Daher ist die Etablierung von neuen Biomarkern, sowohl für die Früherkennung und die Prognoseabschätzung, sowie als Therapieverlaufsmarker für eine gezielte Tumorthherapie und zur individuellen Risikoabschätzung dringend notwendig. Daneben ist auch die Suche nach neuen Zielmolekülen im Sinne einer zielgerichteten Tumorthherapie („targeted therapy“) ebenfalls notwendig (13). Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 spielen eine wesentliche Rolle bei der Zellkommunikation und bei der Zellmigration jenseits des Epithels, welches die Grundlage für eine Metastasierung darstellt (16, 34, 35). Aufgrund dieser Funktionen sind sie daher ein erfolgversprechendes Zielmolekül. In vorausgegangenen Studien konnten hierfür für andere Malignome (29, 31, 47, 51-53) und auch für das Ovarialkarzinom (33, 58-62) bereits erste Hinweise gesammelt werden. Die aus unseren Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse sollen zu einem besseren Verständnis der Rolle von ICAM-1 und VCAM-1 im Ovarialkarzinom und letztlich zur Optimierung der Tumorthherapie beitragen.

In dieser Arbeit soll die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, sowie die Ratio ICAM-1/VCAM-1 auf ihre prognostische Bedeutung untersucht werden. Hierfür wurde in einem Kollektiv von 231 Patientinnen mit fortgeschrittenem EOC (OVCAD-Register) erst einmal die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 mittels ELISA (Sandwich-Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) im Gewebe und Plasma untersucht. In einem weiteren Schritt wurde die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 im Plasma und Gewebe und mit den klassischen bereits etablierten Prognosefaktoren korreliert. Weiterhin wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der ICAM-1 und VCAM-1 Expression und dem Gesamtüberleben (OS) und dem progressionsfreien Überleben (PFS) gibt. Abschließend wurden die Ergebnisse vor dem Hintergrund bisher bekannter Wirkmechanismen der Tumorbiologie diskutiert und eingeordnet, um so einen Beitrag zum besseren Verständnis der molekularbiologischen Wirkmechanismen zu leisten.

Folgende Fragestellungen sollen im Einzelnen in dieser explorativen und retrospektiven Untersuchung bearbeitet werden.

1. Wie ist die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und die der Ratio ICAM-1/VCAM-1 in Gewebe und Plasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom?
2. Welche Korrelation besteht zwischen der ICAM-1-, VCAM-1 und der Ratio ICAM-1/VCAM-1- Expression im Plasma und Gewebe?
3. Welcher Zusammenhang besteht für die ICAM-1, VCAM-1 und ICAM-1/VCAM-1 Expression mit etablierten Prognosefaktoren (Alter bei Diagnosestellung, FIGO-Stadium histologischer Subtyp, Grading, postoperativ verbliebener Tumorrest, Aszites, Lymphknotenstatus, CA-125, Response to Platinium)?
4. Welchen Einfluss hat die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und die Ratio ICAM-1/VCAM-1 auf das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) unabhängig von den oben genannten Prognosefaktoren?

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv OVCAD (“Ovarian Cancer- Diagnosis of a Silent Killer”)

Die untersuchten Proben stammen aus dem prospektiven „Ovarian Cancer Diagnosis of a Silent Killer“ Projekt (OVCAD) (63). Dieses ist ein multizentrisches Projekt gefördert von der Europäischen Union, in dessen Rahmen neue Prädiktoren und Prognosemarker für die Früherkennung bei residuellem Tumorrest bei EOC untersucht werden sollten. Zwischen Februar 2005 und Dezember 2008 wurden in den fünf führenden europäischen Zentren für Gynäkoonkologie in Österreich, Belgien, Frankreich, Deutschland und den Niederlanden prospektiv 275 Patientinnen in diese translationale Studie eingeschlossen. Einschlusskriterien waren: ein histologisch gesichertes, primäres fortgeschrittenes EOC im FIGO Stadium II-IV, eine radikale zytoreduktive Debulking-OP und eine postoperative platinbasierte Chemotherapie. Die Debulking-OP beinhaltete eine Hysterektomie, bilaterale Salpingo-Ovariectomie, Peritoneallavage, Omentektomie, Appendektomie, Lymphadenektomie und eine subtotale Peritonektomie. Das mediane Patientenalter lag bei 58 Jahren (Range: 18-85 Jahre). Der Großteil der Patientinnen war im FIGO-Stadium III mit schlecht differenziertem Tumor und es lag Aszites vor. Neben klinischen Daten wurden systematisch Gewebe-, Plasma- und Aszitesproben gesammelt mit dem Ziel eine Biomaterialdatenbank aufzubauen, um eine systematische Suche nach neuen Biomarkern zu ermöglichen. Für den Einschluss der Patientinnen in das OVCAD-Register liegt eine Zusage der Ethikkommission der jeweiligen teilnehmenden Zentren (EK207/2003, ML2524, HEK190504, EK366, and EK260) und eine schriftliche Einverständniserklärung der Patientinnen vor.

3.2 Probengewinnung und Konservierung

3.2.1 Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden intraoperativ durch den Operateur gewonnen und sofort nach Entnahme auf Eis gelegt und innerhalb von 20 Minuten weiterverarbeitet. Für die Proteinanalyse wurden die gefrorenen Gewebeproben homogenisiert. Diese wurden dann in Tris buffered Saline (TBS) gelöst und mittels Hinzugabe von Complete mini protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics GmbH, Katalognr.11 836 153 001) auf einen pH-Wert von 8,5 gebracht. Schließlich wurde 10 % Triton X-100 in TBS gelöst hinzugegeben. Die Endkonzentration sollte 1 % Triton X-100 enthalten. Die Mischung wurde für 16 Stunden bei 4° C gerührt und im Anschluss bei 100,000g für 60 Minuten bei 4° C zentrifugiert, um die zellulären Bestandteile zu lösen. Der Überstand wurde entfernt und in dem verbleibenden Volumen der Gesamtproteingehalt mittels Bicinchoninsäure Proteinessay (BSA)

bestimmt. Die Proben wurden mittels Hinzugabe von TBS auf einen Proteingehalt von 2-3 mg/ml verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung bei - 80° C im TOC-Labor (Tumorbank Ovarial Carcinoma) gelagert.

3.2.2 Plasmaproben

25 ml Blut wurde präoperativ in EDTA-Röhrchen abgenommen. Dieses wurde dann systematisch innerhalb von 2 Stunden weiterverarbeitet. Es erfolgte eine Zentrifugation mit 3000 rpm für 10 Minuten, um feste Bestandteile zu trennen. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei - 80 °C gelagert.

3.3 Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien der Firma R&D Systems (26)

Material	Zusammensetzung	Katalognummer	Firma
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	137mM NaCl, 2,7mM KCL, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2-7,4	# DY006	R&D Systems
Waschpuffer	0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,2-7,4	#WA126	R&D Systems
Reagentverdünnungslösung (Reagent Diluent)	1% BSA in PBS, pH 7,2-7,4	#DY995	R&D Systems
Substratlösung	1:1 Mischung aus Color Reagent A und Color Reagent B	#DY999	R&D Systems
Stopplösung	2N H ₂ SO ₄	#DY994	R&D Systems
96-Well-Mikroplatten		#DY990	R&D Systems
Plattenabdeckung		#DY992	R&D Systems

3.4 Kits für ELISA

Tabelle 6: Kits für ELISA

Protein	Kitname	Katalognummer	Firma
Humanes ICAM-1/CD54	DuoSet® ELISA	DY720-05	R&D Systems

	DEVELOPMENT SYSTEM		
Humanes VCAM-1/CD106	DuoSet® ELISA DEVELOPMENT SYSTEM	DY809	R&D Systems

Inhalt DuoSet für humanes ICAM-1/CD54

Tabelle 7: Inhalt für das Kit "Duo Set für humanes ICAM-1/CD 54"

Beschreibung	Katalognummer
Human ICAM-1 Capture Antibody	840432
Human ICAM-1 Detection Antibody	840433
Human ICAM-1 Standard	840434
Streptavidin-HRP	893975

Inhalt für DuoSet humanes VCAM-1/CD106

Tabelle 8: Inhalt für das Kit "Duo Set für humanes VCAM-1/CD 106"

Beschreibung	Katalognummer
Human VCAM-1 Capture Antibody	841127
Human VCAM-1 Detection Antibody	841128
Human VCAM-1 Standard	841129
Streptavidin-HRP	893410

Die Proteinanalyse erfolgte mit den Kits der Firma R&D Systems gemäß Herstellerangaben. Die Kits sind geeignet für Analysen von Gewebelysaten, Plasma- und Serumproben. Die Kits wurden bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb maximal eines Monats verwendet. Es erfolgten grundsätzlich Doppelmessungen für jeden Standard, die Kontrolle und die jeweiligen Proben. Von den beiden Einzelmessungen wurde, falls keine größere als eine Standardabweichung bemessende Abweichung bestand, der Mittelwert berechnet und zur weiteren Analyse verwendet. Bei größerer Abweichung wurde die Messung auf einer neuen Platte wiederholt. Für jede Platte wurde eine neue Standardkurve berechnet. Zur Auswertung wurde der Mikroplattenanalyser „Magellan“ der Firma Tecan Sunrise verwendet. Die Analyse der photometrischen Extinktion (optischen Dichte) erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Eine Wellenlängenkorrektur wurde bei 540 nm eingestellt, wie vom Hersteller empfohlen. Die Software „Magellan“ ermittelte unter Abzug des Blankwertes die

Standardkurven und extrapolierte hieraus aus dem linearen Bereich der sigmoid verlaufenden Standardkurve die Konzentrationen in ng/ml. Abbildung 7 zeigt hierfür ein exemplarisches Beispiel.

3.5 Prinzip des Sandwich-Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

ELISA bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Beim Sandwich-ELISA werden zwei verschiedene primäre Antikörper verwendet, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Zu betonen ist hierbei, dass sie zwar an das gleiche Antigen binden, jedoch an unterschiedliche Stellen (Epitope) des Antigens. Der erste Antikörper, Capture Antibody (CA) wird an die Mikrotiterplatte gebunden und ist damit fest. Die zu untersuchende Probe wird auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und kann nun an den festen CA binden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Mikrotiterplatte gewaschen. Dadurch werden alle nicht an den CA gebundenen Anteile von der Mikrotiterplatte entfernt. Zurück bleibt nur das am CA gebundene Antigen. Nun wird ein zweiter primärer Antikörper, der sogenannte Detektionsantikörper (DA) hinzugegeben. Dieser bindet das gleiche Antigen, aber an einem anderen Epitop. Nach Ende der Inkubationszeit folgt hier ebenfalls ein Waschschriff. Dadurch verbleibt auf der Platte ein Komplex aus CA mit dem Antigen und DA. Das Ergebnis wird quantifiziert, indem nun Streptavidin Horseradish-Peroxidase (HRP) hinzugegeben wird. Diese bindet an den DA. Ungebundenes HRP wird über einen Waschschriff entfernt. Damit verbleibt ein Komplex aus CA-Antigen-DA-HRP auf der Mikrotiterplatte. In einem weiteren Schriff wird die Substratlösung auf die Platte gegeben. Diese katalysiert eine enzymatische Farbreaktion. Die entwickelte Farbreaktion verhält sich proportional zum vorhandenen Antigen. Nach Inhibition der enzymatischen Reaktion mittels Stopplösung wird die Farbintensität photometrisch bestimmt. Da die Farbreaktion sich proportional zum gebundenen Protein verhält, kann so mit Hilfe einer Standardreihe mit definierten Konzentrationen die Proteinkonzentration der untersuchten Proteine berechnet werden.

DuoSet ELISA Development Systems Assay Principle

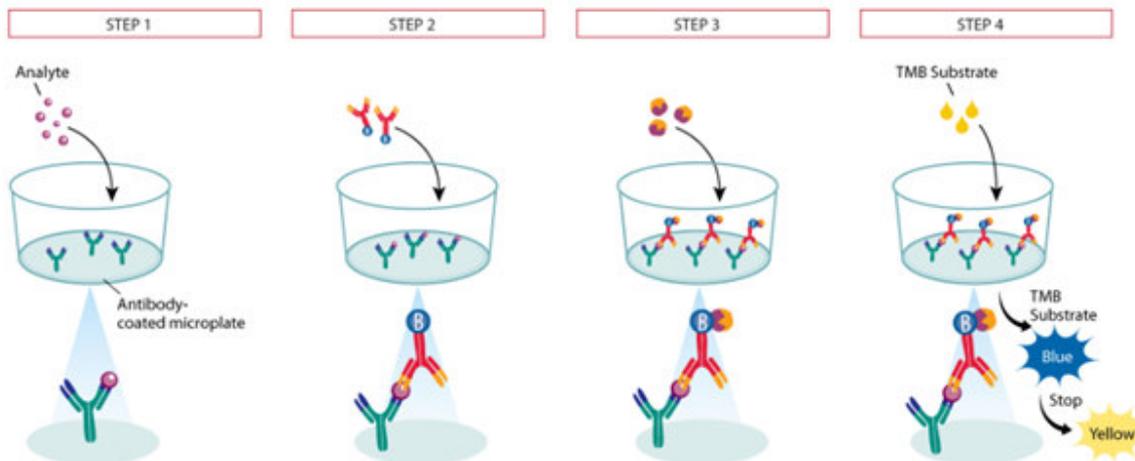


Abbildung 4: Schematische Darstellung des ELISA Prinzips der Firma R&D Systems. Schritt 1: Der Capture Antikörper (CA) bindet an eine Mikrotiterplatte. Ungebundener CA wird durch Waschen entfernt und die Platten geblockt. Schritt 2: Die Proben und Standards werden aufgetragen und durch den immobilisierten CA gebunden. Ungebundenes Material wird ausgewaschen und der Detektion Antikörper (DA) hinzugegeben. Erneuter Waschschrift. Schritt 3: Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) wird verwendet, um an den DA zu binden. Ungebundenes HRP wird durch Waschen entfernt. Schritt 4: Tetramethylbenzidine (TMB) Substratlösung wird hinzugegeben und es entwickelt sich eine Blaufärbung, die proportional zum vorhandenen Analyten in der Probe ist. Die Farbentwicklung wird durch Hinzugabe der Stopplösung gestoppt. Es kommt zur Gelbfärbung. Umgehende Absorptionsmessung bei 450nm. Modifiziert aus R&D Systems (26).

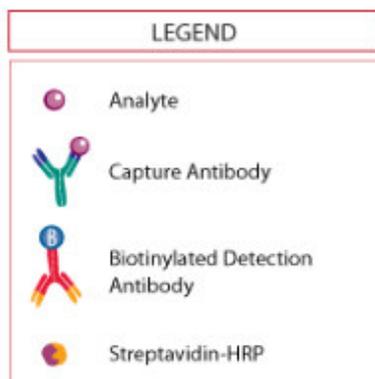


Abbildung 5: Legende für Abbildung 4 aus R&D Systems (26)

3.6 ELISA-Protokoll

Die Standards, Proben, Streptavidin-HRP und der Detection Antibody werden mit Reagentverdünnungslösung und der Capture Antibody mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

96-Well Plattenvorbereitung:

1. Auftragen von 100 µl des Capture Antibody pro Well
→ Versiegeln mit Folie und Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht
2. Waschschrift 1
Mit je 400 µl Waschpuffer pro Well, mit 3 Wiederholungen
3. Blocken der Platten mit 300 µl Reagent Diluent pro Well
→ Inkubation bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde
4. Waschschrift 2 siehe unter Punkt 2. Die Platten sind nun gebrauchsfertig.

ELISA-Essay:

1. Pro Well werden 100 µl Standard oder Proben aufgetragen.
→ Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur
2. Waschschrift 1 s.o.
3. Pro Well Pipettieren von 100 µl Detection Antibody
→ Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur
4. Waschschrift 2 s.o.
5. Pro Well Pipettieren von 100 µl Streptavidin-HRP
→ Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur an einem lichtgeschützten Ort
6. Waschschrift 3 s.o.
7. Pro Well 100 µl Substratlösung
→ Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur an einem lichtgeschützten Ort
8. Pro Well 50 µl der Stopplösung pipettieren und gut Mischen
9. Sofortige Messung der optischen Dichte durch ein Mikroplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm

Herstellung des Standards am Beispiel für ICAM-1

Für die Herstellung des Standards wurde der im Kit mitgelieferte humane VCAM-1 Standard verwendet und nach unten gezeigtem Schema verdünnt. Abbildung 6 zeigt das Prinzip der Herstellung der Verdünnungsreihe für die Standardkurve. Für jede Analyse, das heißt für jede 96-Wellplatte wurde eine eigene Standardkurve erstellt. Abbildung 7 zeigt ein Beispiel für eine Standardkurve.

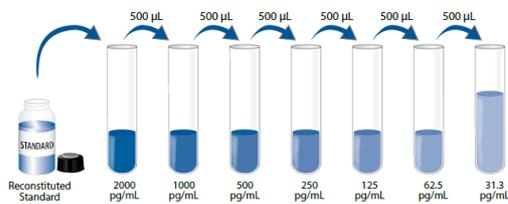


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Erstellung der Verdünnungsreihe für die Erstellung einer Standardkurve aus R&D Systems (26)

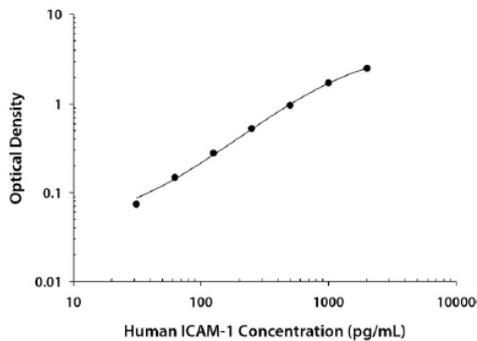


Abbildung 7: Exemplarisches Beispiel für eine Standardkurve am Beispiel von ICAM-1 aus R&D Systems (26)

3.7 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung von Excel (Microsoft Office 2016) und dem Statistikprogramm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 25, sowie Magellan Tecan Sunrise Software (Version 7).

Kategoriale Variablen werden als Zahlen und Prozentangaben angegeben. Alle kontinuierlichen Variablen (Biomarkerexpression) wurden auf Normalverteilung untersucht. Liegt Normalverteilung

vor, werden die kontinuierlichen Variablen deskriptive als Mittelwert (Standardabweichung) berichtet und die Signifikanzprüfung erfolgt mit parametrischen Tests. Liegt keine Normalverteilung vor, werden kontinuierliche Variablen deskriptiv als Median und Spannweite (Range) dargestellt und mit nichtparametrischen Verfahren analysiert.

Für die Korrelation der Expression der Biomarker im Gewebe und im Plasma wurde der Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman's Rho) berechnet und auf eine signifikante Abweichung von 0 getestet. Als statistisch signifikant werden hier Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,01 gewertet.

Für den Zusammenhang der Biomarkerexpression mit den klassischen Prognosefaktoren wurden Gruppenunterschiede zwischen Subgruppen entsprechend der Kategorien der Prognosefaktoren betrachtet. Da für die Parameter der Biomarkerexpression überwiegend keine Normalverteilung vorlag, wurden einheitlich nicht-parametrische Tests angewendet. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hierzu gehörten die Variablen der residuelle Tumorst, Peritonealkarzinomatose, Aszites, die Response to Platinum, der Lymphknotenstatus und die Metastasierung. Für den Vergleich von mehreren Gruppen wie FIGO-Stadium, Histologie und Grading wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Für das Alter und den Tumormarker CA-125 wurden keine Gruppen gebildet und daher der Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Die graphische Darstellung der Verteilung der klassischen Prognosefaktoren erfolgte zusätzlich mit Hilfe von Boxplots.

Da es für die beiden untersuchten Biomarker bisher keine etablierten Cutoffwerte gibt, wurde für die Cutoff-Werte-Berechnung die Onlinesoftware der "Cutoffwerte-Finder" verwendet. Hierfür wurde innerhalb dieser Webapplikation die Methode „Signifikanz nach Überleben“ verwendet. Das Prinzip der Cutoffwertefindung ist unten erläutert.

Das mediane Gesamtüberleben und das mediane progressionsfreie Überleben wurden mit 95 %-Konfidenzintervall (95 %-KI) berechnet. Das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben der Subgruppen wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Für den univariaten statistischen Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven wurde der Log-Rank-Test verwendet. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 gewertet.

In einer weiteren Analyse wurde der Einfluss der klassischen Prognosefaktoren und der ICAM-1- und VCAM-1-Expression auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben untersucht. Die multivariate Analyse mit Adjustierung für klassische Prognosefaktoren erfolgte mit dem schrittweisen

multivariablen Cox-Regressionsmodell. Für alle Variablen im Modell wurde die Hazard-Ratio (HR) mit einem 95 %-KI berechnet. Der Wert der HR ist signifikant, wenn das 95 %-KI den Wert 1 nicht einschließt. Zusätzlich wird das Ergebnis des Signifikanztests angegeben. Ein signifikanter Wert der HR im Cox-Regressionsmodell bedeutet, dass die Biomarkerwerte auch nach Adjustierung für die anderen Prognosefaktoren einen Einfluss auf die Prognose haben. Zunächst wurde ein multivariablen Cox-Regressionsmodell mit allen Prognosefaktoren erstellt (Enter-Modell bzw. vollständiges Modell). Im nächsten Schritt wurde nach einem sparsamen Modell mit wenig Variablen gesucht und dafür ein zweites Cox-Regressionsmodell mit schrittweiser Variablenselektion berechnet. Dieses Modell erfasste die Biomarker (ICAM-1 und VCAM-1) sowie alle Prognosefaktoren, die im ersten Cox-Regressionsmodell einen p-Wert von $p \leq 0,05$ zeigten.

3.8 Cutoff-Werte-Berechnung mit dem „Cutoff-Finder“

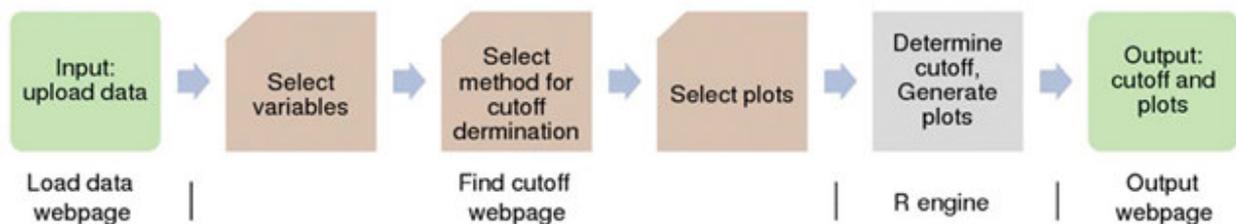


Abbildung 8: Workflow zur Cutoff-Wertberechnung durch den „Cutoff-Werte-Finder“. Die Zeile unter den Kacheln bezieht sich auf die Orte, wo die Daten verarbeitet werden. Die erste Zeile mit den Kacheln beschreibt die einzelnen Schritte der Datenverarbeitung. 1. Die Daten werden hochgeladen. 2. Der Benutzer wählt die Variablen aus (Biomarker und Outcome). Der Benutzer wählt die Methode für die Cutoffwertberechnung. 4. Der Benutzer wählt die zu generierenden Plots aus. 5. Die optimalen Cutoffwerte werden bestimmt und die Analyseplots werden generiert. 6. Cutoffpunkte und Plots werden auf der Ergebniswebsite graphisch dargestellt. Modifiziert aus (64).

Die Cutoff-Wertberechnung erfolgte mit einer frei verfügbaren Webapplikation, dem „Cutoff-Finder“ (64, 65). Hierbei handelt es sich um eine Software, die fünf verschiedene Methoden der Cutoffwert-Berechnung verwendet. Diese werden miteinander kombiniert und verglichen und visuell dargestellt. Die Daten werden über eine Onlineplattform hochgeladen und die zu untersuchenden Variablen und das Outcome definiert. In unserer Untersuchung war dieses das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben. In einem weiteren Schritt wird die Methode der Cutoffbestimmung ausgewählt. Wir wählten die Methode „Signifikanz nach Überleben“. Abschließend werden die Ergebnisse grafisch dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Die untersuchten Proben stammen aus dem prospektiven Ovarian Cancer Diagnosis of a Silent Killer Projekt (OVCAD). Zwischen Februar 2005 und Dezember 2008 wurden prospektiv 275 Patientinnen mit histologisch gesichertem fortgeschrittenen EOC eingeschlossen. Hiervon lagen für 231 Patienten Plasma- und Gewebeproben für Analysen vor. Das mediane Patientenalter bei Diagnosestellung lag bei 58 Jahren (Range: 27-85 Jahre). Es wurden nur Patientinnen mit Erstdiagnose eines Ovarialkarzinomes eingeschlossen. Der Großteil der Patientinnen war im FIGO-Stadium III (77,5 %) mit schlecht differenziertem Tumor (72,7 %). Die mediane Follow-up-Zeit betrug 37 Monate. Der häufigste histologische Subtyp war das seröse Ovarialkarzinom (85,7 %). 70 % der Patientinnen hatten postoperativ keinen makroskopisch nachweisbaren Tumorrest. Bei weiteren 16 % lag der nachweisbare Tumorrest bei maximal 1 cm. Zum Zeitpunkt der Gewebeasservierung zeigte sich bei 77,9 % der Patientinnen bereits Aszites. Der Lymphknotenstatus war bei 53,7 % der Patientinnen positiv. Zusammenfassend lag somit bei ca. 2/3 der Patientinnen eine fortgeschrittene Erkrankung vor. Tabelle 9 fasst die klinischen und pathologischen Patientencharakteristika der Patientinnen zusammen.

4.2 Klinische und pathologische Patientencharakteristika

Tabelle 9: Klinische und pathologische Patientencharakteristika

Parameter	Ovarialkarzinome
Eingeschlossene Ovarialkarzinomproben n (%)	231 (100)
Medianes Alter bei Diagnosestellung in Jahren (Range)	58 (27-85)
Histologie n (%)	
serös	198 (85.7)
muzinös	3 (1.3)
endometrioid	11 (4.8)
undifferenziert	9 (3.9)
klarzellig	1 (0.4)
gemischt epithelilal	9 (3.9)
FIGO-Stadium n (%)	
Stadium II	12 (5.2)

Stadium III	179 (77.5)
Stadium IV	40 (17.3)
Grading n (%)	
G1 – gut differenziert	9 (3.9)
G2 – moderat differenziert	53 (22.9)
G3 – schlecht differenziert	168 (72.7)
Gx – nicht differenziert	1 (0.4)
Lymphknotenstatus n (%)	
N0 (negativ)	107 (56.3)
N1 (positiv)	124 (53.7)
Metastasen n (%)	
M0 (negativ)	189 (81.8)
M1 (positiv)	42 (18.2)
Tumorrest n (%)	
kein residueller Tumorrest	164 (71.0)
<= 0.5 cm	21 (9.1)
0.5 - 1 cm	17 (7.4)
1 - 2 cm	5 (2.2)
> 2 cm	24 (10.4)
Aszitesvolumen n (%)	
kein	51 (22.1)
≤500 ml	94 (40.7)
>500 ml	86 (37.2)
Peritonealkarzinomatose n (%)	
nein	72 (31.2)
ja	159 (68.8)

Seit Januar 2014 existiert eine neue FIGO-Klassifikation für Tumore des Ovars. In dieser Arbeit findet die vorherige Klassifikation Verwendung, welche zum Zeitpunkt der Datenerfassung und -auswertung dem aktuellen Stand entsprach.

4.3 Plasma- und Gewebekonzentrationen von ICAM-1, VCAM-1 und der Ratio ICAM-1/VCAM-1

Tabelle 10: Plasma- und Gewebekonzentrationen von ICAM-1, VCAM-1 und der Ratio ICAM-1/VCAM-1 in ng/ml

	VCAM-1 Plasma ng/ml	ICAM-1 Plasma ng/ml	ICAM-1 Gewebe ng/ml	VCAM-1 Gewebe ng/ml	ICAM-1/ VCAM-1 Plasma	ICAM-1/ VCAM-1 Gewebe
n	152	185	182	182	150	182
Mean	1451.2	353.0	766.5	279.5	0.24	6.94
Median	1384.3	340.1	636.1	202.0	0.23	2.64
Minimum	539.9	135.0	16.7	1.6	0.10	0.64
Maximum	3894.0	966.1	2061.0	1141.4	0.50	495.75

In allen untersuchten Proben im Plasma und Gewebe konnten beide Proteine nachgewiesen werden. Aufgrund der zum Teil fehlenden Gewebeproben oder sehr geringen Mengen war es nicht immer möglich für jede Probe aller vier Messungen durchzuführen. Im Plasma lag der Median der VCAM-1-Konzentration bei 1384,3 ng/ml (Range: 539,9-3894 ng/ml) und der für ICAM-1 bei 340,1 ng/ml (Range: 135-966 ng/ml). Im Gewebe lag der Median für ICAM-1 bei 636,1 (Range: 16,7-2061 ng/ml) und für VCAM-1 bei 202,0 ng/ml (Range: 1,5-1141,4 ng/ml).

Bei der Ratio ICAM-1/VCAM-1 lagen die Werte im Plasma im Median bei 0,24 (Range: 0,1-0,5). Die Werte im Gewebe lagen im Median bei 6,9 (Range: 0,64-495). Tabelle 10 fasst die Plasma- und Gewebekonzentrationen von ICAM-1, VCAM-1 und der Ratio ICAM-1/VCAM-1 in ng/ml zusammen.

4.4 Korrelationen zwischen ICAM-1 und VCAM-1 Expression im Plasma und Gewebe

Aus der Tabelle 11 können die Ergebnisse der Korrelationstestung nach Spearman von Plasma- und Gewebekonzentrationen von ICAM-1, VCAM-1 und der Ratio ICAM-1/VCAM-1 entnommen werden. Zusammenfassend besteht kein Zusammenhang zwischen der ICAM-1 und VCAM-1 Expression im Plasma und im Gewebe. Das bedeutet, dass höhere Konzentrationen im Gewebe nicht mit ebenfalls höheren Konzentrationen im Plasma korrelieren oder andersherum. Es besteht jedoch eine Korrelation zwischen der VCAM-1 und ICAM-1 Expression im Plasma ($p = 0,275$, $p < 0,001$) und der Expression von VCAM-1 und ICAM-1 im Gewebe ($p = 0,62$, $p < 0,0001$). Dieses bedeutet, dass die Höhe der Expression eines Adhäsionsmoleküles mit dem anderen im Plasma miteinander korreliert. Gleiches gilt auch für die Gewebeexpression.

Tabelle 11: Korrelation nach Spearman von Plasma- und Gewebekonzentrationen von ICAM-1, VCAM-1 und der Ratio ICAM-1/VCAM-1. p = p-Wert, KK = Korrelationskoeffizient)

		VCAM-1 Plasma ng/ml	ICAM-1 Plasma ng/ml	ICAM-1 Gewebe ng/ml	VCAM-1 Gewebe ng/ml	ICAM-1/ VCAM-1 Plasma	ICAM-1/ VCAM-1 Gewebe
VCAM-1 Plasma ng/ml	KK	1,0	0,275	- 0,68	- 0,062	- 0,44	- 0,20
	p	-	< 0,001	0,478	0,519	0,1	0,83
ICAM-1 Plasma ng/ml	KK	0,275	1,0	0,163	0,074	0,719	0,034
	p	< 0,001	-	0,058	0,393	0,1	0,727
ICAM-1 Gewebe ng/ml	KK	- 0,068	0,163	1,0	0,62	0,212	0,29
	p	0,478	0,058	-	< 0,0001	0,028	0,2
VCAM-1 Gewebe ng/ml	KK	- 0,062	0,074	0,62	1,0	0,194	- 0,518
	p	0,519	0,393	< 0,0001	-	0,045	0,1
ICAM-1/ VCAM-1 Plasma	KK	- 0,44	0,719	0,212	0,194	1,0	0,021
	p	0,1	0,1	0,028	0,045	-	0,83
ICAM-1/ VCAM-1 Gewebe	KK	- 0,20	0,034	0,29	- 0,518	0,021	1,0
	p	0,83	0,727	0,2	0,1	0,83	-

4.5 Korrelation der ICAM-1- und VCAM-1 Expression und der Ratio ICAM-1/VCAM-1 mit klassischen Prognosefaktoren

Im Folgenden wurden die klassischen Prognosefaktoren das Alter bei Diagnosestellung, FIGO-Stadium, der histologische Subtyp, das Tumorigradung, der postoperative Tumorrest, Aszites, der Lymphknotenstatus, die CA-125-Konzentrationen, der Metastasierungsstatus, das Vorliegen einer Peritonealkarzinose und die Response zu Platinum mit der ICAM-1-, VCAM-1 Expression und der Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma und Gewebe korreliert. Hierfür wurden Gruppenunterschiede zwischen Subgruppen entsprechend der Kategorien der Prognosefaktoren betrachtet. Tabelle 12 fasst die Ergebnisse für die Korrelation der ICAM-1, VCAM-1-Expression und der Ratio ICAM-1/VCAM-1 mit den klassischen Prognosefaktoren zusammen.

Tabelle 12: Korrelation von ICAM-1, VCAM-1 und der Ratio ICAM-1/VCAM-1 mit den klassischen Prognosefaktoren

	VCAM-1 Plasma p-Wert	ICAM-1 Plasma p-Wert	ICAM-1 Gewebe p-Wert	VCAM-1 Gewebe p-Wert	ICAM-1/ VCAM-1 Plasma p-Wert	ICAM-1/ VCAM-1 Gewebe p-Wert
Alter	0,596	0,378	0,036	0,399	0,083	0,231
CA-125	0,985	0,294	0,026	0,311	0,622	0,11
FIGO Stadium II, III, IV	0,976	0,112	0,032	0,201	0,547	0,152
Histologie serös muzinös endometrioid undifferenziert klarzellig gemischt epithelilal	0,665	0,255	0,108	0,566	0,271	0,121
Histologie high grade vs. low grade	0,187	0,796	0,114	0,450	0,097	0,303
Grading G1, G2, G3	0,262	0,640	0,471	0,056	0,236	0,465
Lymphknotenstatus N0 vs. N1	0,442	0,413	0,482	0,982	0,517	0,108
Metastasen M0 vs. M1	0,964	0,239	0,036	0,088	0,391	0,892
postoperativer Tumorrest ja vs. nein	0,548	0,131	0,211	0,072	0,249	0,155
Aszitesvolumen < 500ml vs. > 500ml	0,750	0,179	0,018	0,122	0,550	0,909
Peritonealkarzinomatose ja vs. nein	0,433	0,591	0,125	0,119	0,348	0,774
Response to Platinum positiv vs. negativ	0,602	0,869	0,489	0,634	0,42	0,176

4.5.1 Alter

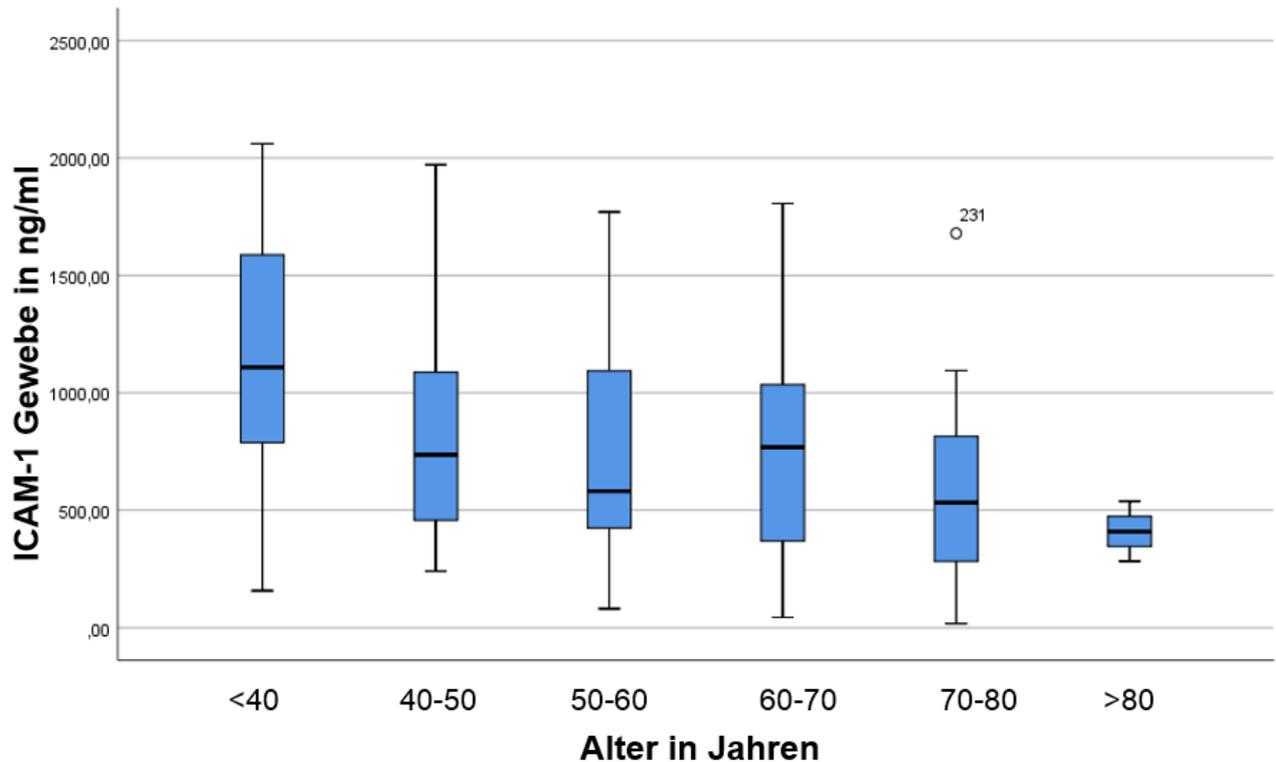


Abbildung 9: Boxplots für die ICAM-1 Expression im Gewebe unterteilt nach Altersklassen: < 40 J., 41-50 J., 51-60 J., 61-70 J., 71-80 J., > 80 J.

Die Unterschiede der Altersgruppen in der ICAM-1-Expression im Gewebe zeigen den Zusammenhang mit dem Alter. Der Unterschiedstest für den Gruppenvergleich zeigt ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,036$). Mit steigendem Alter zeigt sich eine geringere Expression von ICAM-1 im Gewebe ($\rho = -0,155$, $p = 0,036$). So liegt der Median in der Altersgruppe < 40 Jahren bei 1108 ng/ml (Range: 157-2061 ng/ml) und nimmt mit steigendem Alter fast kontinuierlich ab auf 408ng/ml (Range: 283-538 ng/ml) in der Gruppe > 80 Jahren.

4.5.2 CA-125

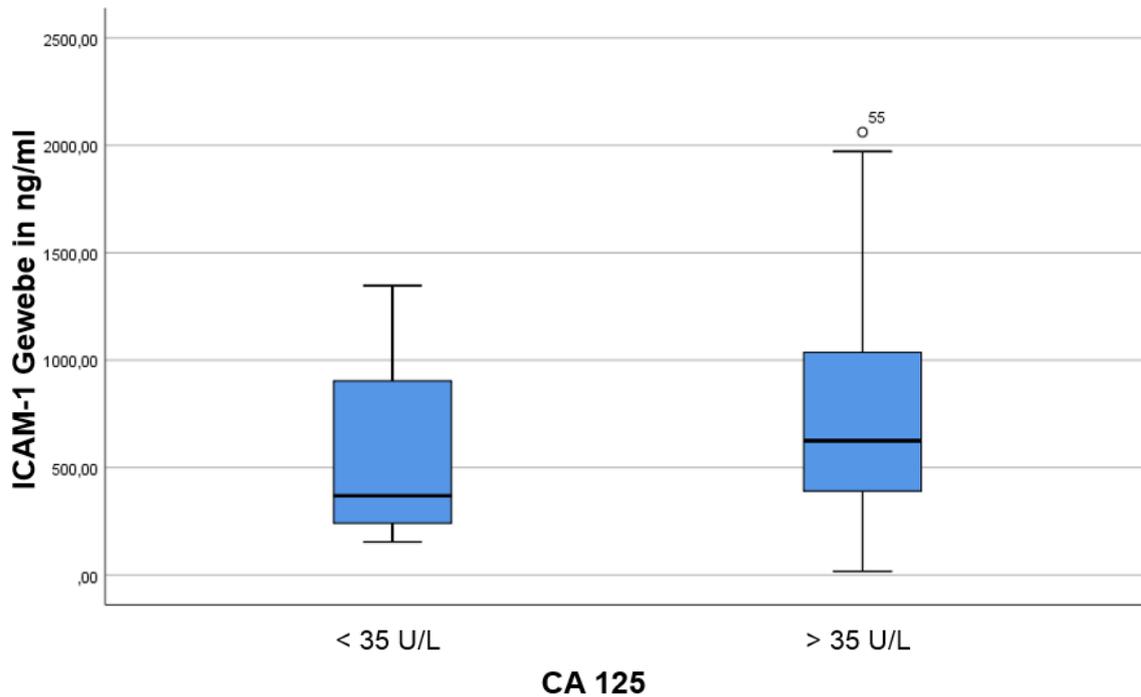


Abbildung 10: Boxplots für die Gruppen mit CA-125 < 35 U/L und > 35 U/L

Die beiden CA-125-Gruppen zeigen einen Zusammenhang mit der ICAM-1-Expression im Gewebe. Der Unterschiedstest für den Gruppenvergleich zeigt ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,026$). Höhere CA-125-Werte korrelieren mit höheren Werten für ICAM-1 ($\rho = 0,17$, $p = 0,026$). In der Gruppe mit CA-125 <35 U/L lag der Median für die ICAM-1-Expression im Gewebe bei 368 ng/ml (Range: 157-2061 ng/ml) und in der Gruppe mit CA-125 >35 U/L lag der Median bei 624 ng/ml (Range: 240-1970 ng/ml).

4.5.3 FIGO-Stadium

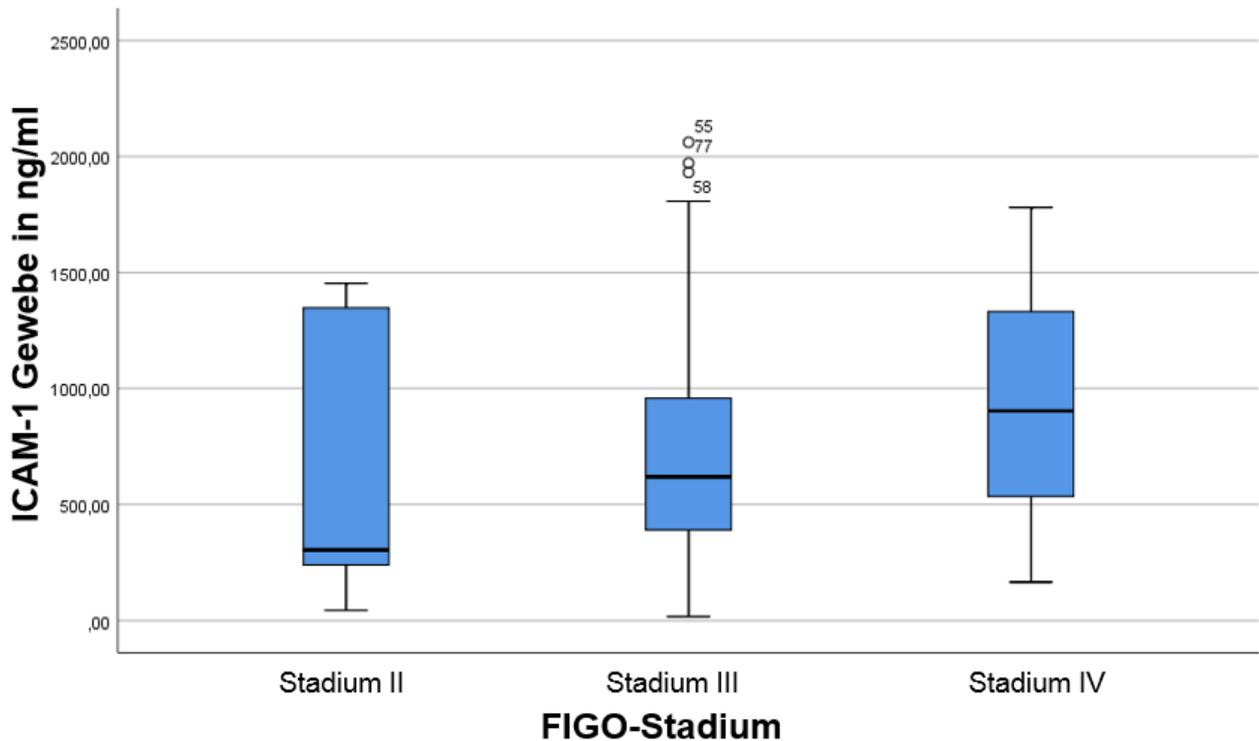


Abbildung 11: Boxplots für die Gruppen FIGO-Stadium II, III und IV

Bei den paarweisen Vergleichen zeigte sich lediglich für ICAM-1-Gewebe ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im FIGO-Stadium IV und II ($p = 0,011$) und zwischen den Gruppen FIGO-Stadium IV und FIGO-Stadium III ($p = 0,036$). Beim Vergleich von mehreren Gruppen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen ($p=0,032$). Hier zeigte sich eine höhere ICAM-1-Expression mit fortgeschrittenerem FIGO-Stadium. So lag der Median der ICAM-1-Expression im FIGO Stadium II bei 304 ng/ml (Range: 43-1453 ng/ml), im Stadium III bei 619 ng/ml (Range: 16-2061 ng/ml) und im Stadium IV bei 903ng/ml (Range: 165-1779 ng/ml).

4.5.4 Aszites

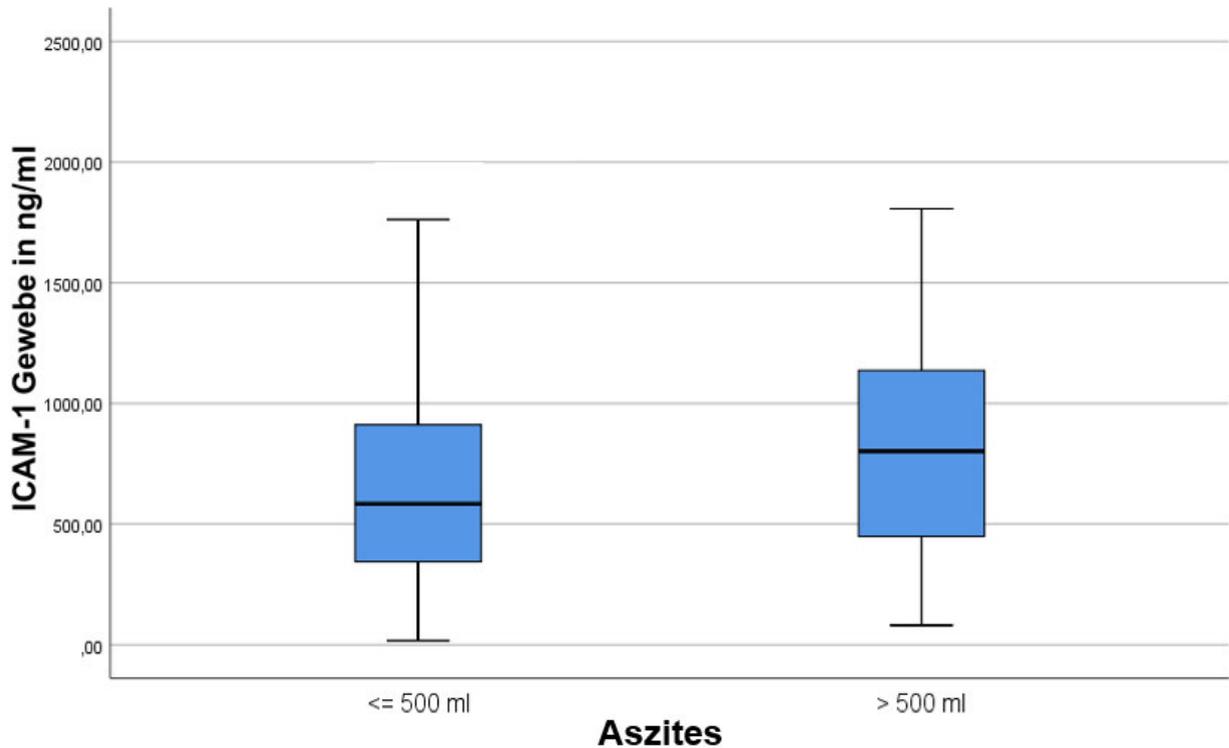


Abbildung 12: Boxplots für die Gruppen mit Aszites < 500ml und > 500ml

Die Unterschiede der Aszites-Gruppen in der ICAM-1-Expression im Gewebe zeigen einen Zusammenhang mit der Aszitesmenge. Der Unterschiedstest für den Gruppenvergleich zeigt ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,018$). Bei Patientinnen mit größeren Aszitesmengen > 500 ml zeigten sich höhere Werte für ICAM-1. So lag der Median für die ICAM-1-Expression in der Gruppe mit Aszites < 500 ml bei 583 ng/ml (Range: 539-2903 ng/ml) und in der Gruppe > 500 ml bei 802 ng/ml (Range: 800-3894 ng/ml).

4.5.5 Metastasen

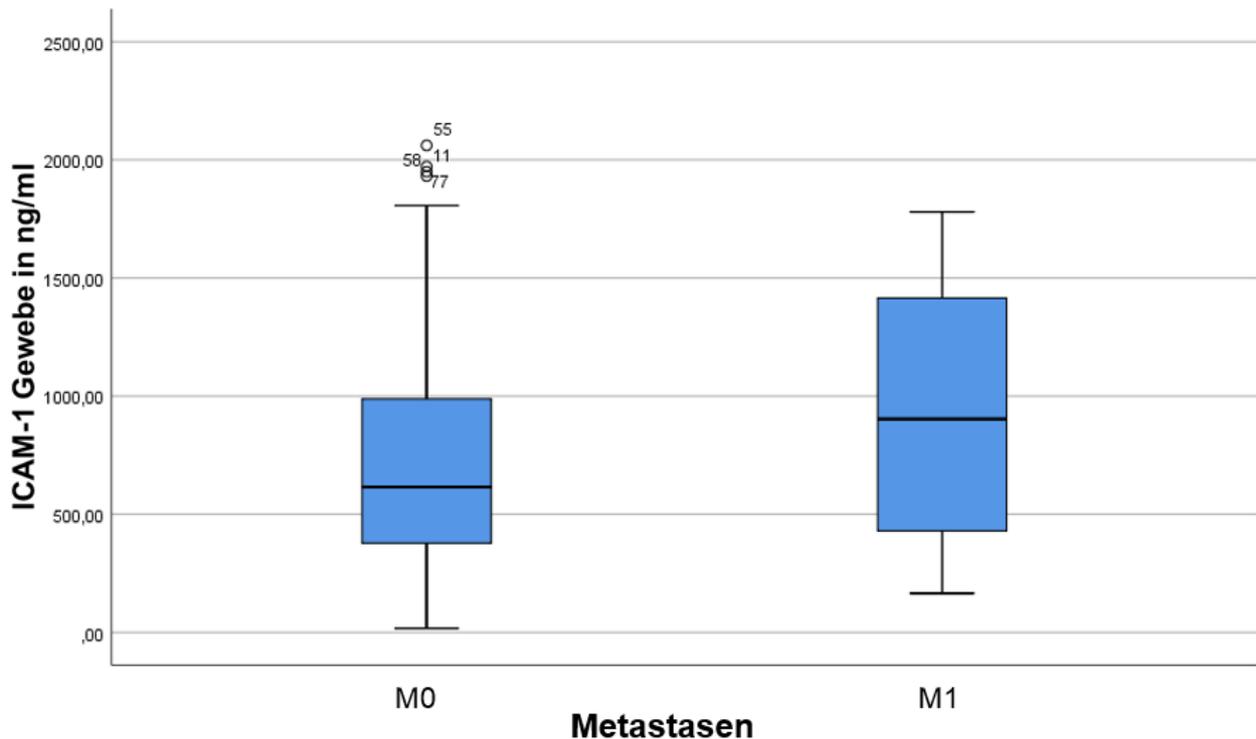


Abbildung 13: Boxplots für die Gruppen mit Metastasen (M1) und ohne nachgewiesene Metastasen (M0)

Die Unterschiede der Gruppen mit (M1) und ohne (M0) Metastasen in der ICAM-1-Expression im Gewebe zeigen den Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Metastasen. Der Unterschiedstest für den Gruppenvergleich zeigt ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,036$). Bei Vorhandensein von Metastasen (M1) zeigten sich höhere ICAM-1-Werte im Median 611 ng/ml (Range: 805-3894 ng/ml) im Vergleich zu Patientinnen ohne nachweisbare Metastasen (M0) Median 903 ng/ml (Range: 539-2253 ng/ml).

4.5.6 Histologischer Subtyp

Bei den histologischen Subtypen zeigte sich lediglich beim paarweisen Vergleich für ICAM-1 im Gewebe zwischen undifferenziert und muzinösem Typ ein signifikanter Unterschied ($p = 0,035$) und zwischen undifferenziertem und endometrioiden ($p = 0,028$). Beim Vergleich der Histotypen mit der Einteilung HGSOC und LGSOC ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

4.6 Überlebensanalysen

Am Ende der Studie und Follow-up-Periode von max. 72 Monaten waren 48 % aller Patientinnen verstorben. Das mediane Gesamtüberleben (OS) lag bei 48 Monaten (95 %-KI: 40,9-55,0 Monate).

Das mediane progressionsfreie Überleben (PFS) lag bei 18 Monaten (95 %-KI: 15,4-20,6 Monate). Für die untersuchten Biomarker, ICAM-1 und VCAM-1, gibt es keine etablierten Normwerte für Patientinnen mit EOC. Mit Hilfe eines Softwarealgorithmus, dem Cutoff-Wert-Finder, wurden Cutoff-Werte für die beiden Biomarker und deren Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Gewebe und im Plasma für das OS und für das PFS bestimmt.

4.7 Ergebnisse der Cutoff-Wertfindung durch den Cutoff-Finder

Mit der Hilfe des Cutoff-Wert-Finder konnten die unten genannten Cutoff-Werte berechnet werden. Die p-Werte beziehen sich auf den jeweiligen Gruppenvergleich und wurden mit dem Log-Rank-Test ermittelt.

Cutoffwerte für das Gesamtüberleben

Hierbei konnte für das OS für ICAM-1, VCAM-1 und die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma und Gewebe signifikante Cutoff-Werte etabliert werden ($p < 0,05$). Für VCAM-1 im Gewebe und die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma erfolgte eine Einteilung in zwei Gruppen mit 1. niedriger und 2. hoher Expression (1. < 454 ng/ml und 2. > 454 ng/ml ($p < 0,0001$) bzw. 1. $< 0,285$ ng/ml und 2. $> 0,285$ ng/ml ($p < 0,017$)). Für VCAM-1 im Plasma, ICAM-1 im Gewebe und die Ratio ICAM-1/VCAM-1 war sogar eine Einteilung in drei Gruppen möglich mit 1. niedriger, 2. mittlerer und 3. hoher Expression (1. < 1614 ng/ml, 2. $1614-1970$ ng/ml, 3. > 1970 ($p = 0,045$) bzw. 1. < 755 ng/ml, 2. $755-945$ ng/ml, 3. > 945 ng/ml ($p = 0,018$) bzw. 1. $< 3,04$ ng/ml, 2. $3,04-5,25$ ng/ml, 3. $> 5,25$ ng/ml ($p = 0,035$)). Eine Ausnahme bildet hier lediglich das ICAM-1 im Plasma, da hierfür keine signifikanten Cutoffwert etabliert werden konnten.

Cutoffwerte für das progressionsfreie Überleben

Für das PFS konnten lediglich für das VCAM-1 im Gewebe mit 1. niedriger, 2. mittlerer und 3. hoher Expression (1. < 88 ng/ml, 2. $88-380$ ng/ml, 3. > 380 ng/ml ($p = 0,003$)) und für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma mit 1. niedriger und 2. hoher Expression (1. $< 0,265$ ng/ml, 2. $> 0,265$ ng/ml ($p = 0,03$)) Cutoffwerte etabliert werden.

Tabelle 13 fasst die Ergebnisse der Cutoff-Werteberechnung mittels Cutoffwert-Finder für ICAM-1, VCAM-1 und die Ratio ICAM-1/VCAM-1 für das OS und PFS zusammen.

Tabelle 13: Ergebnisse der Cutoff-Werteberechnung mittels Cutoffwert-Finder für ICAM-1, VCAM-1 und die Ratio ICAM-1/VCAM-1 für das OS und PFS

	Gesamtüberleben (OS)				Progressionsfreies Überleben (PFS)			
	n	Cutoff ng/ml	Median in Monaten (95 %-KI)	p-Wert	n	Cutoff ng/ml	Median in Monaten (95 %-KI)	p-Wert
VCAM-1	152	< 1614	(41,0-71,1)	0,045	152	< 1265	(7,5-20,4)	0,114

Plasma								
		1614-1970	(27,3-50,8)			1265-1970	(12,1-17,8)	
		> 1970	(0-55,3)			> 1970	(6,4-11,54)	
ICAM-1 Plasma	185	< 250	(48,8-79,2)	0,09	185	< 322	(8,8-15,2)	0,089
		> 250	(37,6-50,4)			322-495	(10,2-19,7)	
						> 495	(3,7-16,3)	
VCAM-1 Gewebe	182	< 454	(44,5-67,5)	< 0,0001	182	< 88	(1,4-88,5)	0,003
		> 454	(26,7-41,3)			88-380	(6,6-17,3)	
						> 380	(7,2-10,7)	
ICAM-1 Gewebe	182	< 755	(30,5-63,5)	0,018	182	< 200	(0-53,6)	0,065
		755-945	(30,5-63,5)			200-670	(7,9-18,0)	
		> 945	(29,3-48,7)			> 670	(6,8-11,2)	
Ratio ICAM-1/VCAM-1 Plasma	150	< 0,285	(36,6-51,4)	0,017	150	< 0,265	(9,03-14,97)	0,03
		> 0,285				> 0,265	(8,97-29,03)	
Ratio ICAM-1/VCAM-1 Gewebe	182	< 3,04	(33,88-46,12)	0,035	182	< 3,04	(7,33-12,66)	0,19
		3,04-5,25	(45,04-66,97)			> 3,04	(8,48-23,52)	
		> 5,25						

4.8 Kaplan-Meier-Kurven

4.8.1 Gesamtüberleben

4.8.1.1 VCAM-1 Plasma

Für die VCAM-1-Expression im Plasma erfolgte eine Einteilung in drei Gruppen abhängig von der Höhe der Proteinexpression. 1. niedrige (< 1614 ng/ml), 2. mittlere (1614-1970 ng/ml) und 3. hohe (> 1970 ng/ml) Expression. Patientinnen mit niedrigen VCAM-1-Konzentrationen (< 1614 ng/ml) überlebten im Median 56 Monate (95 %-KI: 40,9-71,1). Die Patientinnen in der Gruppe mit mittlerer Expression (1614-1970 ng/ml) überlebten im Median 39 Monate (95 %-KI: 27,2-50,8) und die Patientinnen in der Gruppe hoher Expression (> 1970 ng/ml) überlebten im Median 18 Monate (95 %-KI: 0-55,3). Abbildung 14 zeigt die Kurven für das OS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der VCAM-1 Expression in drei Gruppen im Plasma. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-

Rank-Test zeigten sich zwischen diesen drei Gruppen signifikante Unterschiede ($p = 0,045$) für das OS. Zusammenfassend war das OS besser, je geringer die VCAM-1-Expression. Es zeigte sich damit ein Überlebensvorteil für Patientinnen mit geringerer VCAM-1-Expression.

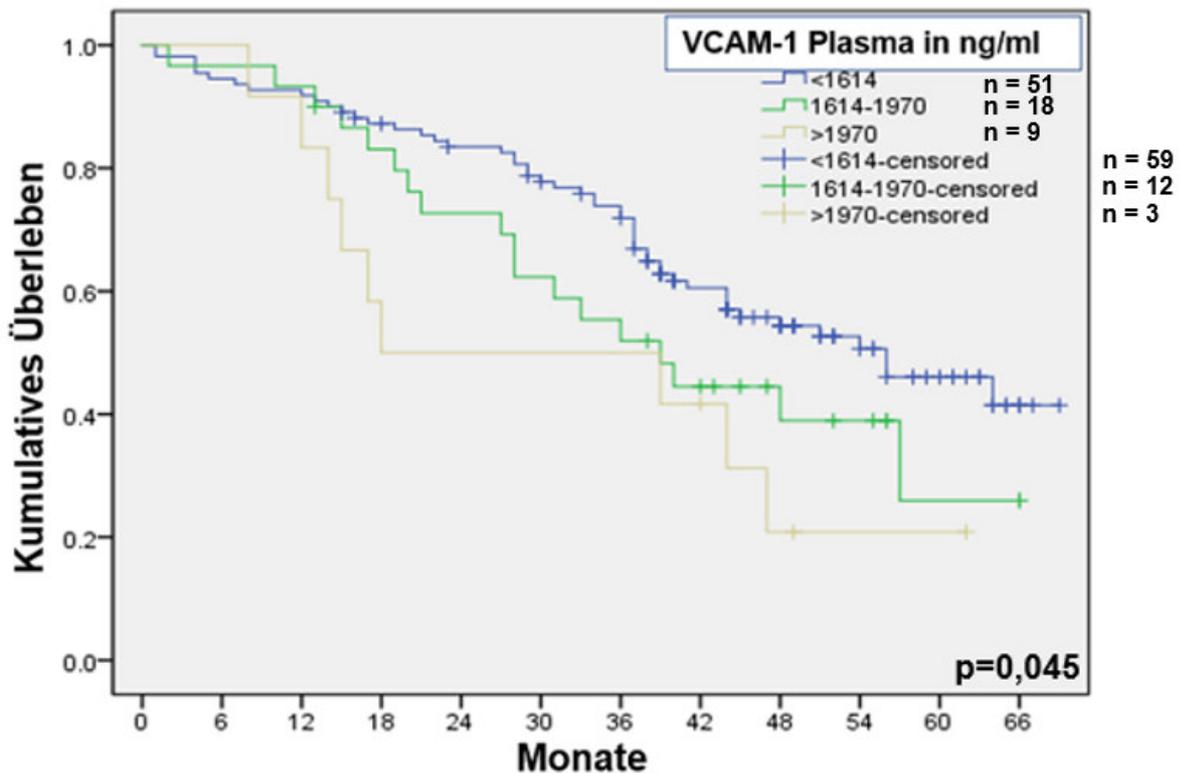


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der VCAM-1-Expression im Plasma. 1. niedrige (< 1614 ng/ml), 2. mittlere (1614-1970 ng/ml) und 3. hohe (> 1970 ng/ml) ICAM-1-Expression

4.8.1.2 ICAM-1 Plasma

Für die ICAM-1 Expression im Plasma erfolgte eine Einteilung in zwei Gruppen abhängig von der Höhe der Proteinexpression. 1. niedrige (< 250 ng/ml) und 2. hohe (> 250 ng/ml) Expression. Patientinnen mit niedrigen ICAM-1-Konzentrationen (< 250 ng/ml) überlebten im Median 64 Monate (95 %-KI: 48,8-79,2) und die Patientinnen mit hohen Konzentrationen (> 250 ng/ml) überlebten im Median 44 Monate (95 %-KI: 37,6-50,4). Abbildung 15 zeigt die Kurven für das OS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der ICAM-1 Expression in zwei Gruppen im Plasma. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-Rank-Test war der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen am Ende der Follow-up-Zeit für das OS jedoch nicht signifikant ($p = 0,09$).

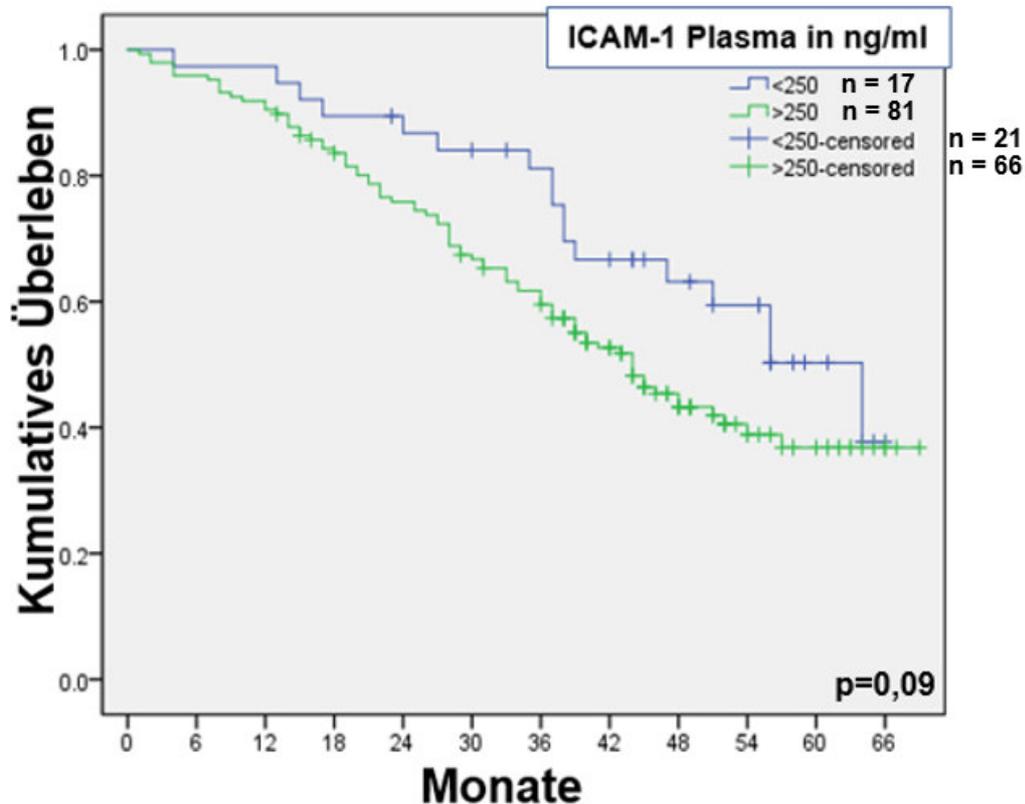


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1-Expression im Plasma. 1. niedrige (< 250 ng/ml) und 2. hohe (> 250 ng/ml) ICAM-1-Expression

4.8.1.3 VCAM-1 Gewebe

Für die VCAM-1 Expression im Gewebe erfolgte eine Einteilung in zwei Gruppen abhängig von der Höhe der Proteinexpression. 1. niedrige (< 454,5 ng/ml) und 2. hohe (> 454,5 ng/ml) Expression. Patientinnen mit niedrigen VCAM-1-Konzentrationen (< 454,5 ng/ml) überlebten im Median 56 Monate (95 %-KI: 44,5-67,5) und Patientinnen mit hohen (> 454,5 ng/ml) Konzentrationen überlebten im Median 34 Monate (95 %-KI: 26,7-41,3). Abbildung 16 zeigt die Kurven für das OS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der VCAM-1-Expression in zwei Gruppen im Gewebe. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-Rank-Test zeigten sich zwischen diesen beiden Gruppen signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) für das OS. Zusammenfassend war das OS besser, je geringer die VCAM-1-Expression.

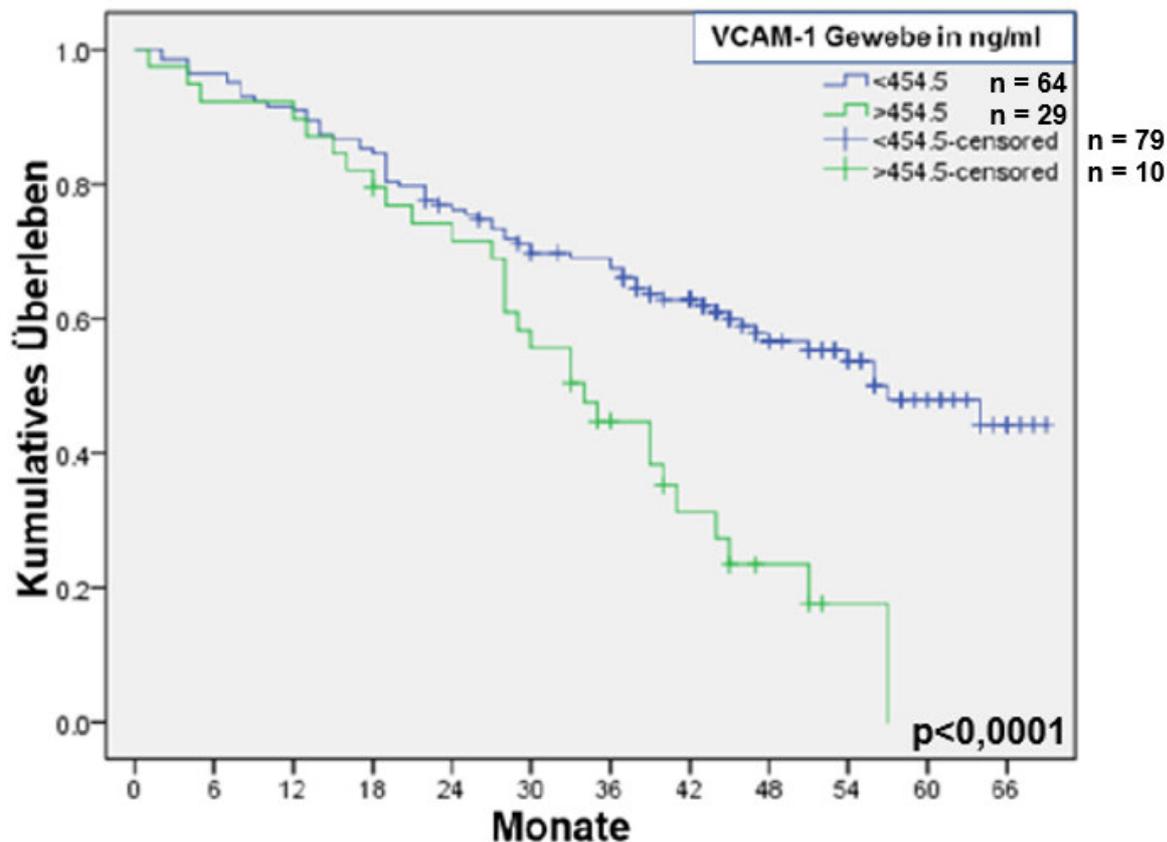


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der VCAM-1-Expression im Gewebe. 1. niedrige (< 454,5 ng/ml) und 2. hohe (> 454,5 ng/ml) VCAM-1-Expression

4.8.1.4 ICAM-1 Gewebe

Für die ICAM-1-Expression im Gewebe erfolgte eine Einteilung in drei Gruppen abhängig von der Höhe der Proteinexpression. 1. niedrige (< 755 ng/ml), 2. mittlere (> 755-945 ng/ml) und 3. hohe (> 945 ng/ml) Expression. Patientinnen mit niedrigen ICAM-1-Konzentrationen (< 755,2 ng/ml) überlebten im Median 57 Monate (95 %-KI: 40,5-62,5). Patientinnen in der mittleren Gruppe (755-945 ng/ml) überlebten im Median 47 Monate (95 %-KI: 30,5-63,5) und Patientinnen in der Gruppe mit hoher Expression (> 945 ng/ml) überlebten im Median 39 Monate (95 %-KI: 29,3-48,7). Abbildung 17 zeigt die Kurven für das OS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der ICAM-1-Expression in zwei Gruppen im Gewebe. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-Rank-Test zeigten sich zwischen diesen drei Gruppen signifikante Unterschiede ($p = 0,018$) für das OS. Zusammenfassend zeigt sich damit ein Überlebensvorteil für Patientinnen mit geringerer ICAM-1-Expression.

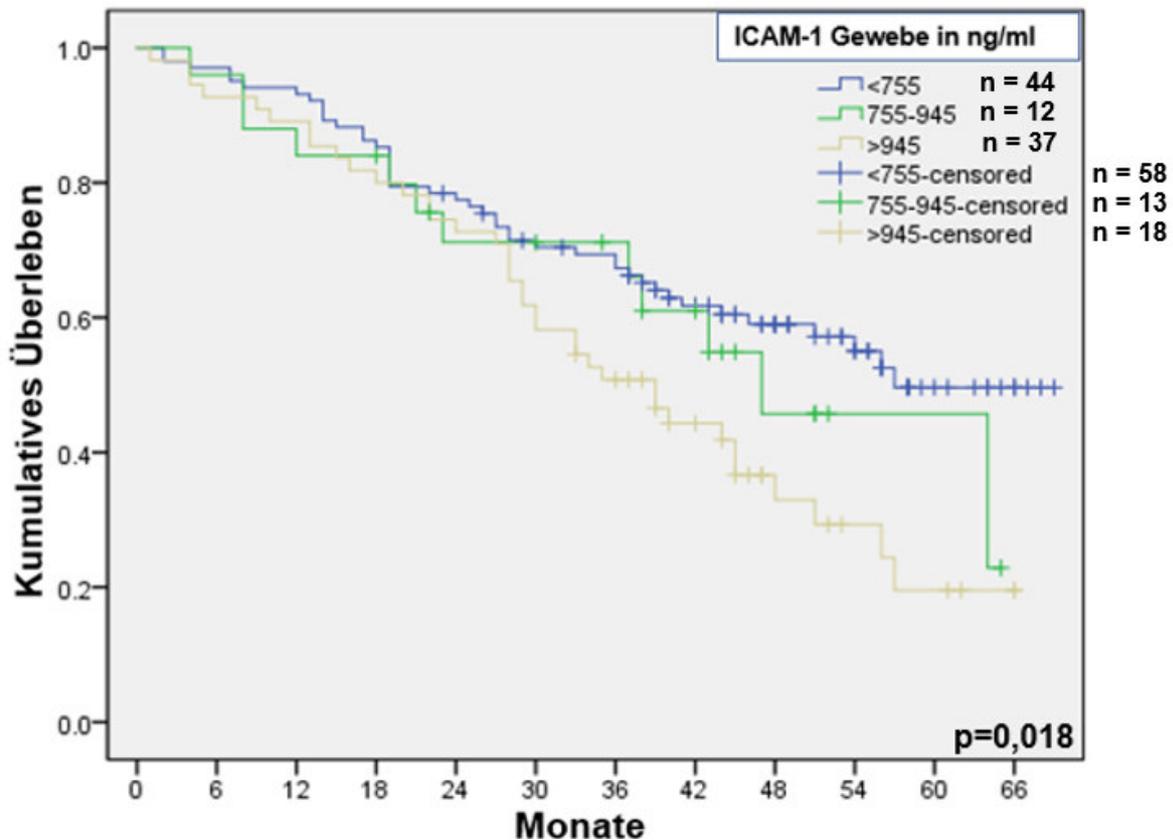


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1-Expression im Gewebe. 1. niedrige (< 755 ng/ml), 2. mittlere (> 755-945 ng/ml) und 3. hohe (> 945 ng/ml) ICAM-1-Expression

4.8.1.5 Ratio ICAM-1/VCAM-1 Plasma

Für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma erfolgte eine Einteilung in zwei Gruppen. 1. niedrige (< 0,285) und 2. hohe (> 0,285) Ratio. Patientinnen in der Gruppe 1 überlebten im Median 44 Monate (95 %-KI: 36,6-51,4) und Patientinnen in der Gruppe 2 überlebten im Median 48 Monate (95 %-KI: 38,4-57,6). Abbildung 18 zeigt die Kurven für das OS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio in zwei Gruppen im Plasma. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-Rank-Test zeigten sich zwischen diesen beiden Gruppen signifikante Unterschiede ($p < 0,017$) für das OS. Zusammenfassend war das OS besser, je größer die Ratio.

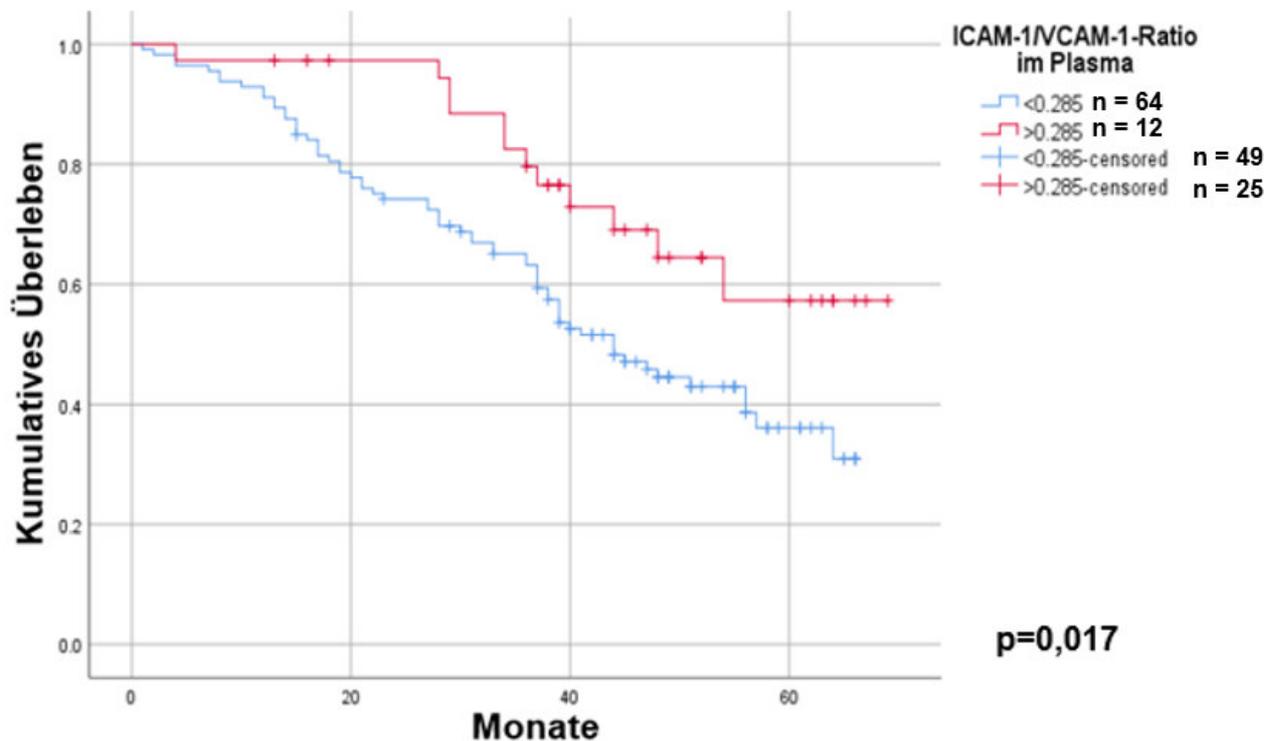


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio im Plasma. 1. niedrige (< 0,285) und 2. hohe (> 0,285) Ratio

4.8.1.6 Ratio ICAM-1/VCAM-1 Gewebe

Für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Gewebe erfolgte eine Einteilung in drei Gruppen. 1. niedrige (< 3,04), 2. mittlere (3,04-5,25) und 3. hohe (> 5,25) Ratio. Patientinnen in der Gruppe 1 überlebten im Median 40 Monate (95 %-KI: 33,-46,1). Patientinnen in der Gruppe 2 überlebten im Median 56 Monate (95 %-KI: 45,0-67,1) und in der Gruppe 3 im Median 60 Monate (95 %-KI: 50,0-67,1). Abbildung 19 zeigt die Kurven für das OS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio in drei Gruppen im Gewebe. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-Rank-Test zeigten sich zwischen diesen drei Gruppen signifikante Unterschiede ($p < 0,035$) für das OS. Zusammenfassend war das OS besser, je größer die Ratio.

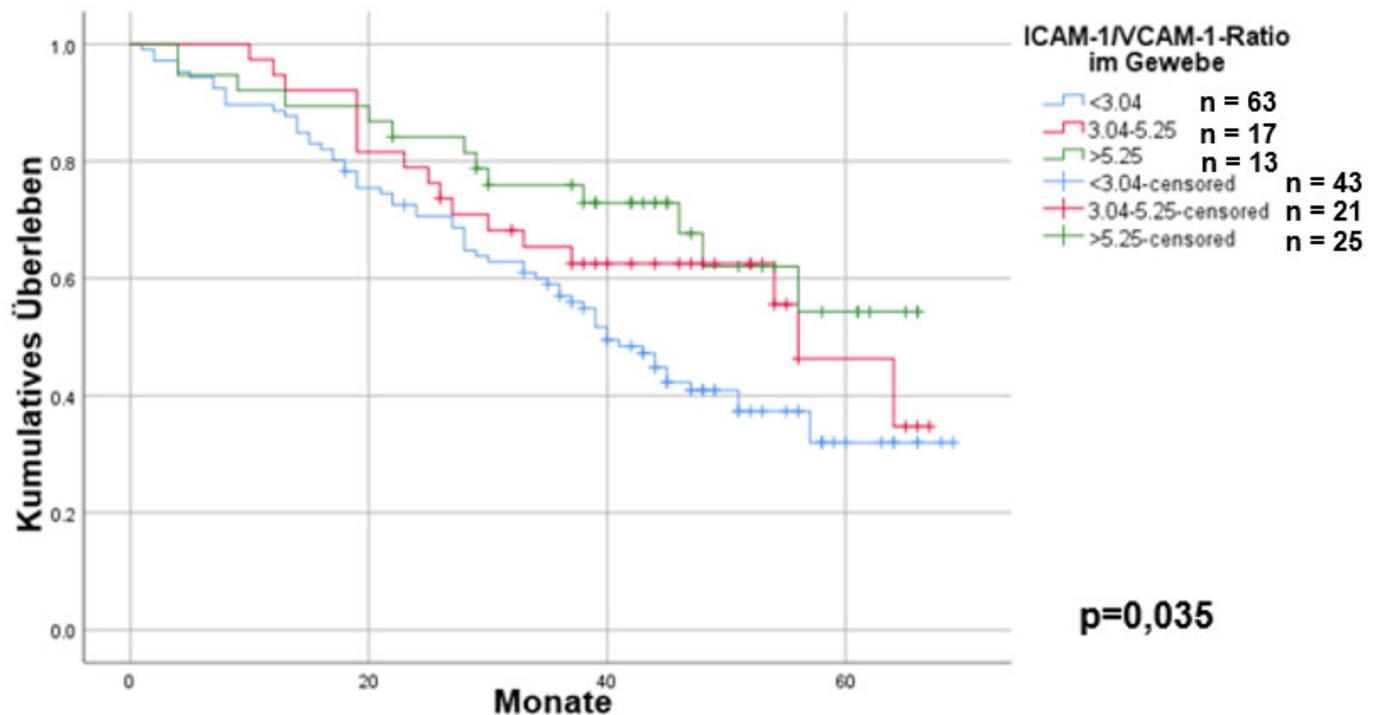


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio im Gewebe. 1. niedrige (< 3,04), 2. mittlere (3,04-5,25) und 3. hohe (> 5,25) Ratio

4.8.2 Progressionsfreies Überleben

4.8.2.1 VCAM-1 Plasma

Für die VCAM-1 Expression im Plasma erfolgte eine Einteilung in drei Gruppen abhängig von der Höhe der Proteinexpression. 1. niedrige (< 1265 ng/ml), 2. mittlere (1265-1970 ng/ml) und 3. hohe (> 1970ng/ml) Expression. Bei Patientinnen mit niedrigen VCAM-1-Konzentrationen (< 1265ng/ml) lag das PFS im Median bei 14 Monaten (95 %-KI: 7,5-20,5). Das PFS für Patientinnen mit mittlerer Konzentration (1265-1970 ng/ml) lag im Median bei 15 Monaten (95 %-KI: 12,2-17,8) und für Patientinnen in der Gruppe mit hoher Konzentration (> 1970 ng/ml) bei im Median 9 Monaten (95 %-KI: 6,5-11,5). Abbildung 20 zeigt die Kurven für das PFS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der VCAM-1 Expression in drei Gruppen im Plasma. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-Rank-Test zeigten sich zwischen diesen drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,114$) für das PFS.

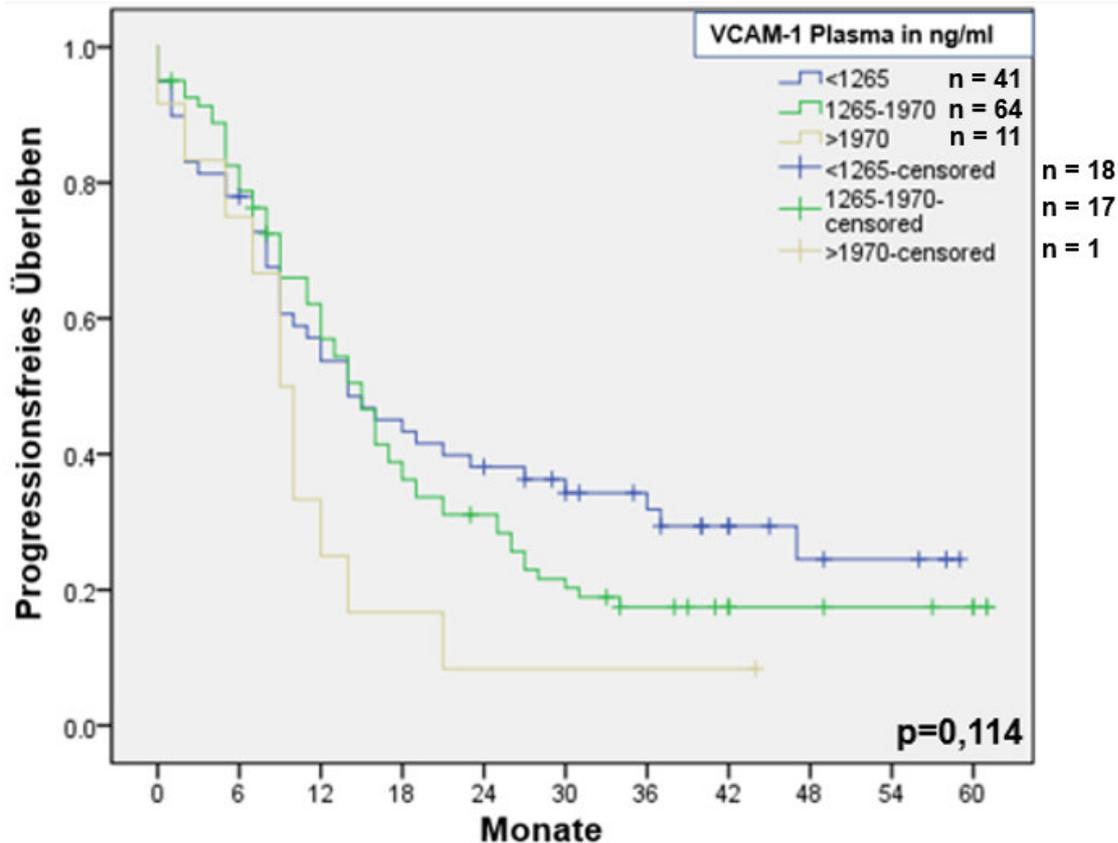


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der VCAM-1-Expression im Plasma. 1. niedrige (< 1265 ng/ml), 2. mittlere (1265-1970 ng/ml) und 3. hohe (> 1970 ng/ml) VCAM-1-Expression

4.8.2.2 ICAM-1 Plasma

Für die ICAM-1 Expression im Plasma erfolgte eine Einteilung in drei Gruppen abhängig von der Höhe der Proteinexpression. 1. niedrige (< 322,5 ng/ml), 2. mittlere (322,5-495 ng/ml) und 3. hohe (> 495 ng/ml) Expression. Bei Patientinnen mit niedrigen ICAM-1-Konzentrationen (< 322,5 ng/ml) lag das PFS im Median bei 12 Monaten (95 %-KI: 8,8-15,2). Das PFS für Patientinnen in der mittleren Gruppe (322,5-495 ng/ml) lag im Median bei 15 Monaten (95 %-KI: 10,3-19,7) und für Patientinnen in der hohen Gruppe (> 495 ng/ml) bei im Median bei 10 Monaten (95 %-KI: 3,7-16,3). Abbildung 21 zeigt die Kurven für das PFS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der ICAM-1-Expression in drei Gruppen im Plasma. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-Rank-Test zeigten sich zwischen diesen drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,089$) für das PFS.

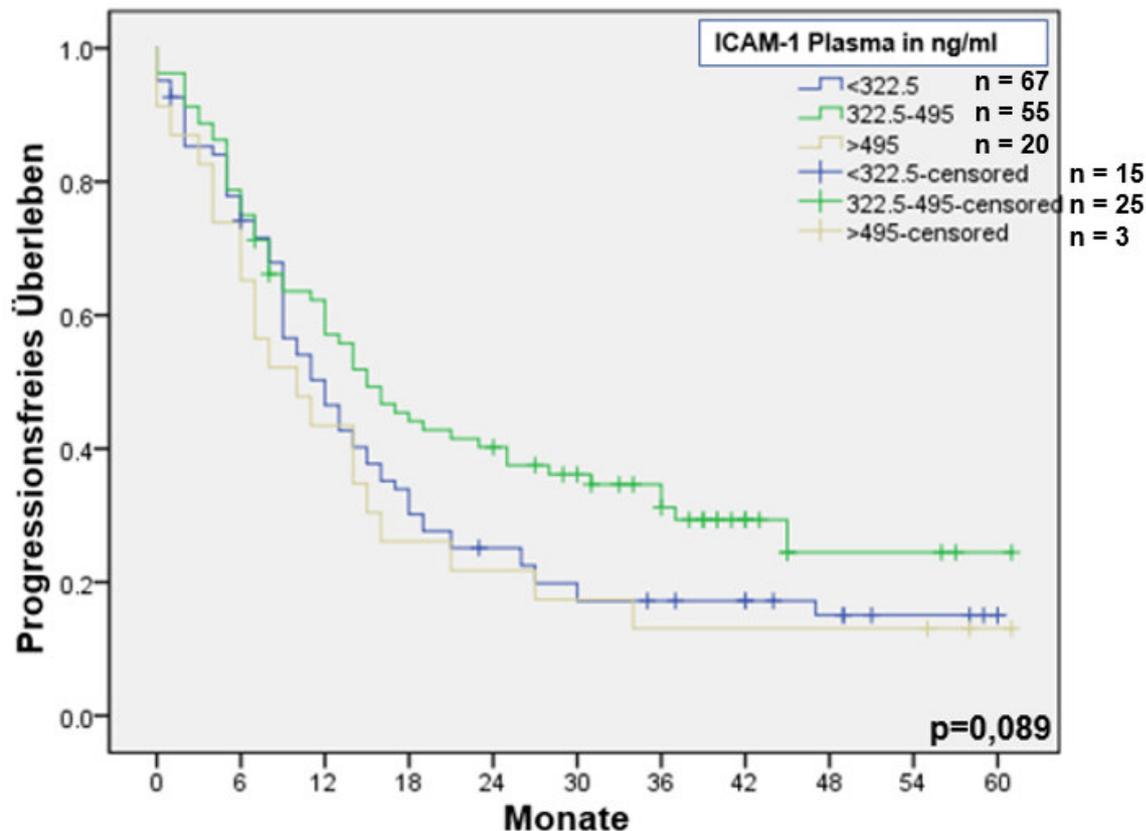


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1-Expression im Plasma. 1. niedrige (< 322,5 ng/ml), 2. mittlere (322,5-495 ng/ml) und 3. hohe (> 495 ng/ml) ICAM-1- Expression

4.8.2.3 ICAM-1 Gewebe

Für die ICAM-1 Expression im Gewebe erfolgte eine Einteilung in drei Gruppen abhängig von der Höhe der Proteinexpression. 1. niedrige (< 200 ng/ml), 2. mittlere (200-670 ng/ml) und 3. hohe (> 670 ng/ml) Expression. Bei Patientinnen mit niedrigen ICAM-1-Konzentrationen (< 200 ng/ml) lag das PFS im Median bei 25 Monaten (95 %-KI: 0-53,6). Das PFS für Patientinnen in der Gruppe mit mittlerer Expression (200-670 ng/ml) lag im Median bei 13 Monaten (95 %-KI: 8,1-18,0) und für Patientinnen in der Gruppe mit hoher Expression (> 670ng/ml) bei im Median bei 9 Monaten (95 %-KI: 6,8-11,2). Abbildung 22 zeigt die Kurven für das PFS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der ICAM-1 Expression in drei Gruppen im Gewebe. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-Rank-Test zeigten sich zwischen diesen drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,065$) für das PFS.

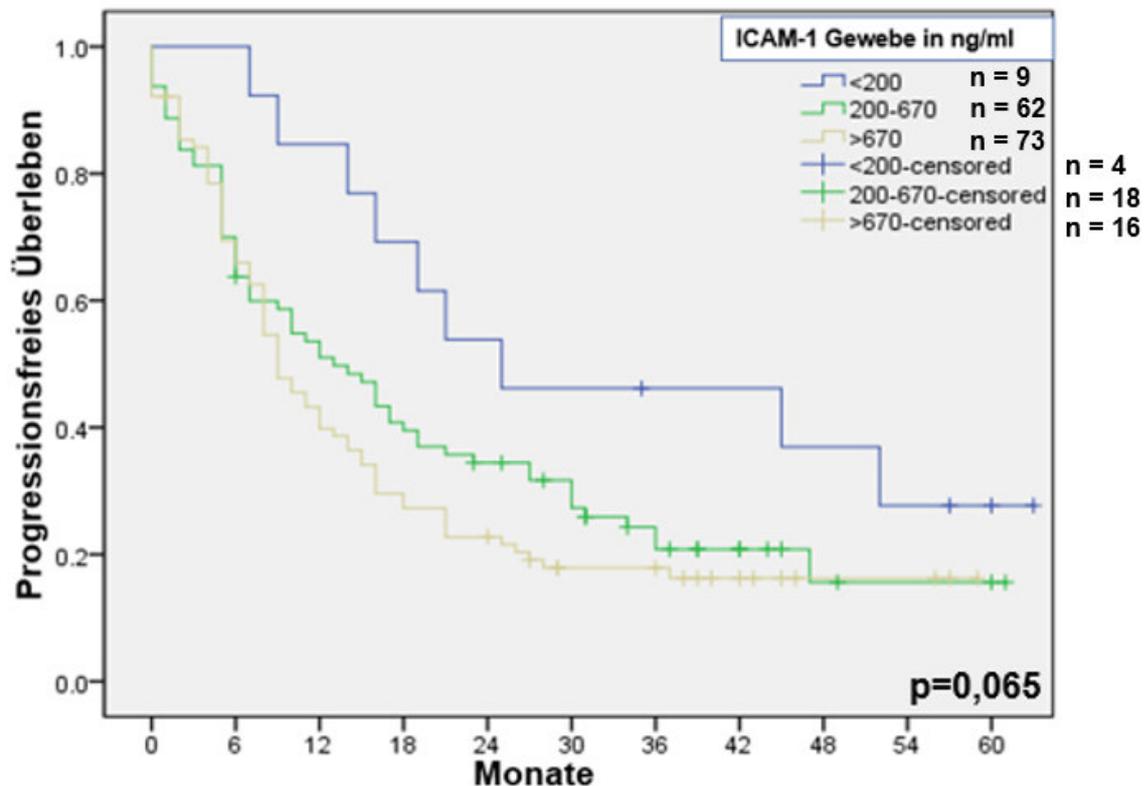


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1-Expression im Gewebe. 1. niedrige (< 200 ng/ml), 2. mittlere (200-670 ng/ml) und 3. hohe (> 670 ng/ml) ICAM-1-Expression

4.8.2.4 VCAM-1 Gewebe

Für die VCAM-1 Expression im Gewebe erfolgte eine Einteilung in drei Gruppen abhängig von der Höhe der Proteinexpression. 1. niedrige (< 88 ng/ml), 2. mittlere (88-380 ng/ml) und 3. hohe (> 380 ng/ml) Expression. Bei Patientinnen mit niedrigen VCAM-1-Konzentrationen (< 88 ng/ml) lag das PFS im Median bei 45 Monaten (95 %-KI: 1,5-88,5). Das PFS für Patientinnen in der Gruppe mit mittlerer Expression (88-380 ng/ml) lag im Median bei 12 Monaten (95 %-KI: 6,6-17,4) und für Patientinnen in der Gruppe mit hoher Expression (> 380 ng/ml) bei im Median bei 9 Monaten (95 %-KI: 7,3-10,7). Abbildung 23 zeigt die Kurven für das PFS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der VCAM-1-Expression in drei Gruppen im Gewebe. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-Rank-Test zeigten sich zwischen diesen drei Gruppen signifikante Unterschiede ($p = 0,03$) für das PFS. Hierbei war das PFS besser, je niedriger die Expression.

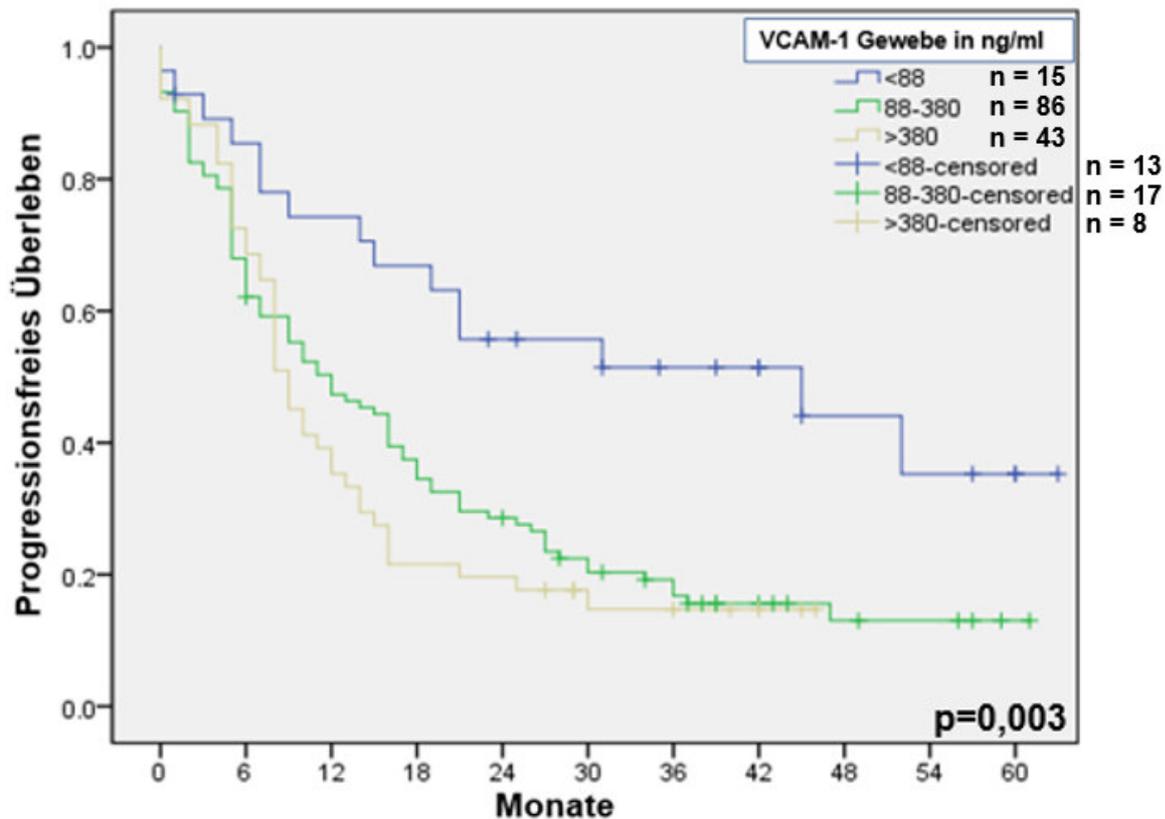


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der VCAM-1-Expression im Gewebe. 1. niedrige (< 88 ng/ml), 2. mittlere (88-380 ng/ml) und 3. hohe (>380 ng/ml) VCAM-1-Expression

4.8.2.5 Ratio ICAM-1/VCAM-1 Plasma

Für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma erfolgte eine Einteilung in zwei Gruppen.

1. niedrige (< 0,265) und 2. hohe (> 0,265) Ratio. Bei Patientinnen in der Gruppe 1 lag das PFS im Median bei 12 Monaten (95 %-KI: 9,0-15,1) und Patientinnen in der Gruppe 2 im Median bei 19 Monaten (95 %-KI: 9,1-29,0). Abbildung 24 zeigt die Kurven für das PFS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio in zwei Gruppen im Plasma. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-Rank-Test zeigten sich zwischen diesen beiden Gruppen signifikante Unterschiede ($p = 0,03$) für das PFS. Zusammenfassend war das PFS besser, je größer die Ratio.

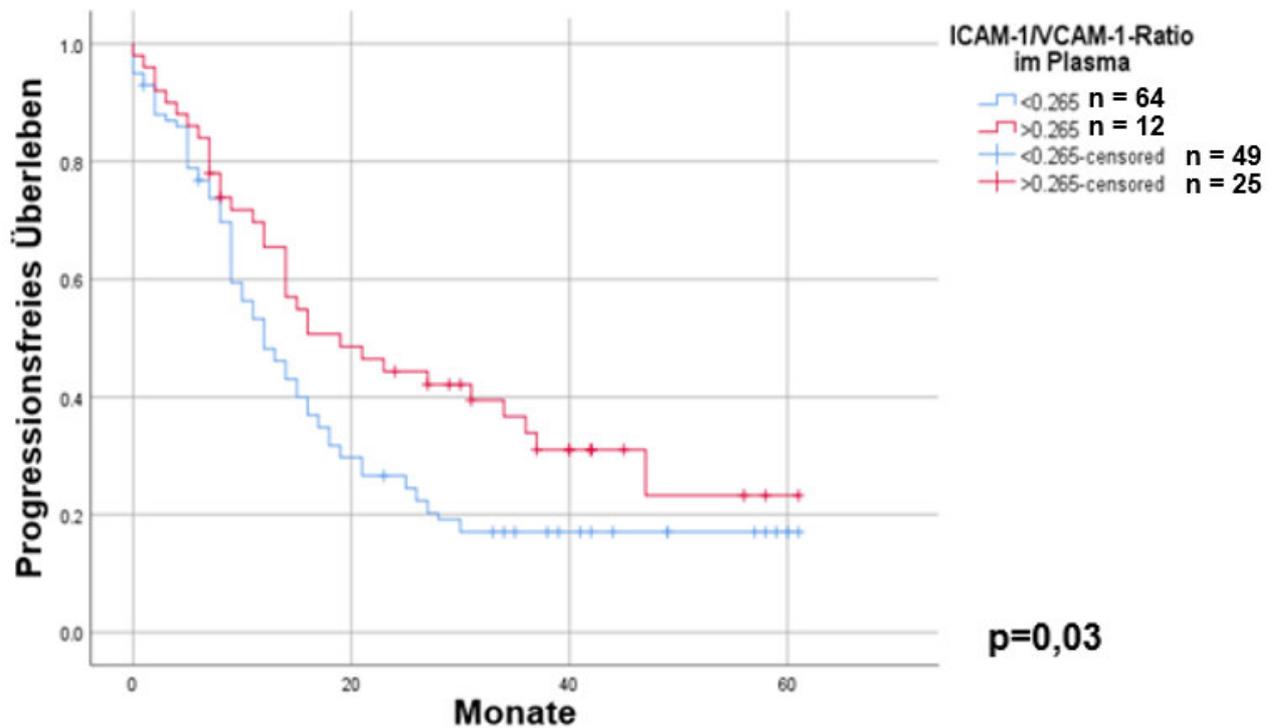


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio im Plasma. 1. niedrige ($< 0,265$) und 2. hohe ($> 0,265$) Ratio

4.8.2.6 Ratio ICAM-1/VCAM-1 Gewebe

Für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Gewebe erfolgte eine Einteilung in zwei Gruppen. 1. niedrige ($< 3,04$) und 2. hohe ($> 3,04$) Ratio. Bei Patientinnen in der Gruppe 1 lag das PFS im Median bei 10 Monaten (95 %-KI: 7,3-12,6) und Patientinnen in der Gruppe 2 im Median bei 16 Monaten (95 %-KI: 8,5-23,5). Abbildung 25 zeigt die Kurven für das PFS nach Kaplan-Meier unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio in 2 Gruppen im Gewebe. In der Signifikanzuntersuchung nach dem Log-Rank-Test zeigten sich zwischen diesen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,189$) für das PFS.

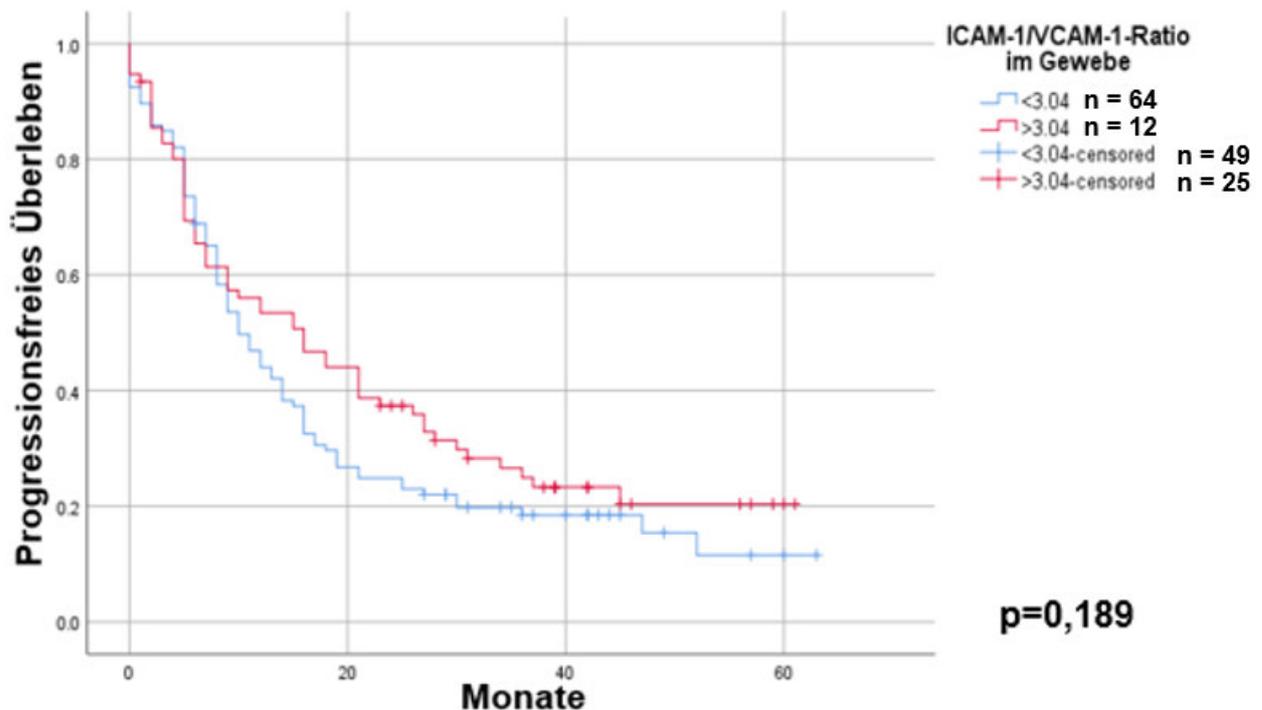


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven für das PFS in Monaten unterteilt nach Höhe der ICAM-1/VCAM-1-Ratio im Gewebe. 1. niedrige ($< 3,04$) und 2. hohe ($> 3,04$) Ratio

4.9 Cox multivariate schrittweise Regressionsanalyse

In einer multivariaten schrittweisen Cox-Regressionsanalyse wurde untersucht, ob die Biomarker, ICAM-1 und VCAM-1, unabhängig von den klassischen Prognosefaktoren für das OS und PFS beim fortgeschrittenen EOC einen Prognosefaktor darstellen.

4.9.1 Gesamtüberleben

In einem schrittweisen Modell wurden erst die Biomarker und die etablierten Prognosefaktoren untersucht. Hierzu gehören: Alter, Histologie, Aszites, Grading, Tumorrest, Lymphknotenstatus, Response to Platinum und CA-125. In einem weiteren Schritt wurden alle im ersten Schritt nicht signifikanten Faktoren ausgeschlossen und die Analyse mit allen signifikanten Faktoren mit einem p-Wert $< 0,05$ in einem weiteren Schritt durchgeführt. Für ICAM-1 im Gewebe und im Plasma konnte bereits im ersten Schritt keine Signifikanz gezeigt werden, sodass hier keine weiteren Analysen sinnvoll waren. Im Folgenden sind die Ergebnisse der multivariaten Analyse für VCAM-1 im Plasma und Gewebe und für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Gewebe und Plasma dargestellt.

4.9.1.1 VCAM-1 im Plasma und Gewebe

In der univariaten Analyse zeigten sich für VCAM-1 im Plasma ($p = 0,045$) und im Gewebe ($p < 0,0001$) mit den oben berechneten Cutoffwerten signifikante Unterschiede für das Gesamtüberleben (siehe Tabelle 13). In der multivariaten Analyse konnte dieses jedoch nicht gezeigt werden. VCAM-1 stellt weder im Plasma ($p = 0,251$ bzw. $0,122$), noch im Gewebe ($p = 0,418$) nach Berücksichtigung der klassischen Prognosefaktoren einen unabhängigen Prognosefaktor für das OS. Das Alter (HR: 1,04, 95 %-KI: 1,01-1,07, $p = 0,015$), ein seröser Histotyp (HR: 0,38, 95 %-KI: 0,18-0,81, $p = 0,012$), ein positiver Lymphknotenstatus (HR: 2,6, 95 %-KI: 1,26-5,66, $p = 0,01$), ein vorhandener Tumorrest (HR: 3,6, 95 %-KI: 1,84-7,12, $p < 0,0001$) und negative Response to Platinum (HR: 8,1, 95 %-KI: 4,2-15,6, $p < 0,0001$) sind bekannte Prognosefaktoren. Sie konnten auch in unserem Kollektiv und Untersuchung als unabhängige Prognosefaktoren für das OS beim Ovarialkarzinom bestätigt werden. Alle anderen Faktoren zeigten bei der multivariaten Analyse keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit. Tabelle 14 fasst die Ergebnisse der Cox schrittweisen multivariaten Regressionsanalyse für VCAM-1 im Gewebe und Plasma für das OS mit allen etablierten Prognosefaktoren, die im ersten Schritt der Analyse ein signifikantes Ergebnis zeigten, zusammen.

Tabelle 14: Ergebnis der Cox schrittweisen multivariaten Regressionsanalyse für VCAM-1 im Gewebe und Plasma für das OS

		Hazard-Ratio	95 %-Konfidenzintervall	Signifikanz p-Wert
VCAM-1 Plasma in ng/ml	1614-1970	1,5	0,73-3,24	0,251
VCAM-1 Plasma in ng/ml	> 1970	2,16	0,81- 5,75	0,122
VCAM-1 Gewebe in ng/ml	< 454,5	1,3	0,67-2,67	0,418
Alter	pro Jahr	1,04	1,01-1,07	0,015
Histologie	serös	0,38	0,18-0,81	0,012
Lymphknotenstatus	positiv	2,6	1,26-5,66	0,01
Tumorrest	vorhanden	3,6	1,84-7,12	< 0,0001
Response to Platinum	negativ	8,1	4,2-15,6	< 0,0001

4.9.1.2 Ratio ICAM-1/VCAM-1 Gewebe und Plasma

In der univariaten Analyse zeigten sich für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma ($p = 0,017$) und im Gewebe ($p = 0,035$) mit den oben genannten Cutoffwerten signifikante Unterschiede für das Gesamtüberleben (siehe Tabelle 13). In der multivariaten Analyse konnte dieses jedoch nicht gezeigt

werden. Die Ratio ICAM-1/VCAM-1 stellt weder im Plasma ($p = 0,10$), noch im Gewebe ($p = 0,167$) nach Berücksichtigung der klassischen Prognosefaktoren einen unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben dar. Das Alter (HR: 1,04, 95 %-KI: 1,01-1,06, $p = 0,014$), ein positiver Lymphknotenstatus (HR: 2,95, 95 %-KI: 1,39-6,25, $p = 0,005$), ein postoperativer Tumorrest (HR: 4,06, 95 %-KI: 2,11-7,82, $p < 0,0001$) und Response to Platin (HR: 7,78, 95 %-KI: 4,16-14,55, $p < 0,0001$) konnten auch in unserem Kollektiv und Untersuchung als unabhängige Prognosefaktoren für das OS bestätigt werden. Tabelle 15 fasst die Ergebnisse der multivariaten Analyse für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Gewebe und Plasma für das OS mit allen etablierten Prognosefaktoren, die im ersten Schritt der Analyse ein signifikantes Ergebnis zeigten, zusammen.

Tabelle 15: Ergebnis der Cox schrittweisen multivariaten Regressionsanalyse für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Gewebe und Plasma für das OS

		Hazard-Ratio	95 %-Konfidenzintervall	Signifikanz p-Wert
Ratio Plasma	< 0,285	1,93	0,82-4,25	0,10
Ratio Gewebe	< 3,04	1,59	0,82-3,11	0,167
Alter	pro Jahr	1,04	1,01-1,06	0,014
Histologie	serös	0,53	0,26-1,08	0,08
Lymphknotenstatus	positiv	2,95	1,39-6,25	0,005
Tumorrest	vorhanden	4,06	2,11-7,82	< 0,0001
Response to Platin	negativ	7,78	4,16-14,55	< 0,0001

4.9.2 Progressionsfreies Überleben

Auch hier wurden in einem schrittweisen Modell erst die Biomarker, ICAM-1, VCAM-1 und die Ratio ICAM-1/VCAM-1 und die etablierten Prognosefaktoren untersucht. Hierzu gehören: Alter, Histologie, Aszites, Grading, Tumorrest, Lymphknotenstatus, Response to Platin und CA-125. In einem weiteren Schritt wurden alle im ersten Schritt nicht signifikanten Faktoren ausgeschlossen und die Analyse mit allen signifikanten Faktoren mit einem p -Wert $< 0,05$ in einem weiteren Schritt durchgeführt. Für VCAM-1 und ICAM-1 im Plasma, sowie für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma und Gewebe konnte bereits im ersten Schritt der Analyse keine Signifikanz gezeigt werden, sodass hier keine weiteren Analysen sinnvoll waren. Im Folgenden sind die Ergebnisse der multivariaten Analyse für VCAM-1 und ICAM-1 im Gewebe dargestellt.

4.9.2.1 VCAM-1 im Gewebe

In der univariaten Analyse zeigten sich für VCAM-1 im Gewebe ($p = 0,003$) mit den oben genannten Cutoffwerten signifikante Unterschiede für das PFS (siehe Tabelle 13). In der multivariaten Analyse konnte dieses bestätigt werden (HR: 2,5, 95 %-KI: 1,44-4,43, $p = 0,001$). Hierbei war das PFS besser, je niedriger die Expression. Das Vorhandensein von Aszites > 500 ml (HR: 1,66, 95 %-KI: 1,04-2,66, $p = 0,032$) und ein vorhandener Tumorrest (HR: 1,85, 95 %-KI: 1,26-2,71, $p = 0,002$) sind in diesem Kollektiv unabhängige Prognosefaktoren für das PFS. Alle anderen Faktoren zeigten bei der multivariaten Analyse keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das PFS. Tabelle 16 fasst die Ergebnisse der multivariaten Analyse für VCAM-1 im Gewebe für das PFS mit allen etablierten Prognosefaktoren, die im ersten Schritt der Analyse ein signifikantes Ergebnis zeigten, zusammen.

Tabelle 16: Ergebnis der Cox schrittweisen multivariaten Regressionsanalyse für VCAM-1 im Gewebe für das PFS

		Hazard-Ratio	95 %-Konfidenzintervall	Signifikanz p-Wert
VCAM-1 Gewebe in ng/ml	> 380	2,6	1,45-4,9	0,001
VCAM-1 Gewebe in ng/ml	88-380	2,5	1,44- 4,43	0,001
Alter	pro Jahr	1,01	0,99-1,03	0,71
Aszites	> 500ml	1,66	1,04-2,66	0,032
Tumorrest	vorhanden	1,85	1,26- 2,71	0,002

4.9.2.2 ICAM-1 Gewebe

In der univariaten Analyse zeigte sich für ICAM-1 im Gewebe mit den oben genannten Cutoffwerten zwar keine klar signifikanten Unterschiede für das PFS, jedoch zeigte sich ein Trend ($p = 0,065$). In der multivariaten Analyse konnte für ICAM-1 im Gewebe eine positive Assoziation mit dem PFS gezeigt werden. Für Werte zwischen 200-670 ng/ml mit $p = 0,024$ (HR: 2,23, 95 %-KI: 1,11-4,71) und für Werte > 670 ng/ml mit $p = 0,012$ (HR: 2,49, 95 %-KI: 1,22-5,01). Hierbei war das PFS besser, bei niedrigerer Expression. Das Vorhandensein von Aszites > 500 ml (HR: 1,76, 95%-KI: 1,09-2,83, $p = 0,019$) und ein vorhandener Tumorrest (HR: 1,73, 95 %-KI: 1,20- 2,49, $p = 0,003$) sind in diesem Kollektiv unabhängige Prognosefaktoren für das PFS. Alle anderen Faktoren zeigten bei der multivariaten Analyse keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das PFS. Tabelle 17 fasst die Ergebnisse der multivariaten Analyse für ICAM-1 im Gewebe für das PFS mit allen etablierten Prognosefaktoren, die im ersten Schritt der Analyse ein signifikantes Ergebnis zeigten, zusammen.

Tabelle 17: Ergebnis der Cox schrittweisen multivariaten Regressionsanalyse für ICAM-1 im Gewebe für das PFS

		Hazard-Ratio	95 %-Konfidenzintervall	Signifikanz p-Wert
ICAM-1 Gewebe in ng/ml	200-670	2,23	1,11-4,71	0,024
ICAM-1 Gewebe in ng/ml	> 670	2,49	1,22-5,01	0,012
Alter	pro Jahr	1,02	1,02-1,04	0,28
Aszites	> 500ml	1,76	1,09-2,83	0,019
Tumorrest	vorhanden	1,73	1,20- 2,49	0,003

4.10 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse

231 Patientinnen mit Erstdiagnose eines Ovarialkarzinom wurden untersucht. Bei 2/3 der Patientinnen lag bei Diagnosestellung eine fortgeschrittene Erkrankung vor.

1. In allen untersuchten Proben im Plasma und Gewebe konnten beide Proteine nachgewiesen werden. Im Plasma lag die Range für beide Proteine zusammen in einem Bereich zwischen 135-3894 ng/ml und im Gewebe bei 1,5-2061 ng/ml. Bei der Ratio ICAM-1/VCAM-1 lagen die Werte im Plasma zwischen 0,1-0,5 und im Gewebe bei 0,64-495.

2. Es besteht keine Korrelation zwischen der ICAM-1 Expression im Plasma und Gewebe und der VCAM-1 Expression zwischen Plasma und Gewebe. Es besteht jedoch eine Korrelation zwischen der VCAM-1 und ICAM-1 Expression im Plasma ($p = 0,275$, $p < 0,001$) und der Expression von VCAM-1 und ICAM-1 im Gewebe ($p = 0,62$, $p < 0,0001$).

3. Beim Subgruppenvergleich der Biomarkerexpression mit den klassischen Prognosefaktoren konnten nur für die Expression von ICAM-1 im Gewebe signifikante Zusammenhänge gezeigt werden. Die ICAM-1-Expression im Gewebe korreliert negativ mit dem Alter ($p = 0,036$) und positiv mit CA-125 ($p = 0,026$), dem FIGO-Stadium ($p = 0,032$), dem Vorhandensein von Aszites ($p = 0,018$), dem Vorhandensein von Metastasen ($p = 0,036$) und dem histologischen Subtyp (beim paarweisen Vergleich zwischen undifferenziert und muzinösem Typ ($p = 0,035$) und zwischen undifferenziertem und endometrioiden ($p = 0,028$)).

4. Mit der Hilfe des Cutoff-Wert-Finder konnten signifikante Cutoffwerte für das OS und PFS berechnet werden. Im univariaten Vergleich zeigten sich signifikante Unterschiede für das Gesamtüberleben in allen Kategorien, außer für ICAM-1 im Plasma. Im univariaten Vergleich für

das PFS zeigten sich lediglich für das VCAM-1 im Gewebe und für die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma Cutoffwerte signifikante Unterschiede.

5.

Gesamtüberleben

In der multivariaten Analyse für die Biomarker (ICAM-1 und VCAM-1) zeigten sich nach Berücksichtigung der klassischen Prognosefaktoren keine signifikanten Unterschiede für das Gesamtüberleben. Die stärkste prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben der Patientinnen hatten die Faktoren vorhandener Tumorrest, positiver Lymphknotenstatus und Response to Platin.

Progressionsfreies Überleben

In der multivariaten Analyse konnte nach Berücksichtigung der klassischen Prognosefaktoren für ICAM-1 im Gewebe für Werte zwischen 200-670 ng/ml (HR: 2,23, 95 %-KI: 1,11-4,71, $p = 0,024$) und für Werte > 670 ng/ml (HR: 2,49, 95 %-KI: 1,22-5,01, $p = 0,012$) und für VCAM-1 im Gewebe für Werte > 88 ng/ml (HR: 2,5, 95 %-KI: 1,44-4,43, $p = 0,001$) eine Korrelation mit dem PFS gezeigt werden. Hierbei war das PFS besser, je niedriger die Expression.

5 Diskussion

Das Ovarialkarzinom ist das zweithäufigste Malignom des weiblichen Genitaltraktes und hat im Bereich der genitalen Krebserkrankungen die höchste Mortalitätsrate. Trotz verbesserter radikaler chirurgischer Operationsverfahren und nachfolgender optimierter Chemotherapie beträgt das 5-Jahresüberleben weiterhin lediglich 30-40 % weltweit (1). Die Ursachen liegen zum einen in der meist sehr späten Diagnosestellung in einem bereits fortgeschrittenen Tumorstadium aufgrund fehlender spezifischer Symptome, fehlender Tumormarker für die Früherkennung, sowie an dem aggressiven Wachstums- und Metastasierungsverhalten des malignen EOC. Zum anderen aufgrund einer fehlenden spezifischen Therapie. Das Grundtherapiekonzept für alle EOC liegt in einer radikalen Tumorresektion (Debulking-OP) gefolgt von einer platinhaltigen Chemotherapie. Diese Chemotherapie beruht darauf, dass sie unspezifisch sich gegen alle schnell proliferierenden Zellen richtet. Durch die fehlende Diskriminierung zwischen gesundem und krankem Gewebe geht diese Chemotherapie daher mit vielen Nebenwirkungen einher u. a. auch mit der Induktion von Zweitmalignomen. Die etablierten Prognosefaktoren, wie z. B. der residuelle Tumorrest, das FIGO-

Stadium, der CA-125-Tumormarker und das Ansprechen auf die platinhaltige Chemotherapie geben Hinweise für die Prognose, sind aber dennoch insgesamt für die individuelle Prognoseabschätzung weiterhin unzureichend (1,11). Dieses macht zum einen die Suche nach Tumormarkern für die Früherkennung notwendig und zum anderen die Suche nach Zielmolekülen im Sinne einer „targeted therapy“ zur gezielten Tumortherapie und Prognoseabschätzung notwendig. Daher müssen weitere Prognosefaktoren auf ihren Einfluss hin untersucht werden, um eine individualisierte Therapieplanung und optimierte Prognoseabschätzung zu ermöglichen.

Zielgerichtete Tumortherapien haben in den letzten Jahren vielversprechende Ergebnisse gezeigt und werden intensiv beforscht. Dieses hat insbesondere für das EOC große Bedeutung aufgrund der in der Genomanalyse nachgewiesenen hohen genomischen Instabilität und Fehlen von angreifbaren Treibermutationen. Die Interpretation von Genomdaten beim EOC stellt sich daher als sehr komplex dar und erfordert einen sehr sorgfältigen Ansatz, der eine genauere Untersuchung der Daten über das bloße Vorhandensein oder Fehlen von Mutationen hinaus erfordert. Die umfangreichen genomischen Veränderungen in der DNA müssen im Ganzen betrachtet werden über die Rolle im Tumor hinaus (4). Für die Pathogenese von vielen verschiedenen Tumorerkrankungen wird eine wesentliche Rolle für die Inflammation und damit für das Immunsystem angenommen (28-31). Eine Entzündung ist eine schützende biologische Reaktion, bei der Immunzellen, Blutgefäße und molekulare Mediatoren rekrutiert werden, um schädliche Reize wie Bakterien, Viren oder eben auch beschädigte Zellen, die maligne entartet sind zu eliminieren (17). Das Endothel spielt eine entscheidende Rolle als Nahtstelle zwischen Blut und Gewebe. Damit hat es multiple Funktionen im immunologischen Bereich, wie Antigenpräsentation und -expression von Zelladhäsionsproteinen oder anderen Oberflächenmolekülen (18, 19). Für die Proteine ICAM-1 und VCAM-1 wurde dieser Zusammenhang bereits für andere Tumorerkrankungen gezeigt (28-31, 48-53). Aus u. a. diesen Studien ist bekannt, dass Zelladhäsionsmoleküle über ihre Rolle im Immunsystem eine Rolle in der Tumorpathogenese spielen. Dies wird zusammengefasst unter dem Begriff der Tumorimmunologie (17). Für das Ovarialkarzinom ist z. B. das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ein erfolgsversprechendes Ziel für neue zielgerichtete Therapien (66-69). Beispielsweise bindet der trifunktionale Antikörper Catumaxomab an EpCAM und kann das punktionsfreie Überleben bei Ovarialkarzinompatientinnen mit Aszites als vorherrschendem Symptom signifikant verlängern (22). Daneben ist z. B. der monoklonale Antikörper Bevacizumab ein etablierter Bestandteil in der Therapie des Ovarialkarzinomes. Die Fähigkeit eines Tumors neue Gefäße bilden zu können, die Tumorangiogenese, ist entscheidend für das Tumorwachstum. Das Signalmolekül VEGF ist ein zentraler Akteur bei der Regulierung der Tumorangiogenese. Bevacizumab bindet an das

Signalmolekül VEGF und hemmt so die Angiogenese (11). Speziell für das EOC kann einem alternativen immunologischen Forschungsansatz als dem klassischen genomischen für die Forschung an neuen Therapien eine besondere Bedeutung zu kommen.

In dieser Arbeit wurde die Expression zweier weiterer Adhäsionsmoleküle aus der Immunglobulinsuperfamilie untersucht: ICAM-1 und VCAM-1. Durch die Expression als Zelladhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und Zellen des Immunsystems spielen beide Proteine eine entscheidende Funktion in der Zellmigration und -aktivierung. Dadurch können sie eine entscheidende Rolle in der Migration von malignen Zellen durch das Endothel spielen und können dadurch eine Schlüsselfunktion bei der Tumorausbreitung und der Metastasierung spielen. Hierbei könnten die Tumore verschiedene Mechanismen nutzen, um mit dem Immunsystem des Wirts zusammen zu existieren oder sich vor einer Immunantwort zu schützen. Hierbei kann zum einen durch eine Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Tumorzelloberfläche, eine Erkennung der malignen Zellen durch das Immunsystem verhindert werden. Zum anderen könnte der Tumor durch eine Hemmung der Synthese von Zytokinen, die die Dichte der Adhäsionsmoleküle reduzieren und dadurch die Tumorzelle wiederum für das Immunsystem weniger sichtbar machen, und so die Tumorprogression zulassen (17). Die vollständige Funktion ist allerdings noch nicht verstanden. Zahlreiche Studien haben die Rolle von ICAM-1 und VCAM-1 in der Tumorentstehung und -ausbreitung untersucht und kamen teilweise zu divergierenden Aussagen (29, 31, 47, 51-53). Für das Magenkarzinom konnte gezeigt werden, dass höhere Konzentrationen von ICAM-1 mit einem schlechteren Outcome und einer höheren Rate an positivem Lymphknotenbefall assoziiert sind (47, 48). Ähnliches konnte für das Melanom mit höherer Expression von ICAM-1 bei den dickeren Melanomen (> 1 mm), die deutlich invasiver wachsen und eine höhere Metastasierungsrate zeigen als die weniger invasiven (< 1 mm) nachgewiesen werden (49). Hohe Serum- oder Gewebekonzentrationen für VCAM-1 konnten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, Bronchialkarzinom, Blasenkarzinome, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome, Ösophagustumoren, Nieren- und Brustkrebs nachgewiesen werden (29, 30). Wiederum für Lymphome, das kolorektale Karzinom, Kopf- und Halstumore zeigten sich ein geringeres Tumorwachstum und eine niedrigere Metastasierungsrate, sowie eine insgesamt bessere Prognose bei Patienten mit ICAM-1 positiven Tumoren im Vergleich zu ICAM-1 negativen Tumoren (51-53).

Für das Ovarialkarzinom und die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 finden sich ebenfalls divergierende Ergebnisse. Für ICAM-1 konnte bisher eine geringere ICAM-1 Expression bei Ovarialkarzinomen gezeigt werden (58, 59) und für VCAM-1 konnte überwiegend eine erhöhte Expression mit dem Ovarialkarzinom gezeigt werden (21, 28, 33). De Groot et al. fanden eine

reduzierte Expression von ICAM-1 in Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu gesunden Ovarzellen, die kein ICAM-1 exprimierten (58). Auch Arnold et al. fanden eine reduzierte Expression (59). Für VCAM-1 konnten u. a. Huang et al. (28) im Gewebe beim Menschen und Carter et al. (21) im Tiermodell zeigen, dass eine höhere VCAM-1 Expression in Ovarialkarzinomzellen nachzuweisen war und einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben darstellt. Bei höherer Expression zeigte sich ein größeres Tumorwachstum und Zellmigration und ein negativer Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben (33).

Unser Kollektiv beinhaltet Patientinnen mit primärem fortgeschrittenen EOC aus dem OVCAD-Register. Für 231 Patientinnen lagen Plasma- und Gewebeproben vor, die ausgewertet werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 im Gewebe und im Plasma von Patientinnen mit EOC untersucht. Anschließend wurde auf Korrelationen zwischen Plasma und Gewebe getestet. Weiterhin wurde die Fragestellung bearbeitet, ob Zusammenhänge zwischen der ICAM-1 und VCAM-1 Expression und bekannten klassischen Prognosefaktoren bestehen und ob die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 einen Einfluss auf das OS und das PFS hat. Die Proben wurden mit einer etablierten ELISA-Technik untersucht, mit SPSS ausgewertet und im Anschluss wurden die Ergebnisse dieser Untersuchung mit denen aus der aktuellen Literatur verglichen und diskutiert.

5.1 ICAM-1 und VCAM-1 Expression und die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma und Ovarialkarzinomgewebe

Wir konnten zeigen, dass die beiden von uns untersuchten Proteine, sowohl im Plasma als auch im Gewebe von Patientinnen mit EOC exprimiert werden. In keiner einzigen Probe wurden die Proteine nicht exprimiert. Dieser Fakt ist bereits bemerkenswert, da dieses nicht für alle Gewebearten der Fall ist. So konnte für gesunde Magenmukosa und niedrigmaligne Melanome nachgewiesen werden, dass diese Zellen kein ICAM-1 exprimieren. Ähnliches gilt für gesundes Brust- und Nierengewebe (48, 49).

Im Plasma lag der Median der VCAM-1-Konzentration bei 1384,3 ng/ml (Range: 539,9-3894 ng/ml) und der für ICAM-1 bei 340,1 ng/ml (Range: 135-966 ng/ml). Der Median für die Ratio im Gewebe lag bei 6,9 und im Plasma bei 0,24. Der Median im Gewebe lag für ICAM-1 bei 766 ng/ml (Range: 16,7-2061 ng/ml) und für VCAM-1 bei 279 ng/ml (Range: 1,59-1141 ng/ml). Damit lag eine sehr große Spannweite vor. Ein quantitativer Vergleich der Biomarker (ICAM-1 und VCAM-1) in ng/ml für das Ovarialkarzinom mit den bisherigen Ergebnissen von Forschungsarbeiten aus der Literaturrecherche ist nicht möglich, da kein ELISA Anwendung fand, sondern vorwiegend ein immunhistochemischer

Vergleich erfolgte (33, 60-62) oder Western-Blot (32). Die Arbeit von Jakimovska et al. stellt hier eine Ausnahme dar. In dieser kleinen Untersuchung mit 36 Patientinnen mit EOC wurde VCAM-1 im Serum mit Durchflusszytometrischen Assay auf Perlenbasis (FlowCytomix Simplex Kit) nachgewiesen. Die Werte für Serum-VCAM-1 lagen im Bereich von $1639,3 \pm 537,2$ ng/ml. Auch hier zeigt sich ähnlich wie bei unserer Analyse, dass eine große Spannweite der Werte besteht. Die absoluten Werte von Jakimovska et al. waren vergleichbar mit unseren (32).

Zusammenfassend konnten wir in jeder Probe die beiden Proteine nachweisen. In den oben genannten Arbeiten konnte teilweise absolut kein Nachweis erfolgen z. B. in gesunder Magenmukosa oder Nierengewebe (48, 49). Hier ist allerdings kritisch anzumerken, dass bei den oben genannten Arbeiten der Nachweis mittels Immunhistochemie erfolgte und dieser v. a. im Bereich von sehr niedrigen Konzentrationen weniger sensible ist als der Nachweis mittels ELISA. Sodass ein direkter Vergleich und Übertragbarkeit aufgrund der methodischen Unterschiede nicht 1 zu 1 möglich sind.

5.1.1 ICAM-1 und VCAM-1 im Gewebe

In unserer Untersuchung lag der Median im Gewebe für ICAM-1 bei 766 ng/ml (Range: 16,7-2061 ng/ml) und für VCAM-1 bei 279 ng/ml (Range: 1,59-1141 ng/ml). Laut Literaturrecherche ist die Proteinexpression im Gewebe beim Ovarialkarzinom bisher nur durch Arnold et al. (59) für ICAM-1 und durch Huang et al. (28) für VCAM-1 erfolgt.

In einer Untersuchung von Arnold et. al konnte in 5 gesunden Ovargewebeproben ICAM-1 nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte jedoch auch hier mittels Immunhistochemiefärbung und nicht mittels ELISA, sodass keine Quantifizierung und Vergleichbarkeit in ng/ml besteht. Ebenso konnte hier in Zelllinien von Ovarialtumoren und 20 primären epithelialen Ovarialkarzinomen ICAM-1 mittels Immunhistofärbung nachgewiesen werden. Die Expression von ICAM-1 in Zelllinien war in den malignen Ovarialkarzinomzelllinien (OAW42, PEO1 und JAM) und in den untersuchten Ovarkarzinomgewebeproben signifikant niedriger auf Protein und mRNA-Ebene als in der humanen Zelllinie des ovariellen Oberflächenepithels (HOSE) und in den gesunden Ovargewebeproben. In diesem Kollektiv war eine Downregulation von ICAM-1 auf mRNA- und Proteinebene ein gemeinsames Merkmal für alle maligne entarteten Zellen (Zelllinien oder Tumoren). Die Autoren diskutierten durch die Downregulation von ICAM-1 veränderte Eigenschaften der Zellen zugunsten einer malignen Entartung (59).

Huang et al. untersuchten im Jahr 2013 die Expression von VCAM-1 auf Proteinebene im Ovargewebe. Hier wurde gesundes Ovargewebe, highgrade seröse Ovarialkarzinomzelllinien (OVCA433, OVCA429 und SKOV3) und Proben von 251 highgrade serösen Ovarialkarzinomen

mittels Immunhistochemie untersucht. VCAM-1 konnte im malignen Gewebe und in gesundem Ovargewebe nachgewiesen werden. Es erfolgte eine Einteilung in Hoch- und Niedrigexpressionsgruppen bei einem Cutoff von > 30 % VCAM-1 positiven Tumorzellen lag eine hohe Expression vor. Die Expression war jedoch in den Ovarialkarzinomen und den malignen Zelllinien signifikant höher als im gesunden Ovargewebe (28).

Zusammenfassend konnten wir in allen Gewebeproben ICAM-1 und VCAM-1 nachweisen. In der Literatur ist bisher für ICAM-1 eine niedrigere und für VCAM-1 eine höhere Expression im Ovarialkarzinomgewebe verglichen mit gesundem Ovargewebe beschrieben (28, 59). Ein qualitativer und quantitativer Vergleich ist mit unserer Untersuchung nicht möglich, da wir keine gesunden Ovargewebeproben als Vergleich untersucht haben. Für ICAM-1 im Gewebe zeigte sich daneben in unserem Subgruppenvergleich ein Zusammenhang mit fünf klassischen Prognosefaktoren. Diese werden weiter unten diskutiert.

5.1.2 ICAM-1 und VCAM-1 im Plasma

In unserer Untersuchung lagen die Werte für ICAM-1 im Plasma bei im Median 353 ng/ml (Range: 135-966 ng/ml) und für VCAM-1 bei 1451ng/ml (Range: 539-3894 ng/ml). Die Proteinexpression von ICAM-1 und VCAM-1 mittels ELISA im Plasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom ist laut Ergebnissen der Literaturrecherche bisher nur in den beiden Arbeiten von Tas et al. (70) und Jakimovska et al. (32) für VCAM-1 untersucht worden. Für ICAM-1 im Plasma für das EOC zeigten sich keine Studien.

Für andere Erkrankungen wurden jedoch Plasmaanalysen durchgeführt. El-Amine et al. konnten mittels ELISA bei gesunden Probanden ICAM-1 Konzentrationen von im Mittelwert bei 437 ng/ml und für Patienten mit Diabetes mellitus Werte bei 735 ng/ml nachweisen (71). Papayianni et al. konnten in ihrer Untersuchung für gesunde Probanden ICAM-1 Werte im Plasma bei im Durchschnitt 238,64 ng/ml und für VCAM-1 bei 1012,11 ng/ml nachweisen. Nach Hämodialyse zeigte sich ein deutlicher Anstieg für ICAM-1 und VCAM-1 auf > 680 ng/ml bzw. > 2000 ng/ml (72). Auch bei Patientin mit hämodynamisch relevanter koronarer Herzerkrankung (KHK) und KHK ohne hämodynamische Relevanz konnte ähnliches gezeigt werden (ICAM-1: 545±198 ng/ml vs. 242±113 ng/ml, VCAM-1: 2040±634 ng/ml vs. 918±336 ng/ml) (73). Clausen et. al. zeigten 2002 Mittelwerte für VCAM-1 bei 609 ng/ml und für ICAM-1 bei 224 ng/ml bei gesunden Probanden (74). Dieses zeigt, dass eine große intraindividuelle Dynamik und Spannbreite bestehen. In den oben genannten Untersuchungen (71-74) lag die durchschnittliche Konzentration für ICAM-1 im Plasma zwischen 238-437 ng/ml und für VCAM-1 zwischen 918-1609 ng/ml und damit in jeder einzelnen Untersuchung signifikant höher für

VCAM-1. Die Ergebnisse der in der Literatur bei gesunden Probanden gemessenen Werte sind vergleichbar mit unseren Ergebnissen (71-74). Auch bei unseren Ergebnissen zeigten sich signifikant höhere Werte für VCAM-1 im Plasma im Vergleich zur ICAM-1 Expression ($p < 0,0001$). Auch zeigt sich eindrücklich, dass die ICAM-1 und VCAM-1 Expression von vielen Faktoren abhängig sein kann. So konnte allein in den oben genannten Untersuchungen Zusammenhänge mit hämodynamisch relevanter KHK, Diabetes mellitus, Mikroalbuminurie und Niereninsuffizienz gezeigt werden. Die Unterschiede wurden a. e. als Ausdruck der endothelialen Dysfunktion durch die Grunderkrankung bei diesem Patientenkollektiv gewertet (71-74).

Für die VCAM-1 Expression speziell im Ovarialkarzinom fanden sich zwei Arbeiten, die dieses ebenfalls in einem kleineren Kollektiv untersucht haben. Tas et al. untersuchten als einzige in einer Studie mit 50 Patientinnen mittels ELISA die VCAM-1-Expression. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Serumwerten für VCAM-1 zwischen den EOC Patientinnen und gesunden Kontrollen ($p = 0,24$) (70). Jakimovska et al. konnten in ihrer Untersuchung mit einem Durchflusszytometrischen Assay auf Perlenbasis bei 36 Patientinnen Werte für Serum VCAM-1 im Bereich von $1639,3 \pm 537,2$ ng/ml nachweisen. Gesundes Ovargewebe wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die VCAM-1 Expression wurde hierbei als prognostisch ungünstig für das OS identifiziert (32).

Zusammenfassend zeigt sich auch hier ähnlich wie bei unserer Analyse, dass eine große Spannweite der Werte besteht. Insgesamt ist die Höhe der VCAM-1-Expression im Plasma vom EOC mit unseren Ergebnissen (Median: 1451 ng/ml, Range: 539-3894 ng/ml) vergleichbar. Da wir kein gesundes Ovargewebe untersucht haben, ist eine vergleichende Einordnung entsprechend nicht möglich.

5.2 Korrelation zwischen der ICAM-1 und VCAM-1 Expression im Plasma und Gewebe

Eine Korrelation zwischen der Expression von ICAM-1 oder VCAM-1 im Ovarialkarzinomgewebe und Plasma fand sich nicht. D. h. höhere Konzentrationen im Gewebe korrelierten nicht mit höheren Konzentrationen im Plasma. Dieses bedeutet, dass die Quelle des ICAM-1 und VCAM-1 im Plasma nicht das Ovarialkarzinom ist, sondern eine andere sein muss bzw. durch andere Störquellen so stark beeinflusst wird, dass sich ein Zusammenhang in unserer Untersuchung nicht zeigen ließ. Damit sind die Plasmawerte von VCAM-1 und ICAM-1 nicht spezifisch für das Tumormilieu und nicht geeignet als Surrogatparameter für das Gewebe-ICAM-1 oder -VCAM-1. Es ist bekannt, dass ICAM-1 und VCAM-1 durch eine Reihe an Faktoren beeinflusst werden können. Wie oben beschrieben ist diese u. a. bei Erkrankungen mit endothelialer Dysfunktion und systemischer Inflammation wie z. B.

der KHK, dem Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen und bei Niereninsuffizienz bekannt (20, 74, 75). Eine Korrektur für die bekannten Faktoren, die die ICAM-1 und VCAM-1 Expression beeinflussen war aufgrund fehlender Informationen zu z. B. Nierenfunktion, KHK und Diabetes mellitus und der kleinen Fallzahl nicht möglich. Zusätzlich kommt hinzu, dass die systemische Entzündungsreaktion bei Krebspatienten ein häufiges Phänomen darstellt. Daher ist es auch möglich, dass allein durch diese systemische Inflammation eine mögliche krebsspezifische Expression der Biomarker im Plasma und Gewebe nicht miteinander korreliert werden konnte (76). Möglicherweise besteht tatsächlich keine Korrelation zwischen Plasma- und Gewebeexpression für VCAM-1 und ICAM-1. Dieses konnte nämlich für andere Krebserkrankungen bereits gezeigt werden (77, 78).

Eine Korrelation besteht jedoch zwischen der ICAM-1 und VCAM-1-Expression, sowohl für das Plasma als auch für das Gewebe. Die VCAM-1-Expression im Plasma war signifikant höher im Vergleich zur ICAM-1-Expression ($p = 0,275$, $p < 0001$). Damit sind die von uns erhobenen Ergebnisse im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der VCAM-1 und ICAM-1 Expression mit signifikant höheren VCAM-1-Werten fanden (20, 74, 75). Im Gewebe war es allerdings genau andersherum mit signifikant höheren Konzentrationen von ICAM-1 als VCAM-1 ($p = 0,62$, $p < 0,0001$). Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in ng/ml im Ovarialkarzinomgewebe ist bis dato nicht erfolgt, sodass hier keine vergleichende Einordnung möglich ist. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Immunhistofärbung im Gewebe für ICAM-1 (59) und VCAM-1 (28) ohne vergleichbare Quantifizierung. Scalici et al. gingen der Frage nach, ob VCAM-1 im Plasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom einen Surrogatparameter für VCAM-1 im Ovarialkarzinomgewebe darstellt. Hierfür korrelierten sie die VCAM-1-Expression im Plasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom präoperativ zum Beginn der Therapie und bestimmten VCAM-1 im Mesothel in Biopsien vom Peritoneum und Omentum. Bei diesen insgesamt 18 Patientinnen zeigte sich, ebenso wie in unserer Untersuchung mit 231 Patientinnen, keine Korrelation zwischen Plasma- und Gewebeexpression von VCAM-1 (59).

Jakimovska et al. konnten in einer kleinen Kohortenstudie mit 36 Patientinnen mit Ovarialkarzinom signifikant erhöhte VCAM-1-Werte im Plasma bei 5 Patientinnen, die innerhalb von 11 Monaten des Follow-ups verstarben im Gegensatz zu den 31 Patientinnen mit niedrigeren VCAM-1-Werten, die noch am Leben waren zeigen. Daneben konnte eine Korrelation zwischen Plasma VCAM-1 und VCAM-1 im Aszites gezeigt werden ($r = 0.733$, $p < 0.001$) (32).

5.3 Korrelation mit klassischen etablierten Prognosefaktoren

Die VCAM-1 Expression, sowie die Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Gewebe und im Plasma, sowie die ICAM-1-Expression im Plasma korrelieren nicht mit den etablierten Prognosefaktoren für das Ovarialkarzinom. Hierzu gehören das Alter bei Diagnosestellung, die CA-125-Konzentration, der Lymphknotenstatus, der Metastasierungsstatus, das Vorhandensein von Aszites, das FIGO-Stadium, der histologische Subtyp, das Grading, der postoperative Tumorrest und das Vorliegen einer Peritonealkarzinomatose.

Anders jedoch ist dieses für die ICAM-1 Expression im Gewebe. Hier konnte im Subgruppenvergleich eine negative Assoziation mit dem Alter ($p = 0,036$) und eine positive Assoziation mit dem FIGO-Stadium ($p = 0,032$), dem Vorhandensein von Aszites ($p = 0,018$), dem Vorhandensein von Metastasen ($p = 0,036$) und CA-125 ($p = 0,026$) gezeigt werden.

5.3.1 Alter bei Diagnosestellung

Das Durchschnittsalter unserer behandelten Patientinnen betrug 58 Jahre bei Diagnosestellung und liegt damit unter dem in der Literatur angegebenen mittleren Alter von 69 Jahren (1). Im Gegensatz zum Mammakarzinom zeigt sich beim Ovarialkarzinom eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit für jüngere Patientinnen als für ältere Patientinnen. Die Ursache für das schlechtere Outcome ist unklar, ist teilweise jedoch auf die Tatsache zurückzuführen, dass bei älteren Patientinnen die Diagnose in einem fortgeschrittenen Stadium erfolgt und die Komorbiditäten mit steigendem Alter zunehmen. Letztendlich ist nicht sicher geklärt, ob das Alter einen unabhängigen Faktor darstellt, da u. a. gezeigt werden konnte, dass ältere Patientinnen eine weniger aggressive Therapie präferieren und daher oft z. B. auf eine Chemotherapie verzichten (11). In unserer Untersuchung zeigte sich eine Abnahme der ICAM-1 Expression im Gewebe bei steigendem Alter ($p = 0,036$, siehe Abbildung 9). Eine Altersabhängigkeit der ICAM-1-Expression konnte in unserer Literaturrecherche nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnten Huang et al. für die VCAM-1 Expression in einem Kollektiv mit 251 Patientinnen mit EOC zumindest für VCAM-1 das genaue Gegenteil zeigen. Hier zeigten sich höhere VCAM-1-Werte bei höherem Alter bei Diagnosestellung (11, 28). Auch Morisaki et al. konnten für VCAM-1 eine positive Korrelation mit dem Alter zeigen. Sie zeigten aber auch explizit, dass dieses nicht für das ICAM-1 gilt. Hier zeigte sich in ihrer Untersuchung kein Zusammenhang für ICAM-1 und dem Alter (79). Eine biologische Hypothese lässt sich bei den gegenläufigen Befunden in unserer Untersuchung und in der von Morisaki et al. nur schwierig aufstellen.

5.3.2 CA-125

Die Einteilung für den CA-125-Wert liegt als normwertig bei ≤ 35 U/l, ein Grenzbereich besteht für Werte zwischen 35-65 U/l und bei > 65 U/l besteht ein pathologischer Bereich. CA 125-Werte über 500 U/l sind nicht beweisend, aber hochverdächtig für ein fortgeschrittenes Ovarialkarzinom. Die Sensitivität und Spezifität sind eingeschränkt, da CA-125 auch bei nicht malignen Erkrankungen erhöht sein kann. Daher kann CA-125 allein nicht als Screeningparameter verwendet werden. Bei klinischem Verdacht und erhöhtem CA-125-Spiegel liegt mit großer Wahrscheinlichkeit ein maligner Ovarialtumor zugrunde. Mit fortschreitendem Stadium und zunehmender Entdifferenzierung zeigt sich ein Anstieg des Tumormarkerspiegel und kann somit als relevanter Marker für die Abschätzung der Prognose angesehen werden (11, 80). Die molekularbiologische Beziehung zwischen ICAM-1 und CA-125 ist bisher nicht untersucht worden. Chowdhury et. al konnten zeigen, dass ICAM-1 und CA-125 mit dem Auftreten von Aszites in einem Patientenkollektiv mit Leberzirrhose korrelieren. Eine molekularbiologische Hypothese konnte jedoch nicht aufgestellt werden (81). In unserer Untersuchung zeigte sich im Gruppenvergleich ein Zusammenhang zwischen der ICAM-1 Expression im Gewebe und der präoperativen CA-125-Werte ($\rho = 0,17$, $p = 0,026$). Höhere Werte für ICAM-1 im Gewebe konnten bei Patientinnen mit höheren CA-125-Werten beobachtet werden. Eine Erklärung lässt sich auf der Grundlage unserer Untersuchung nicht ableiten. Beim CA-125 handelt es sich um ein langkettiges Transmembran-Glykoprotein, das sich in coelomaten Mesothelzellen wie z. B. im Peritoneum findet und dessen Konzentration mit dem Tumorprogress korrelieren kann. Auch beim ICAM-1 handelt es sich um ein transmembranöses Glykoprotein, das zur Zellkommunikation und -migration beiträgt. Es ist möglich, dass für das invasive Tumorwachstum und erhöhten Stoffwechselaktivität im Tumor eine erhöhte Produktion von ICAM-1 notwendig ist (82).

Huang et. al korrelierten in Ihrem Kollektiv die Expression von VCAM-1 ebenfalls mit den präoperativen CA-125-Werten und fanden, so wie wir in unserer Untersuchung mit $n = 231$ keine Korrelation. Wobei hier als Cutoff für CA-125 600 U/l gewählt worden war (28) und wir wählten 35 U/l als Cutoffwert.

5.3.3 FIGO-Stadium

Die Prognose des Ovarialkarzinoms verschlechtert sich mit fortschreitendem Stadium stark. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt im Stadium I am höchsten und am niedrigstem im Stadium IV (11). Die Ausbreitung des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist ein wichtiger Prognosefaktor für das Überleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Dieses konnte in verschiedenen Studien und Analysen belegt werden (2, 11, 83).

77,5 % (FIGO III) und 17,3 % (FIGO IV) unserer Patientinnen hatten bereits bei der Diagnose ihres EOC ein fortgeschrittenes Stadium. Dieses entspricht auch den Literaturangaben, die zeigen, dass die meisten Ovarialkarzinome in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden und dadurch eine schlechtere Prognose zeigen (11). Unser Kollektiv gehört somit zur Risikogruppe der fortgeschrittenen Erkrankung mit erhöhtem Rezidivrisiko und einer schlechteren Prognose. In unserer Untersuchung korreliert die ICAM-1-Expression im Gewebe mit dem FIGO-Stadium ($p = 0,032$). ICAM-1 ermöglicht wie eingangs beschrieben die Penetration des Endothels durch Lösen der Tight Junctions (16, 34, 35). Mit fortschreitendem Stadium besteht ein invasiveres Wachstum. Für dieses verdrängende Wachstum müssen entsprechend mehr Zell-Zell-Verbindungen durchtrennt werden. Hierfür wird u. a. ICAM-1 benötigt.

Für VCAM-1 fand sich in unserer Untersuchung kein Zusammenhang mit dem FIGO-Stadium. Scalici et al. fanden in ihrer Analyse der VCAM-1-Expression im Mesothel von Patientinnen mit Ovarialkarzinom eine Assoziation der VCAM-1-Expression mit dem Tumorstadium. Je fortgeschrittener die Erkrankung, desto höher und desto mehr Patientinnen exprimierten VCAM-1 (11). In einer weiteren Arbeit konnte in diesem Zusammenhang ebenfalls im Zell- und Mausmodell gezeigt werden, dass eine Inhibition der VCAM-1-Funktion zu einer Abnahme der Mesothelinvasion, einer Abnahme der Tumorlast und zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens führt (60). Jakimovska et al. bestimmten bei 36 Patientinnen mit einem Durchflusszytometrischen Assay auf Perlenbasis Werte für Serum VCAM-1-Expression und korrelierten diese mit dem FIGO-Stadium. Hierbei zeigte sich in diesem kleinen Kollektiv mit $n = 23$ keine Korrelation, ebenso wie in unserem Kollektiv (32).

5.3.4 Metastasen

Die Tumormetastasierung ist ein komplexer Prozess, bei dem Tumorzellen den Ort des Primärtumors verlassen und sich sekundäre Tumore in entfernten Organen bilden. Die Metastasierung geht mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate bei Krebspatienten einher (17). Dieses ist auch für das Ovarialkarzinom der Fall mit schlechterer Prognose bei Vorliegen von Metastasen (11). Bei 18 % der Patientinnen in unserem Kollektiv konnten Metastasen nach dem ersten Staging nachgewiesen werden. In unserer Untersuchung zeigten sich im Gruppenvergleich zwischen Patientinnen mit und ohne Vorhandensein von Metastasen und der ICAM-1-Expression im Gewebe ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,032$). Die genaue Funktion von ICAM-1 für die Entstehung von Metastasen ist nicht eindeutig verstanden. Eine der Funktionen von ICAM-1 liegt in der Adhäsion und Migration von Leukozyten über Endothel- und Epithelzellen ins umliegende Gewebe. Die Zellmigration jenseits der Epithelgrenze durch Auflösen der Tight Junctions stellt eine

Schlüsselfunktion bei der Metastasierung dar. Dieses wurde für verschiedenste Malignome und auch das Ovarialkarzinom bereits gezeigt und könnte auch hier die Ursache sein (47-49, 84). Allerdings ist hier kritisch anzumerken, dass die Rolle von ICAM-1 und Metastasenbildung bei malignen Tumoren in der Literatur sehr widersprüchlich diskutiert wird (51-53). Unsere Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass eine erhöhte ICAM-1-Expression mit dem Vorhandensein von Metastasen assoziiert ist. Vergleichbare Untersuchungen für ICAM-1 und Metastasen im EOC existieren nicht.

Für VCAM-1 zeigte sich in unserem Kollektiv kein Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Metastasen bei Patientinnen mit EOC. Tas et al. jedoch fanden in ihrer Studie mit 50 Patientinnen, dass bei Vorhandensein von Metastasen sich höherer VCAM-1-Spiegel im Plasma zeigten im Vergleich zu Patientinnen ohne Metastasen ($p = 0,03$) (70). Diese abweichenden Ergebnisse bei ansonsten vergleichbaren Patientencharakteristika könnten zum einen auf die Kollektivgröße (231 vs. 50 Patientinnen mit EOC) zum anderen auf das Studiendesign (standardisiert prospektiv vs. retrospektiv) zurückgeführt werden.

5.3.5 Aszites

Bei 77,9 % unserer Patientinnen konnte Aszites nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von Aszites ist mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (11). In unserer Untersuchung zeigte sich im Subgruppenvergleich zwischen dem Aszitesvolumen > 500 ml und der ICAM-1-Expression im Gewebe ($p = 0,018$) ein signifikanter Zusammenhang. Die Rolle von ICAM-1 in der Entstehung von Aszites ist nicht bekannt. Die Konzentration von ICAM-1 im Aszites ist von besonderem Interesse, da das Vorliegen von Aszites immer pathologisch ist und mit einem Progress der Erkrankung assoziiert ist. Die Konzentration im Aszites kann die lokale Tumormikroumgebung darstellen. Pruijboom et al. untersuchten die Expression von ICAM-1 in Aszites von Patienten mit Leberzirrhose, Peritonealkarzinose und spontan bakterieller Peritonitis. Sie konnten zeigen, dass die Gruppe mit Peritonealkarzinose ($n = 26$) signifikant mehr ICAM-1 exprimierte (85). Als Ursache hierfür wurde eine erhöhte Produktion von ICAM-1 durch die Tumorzellen selbst postuliert. Über ICAM-1 kann wie oben beschrieben eine Zellmigration und damit Ausbreitung der Erkrankung ermöglicht werden. Passend hierzu fanden Jakimovska et al. in einer kleinen Kohortenstudie mit 36 Patientinnen mit Ovarialkarzinom eine positive Korrelation zwischen Plasma-VCAM-1 und VCAM-1 im Aszites ($r = 0,733$, $p < 0,001$). Auch konnte eine Assoziation für die VCAM-1-Konzentrationen im Aszites mit dem OS gezeigt werden. Patientinnen mit niedrigeren Konzentrationen (776.2 ± 264.4 ng/ml vs. 1076.5 ± 320.4 ng/ml, $p = 0,028$) lebten länger als Patientinnen mit höheren Konzentrationen (32).

5.4 Gesamtüberleben

Am Ende der Follow-up-Zeit von 72 Monaten waren 48 % aller Patientinnen verstorben. Das mediane OS lag bei 48 Monaten (95 %-KI: 40,9-55,0 Monate). Dieses entspricht den Angaben für das mediane OS in der Literatur (11). Für das OS konnte in der univariaten Analyse für alle Biomarker signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, die durch den Cutoffwerte-Finder gebildet worden sind, gezeigt werden. Eine Ausnahme stellte lediglich das ICAM-1 im Plasma dar. In der multivariaten Cox Regressionsanalyse konnte nach Korrektur für die klassischen Prognosefaktoren jedoch gezeigt werden, dass weder ICAM-1 und VCAM-1 noch die Ratio ICAM-1/VCAM-1 unabhängige Prognosefaktoren für das OS in unserem Kollektiv darstellen. Dieses gilt, sowohl für die Plasma- als auch für die Gewebeexpression.

Es fanden sich zwei Studien, die die prognostische Bedeutung der VCAM-1-Expression im Plasma für das OS untersucht haben. Eine kleine Kohortenstudie mit 36 Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigte signifikant erhöhte VCAM-1-Werte im Plasma bei 5 Patientinnen, die innerhalb von 11 Monaten des Follow-ups (Range: 0-23 Monate) verstarben im Gegensatz zu den 31 Patientinnen mit niedrigeren VCAM-1-Werten im Plasma, die noch am Leben waren ($2147,2 \pm 702,8$ vs. $1557,4 \pm 470$ ng/ml, $p = 0,02$). In diesem kleinen Kollektiv waren hohe VCAM-1-Werte prognostisch ungünstig für das OS (32). Daneben konnten Tas et al. in einem etwas größeren Kollektiv mit 50 Patientinnen mit EOC zeigen, dass die VCAM-1-Expression im Plasma keinen Einfluss auf das OS hat (70). Daneben fanden sich drei Untersuchungen, die die VCAM-1-Expression im Mausmodell (33), im Mesothel von Patientinnen mit EOC (61) und im Tumorgewebe beim EOC (28) untersucht haben. J.K. Slack-Davis et al. konnten in einem Mausmodell zeigen, dass durch die Behandlung der Mäuse mit einem Antikörper, der die VCAM-1-Funktion blockiert die Tumormasse reduziert werden konnte und das Gesamtüberleben der Mäuse verlängert wurde (62). Scalici et al. konnten eine ungünstige Prognose bei Patientinnen mit Expression von VCAM-1, zwar nicht direkt im Tumorgewebe, aber im Mesothel von Patientinnen mit EOC zeigen. In einer retrospektiven Studie untersuchten sie 54 Patientinnen mit fortgeschrittenem EOC. VCAM-1 positive Patientinnen hatten ein kürzeres medianes Gesamtüberleben (44 vs. 79 Monate, $p = 0,035$) und progressionsfreies Überleben (18 vs. 67 Monate, $p = 0,010$). Damit ist die VCAM-1-Expression im Mesothel negativ assoziiert mit dem OS und PFS im EOC. Dies ist insbesondere im Lichte früherer Daten überzeugend, die darauf hindeuten, dass die anhaltende VCAM-1-Expression während der Behandlung ein Indikator für die Platinresistenz ist (60). Huang et al. konnten in ihrem Kollektiv mit $n = 251$ in ihrer multivariaten Analyse nach Adjustierung für die etablierten Prognosefaktoren bei einem Follow-up von 5 Jahren VCAM-1 im Tumorgewebe als unabhängigen Prognosefaktor identifizieren. Hierbei war das

mediane Gesamtüberleben im Vergleich der Gruppen mit hoher und niedriger VCAM-1-Expression kürzer in der Gruppe mit hoher VCAM-1-Expression (HR: 1.937, 95 %-KI: 1.054-2.424, $p = 0,033$) (28).

Zusammenfassend zeigten damit fünf Untersuchungen, dass die Expression von VCAM-1 prognostisch ungünstig für das OS ist und mit einem kürzeren OS assoziiert ist. Dieses ließ sich in unserer Untersuchung nicht reproduzieren. Eine mögliche Ursache könnte in der statistischen Auswertung liegen, da wir sehr streng in unserem multivariaten Regressionsmodell alle etablierten Prognosefaktoren berücksichtigt haben. Daneben ist zu berücksichtigen, dass es aufgrund der methodischen Unterschiede (Immunhistochemie vs. ELISA) eine fehlende Quantifizierung besteht und entsprechend auch Vergleichbarkeit. So definierten Scalici et al. Proben, die eine Expression > 50 % zeigten als positiv und diejenigen, mit < 50 % VCAM-1-Nachweis als negativ (60). Huang et al. wiederum definierten Proben mit einer hohen VCAM-1 Expression, wenn > 30 % VCAM-1 positive Zellen in der Immunhistochemie vorlagen (28). Wir analysierten VCAM-1 als kontinuierliche Variable und entsprechend wurde die niedrigste nachweisbare Konzentration gewertet. Durch die unterschiedliche Einteilung und Cutoffdefinition für VCAM-1 sind die Korrelationsergebnisse der einzelnen Untersuchungen mit den etablierten Prognosefaktoren, dem OS und PFS sehr kritisch zu werten.

5.5 Progressionsfreies Überleben

Das mediane progressionsfreie Überleben lag bei 18 Monaten (95 %-KI: 15,4-20,6 Monate). Dieses entspricht den Angaben in der Literatur (11). In der univariaten Analyse konnten signifikante Cutoff-Werte für die VCAM-1 Expression im Gewebe ($p = 0,003$) und der ICAM-1/VCAM-1-Ratio im Plasma ($p = 0,03$) für das PFS berechnet werden. Keine Signifikanz, aber dennoch ein Trend konnte für ICAM-1 im Gewebe mit $p = 0,065$ gezeigt werden. Als erste Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass ICAM-1 und VCAM-1 im Gewebe einen unabhängigen Marker für das PFS darstellen. In der multivariaten Analyse konnte nach Berücksichtigung der klassischen Prognosefaktoren für ICAM-1 im Gewebe für Werte zwischen 200-670 ng/ml (HR: 2,23, 95 %-KI: 1,11-4,71, $p = 0,024$) und für Werte > 670 ng/ml (HR: 2,49, 95 %-KI: 1,22-5,01, $p = 0,012$) und für VCAM-1 im Gewebe für Werte > 88 ng/ml (HR: 2,5, 95 %-KI: 1,44-4,43, $p = 0,001$) eine Korrelation mit dem PFS gezeigt werden. Hierbei war bei höherer ICAM-1 oder VCAM-1 Expression das PFS kürzer. Die Ursache für diesen Zusammenhang kann anhand der vorliegenden Studie nicht eindeutig geklärt werden. Auf eine Kausalität kann auf der Grundlage dieser Ergebnisse nicht geschlossen werden, da nicht sicher ausgeschlossen werden kann, ob nicht andere nicht berücksichtigte Faktoren ursächlich stärker am Ergebnis beteiligt waren. V. a. da bekannt ist, dass die Expression dieser Adhäsionsmoleküle starken

Schwankungen in demselben Individuum unterliegen. So konnten zum Beispiel starke Schwankungen in der ICAM-1 und VCAM-1-Konzentration bei Patienten vor und nach Dialyse gezeigt werden (20). Zwar waren diese nachgewiesenen intraindividuellen Schwankungen im Plasma der Patientinnen, jedoch ist ein ähnlicher Effekt für das Gewebe möglich und nicht auszuschließen. Eine mögliche Erklärung für das signifikant bessere PFS von ICAM-1 positiven Zellen könnte in dem Ansprechen auf eine Cisplatintherapie liegen. Auch, wenn Cisplatin nicht zur aktuellen Standardchemotherapie für das EOC gehört, sondern Carboplatin. Carboplatin ist ein Cisplatin-Abkömmling. Die Wirkung gegen Krebszellen beruht auf einer Vernetzung der DNA-Moleküle, die dadurch funktionsunfähig werden und es letztendlich zur Apoptose kommt. Im größeren Sinne hat das Cisplatin einen ähnlichen Wirkmechanismus. Die Wirkung beruht auf einer Hemmung der DNA-Replikation durch Querverknüpfungen zweier benachbarter Guanin-Basen eines DNA-Strangs, sodass die DNA-Struktur gestört wird und die Zelle funktionsunfähig wird. Die Frage, ob eine direkte Beziehung zwischen ICAM-1 Expression und Cisplatinresistenz besteht, ist nicht sicher geklärt. In der Literatur konnte ein Anstieg der ICAM-1-Expression nach Therapie mit Cisplatin berichtet werden (86, 87). Dieses könnte auf eine DNA-Methylierung zurückgeführt werden. Es wird vermutet, dass es durch eine Cisplatintherapie entweder zu einer Induktion von ICAM-1 (indirekt über eine DNA-Methylierung oder direkt) kommt oder zu einer Selektion von Zellen mit höherer ICAM-1-Expression kommt, da diejenigen Zellen mit niedriger ICAM-1-Expression durch Cisplatintherapie getötet werden (75). Scalici et al. konnten wie oben für das OS bereits beschrieben eine VCAM-1 Expression im Mesothel von Patientinnen mit EOC mit einer ungünstigeren Prognose mit kürzerem PFS in Zusammenhang bringen. VCAM-1 positive Patientinnen hatten ein kürzeres medianes progressionsfreies Überleben (18 vs. 67 Monate, $p = 0,010$). Auch konnte diese Arbeitsgruppe einen Zusammenhang mit der VCAM-1 Expression und dem Tumorstadium zeigen. Alle Proben von Patientinnen waren im FIGO-Stadium I negativ. In den FIGO-Stadien II waren es 29 % und in den FIGO-Stadien III und IV waren es 73 % positive. Der Großteil der Patientinnen mit fortgeschrittenem EOC hatte damit einen positiven VCAM-1 Nachweis. Anders war dieses jedoch in der Subgruppe der Patientinnen mit FIGO-Stadium III/IV, die vorher eine neoadjuvante Carboplatintherapie erhalten hatten. Dieses deutet darauf hin, dass die Carboplatintherapie eine Rolle in der VCAM-1 Expression spielen könnte. Um dieser Frage weiter nachzugehen wurde die VCAM-1 Expression in einem Mausmodell weiter differenziert untersucht. Die Carboplatinbehandlung von Mäusen mit platin sensitiven Tumoren zeigte eine verringerte VCAM-1-Expression, die mit einer verringerten Tumorlast korrelierte. Mäuse mit platinresistenten Tumoren behielten nach der Behandlung eine erhöhte VCAM-1-Expression und Tumorbelastung bei. Dieses deutet darauf hin, dass die anhaltende VCAM-1-Expression während der Behandlung

ein Indikator für die Platinresistenz sein könnte (28, 57). Dieses könnte zum einen das bessere PFS für Patientinnen mit niedrigeren VCAM-1-Werten erklären und bietet einen Ansatz VCAM-1 im Gewebe als potenziellen Marker für das Ansprechen (“platinsensible vs. platinresistent”) auf eine platinbasierte Chemotherapie zu untersuchen und so möglicherweise die Behandlung dieser Patientinnen zu verbessern. Kritisch anzumerken bezüglich der Hypothese, dass die VCAM-1 Expression ein Marker für die Response to Platin sein könnte, ist jedoch in unserem Kollektiv, dass die VCAM-1 Expression im Gewebe nicht mit dem Ansprechen auf die Platintherapie (Response to Platinum) korrelierte.

5.6 Die Rolle von ICAM-1 und VCAM-1 im Ovarialkarzinom

Die Rolle, die ICAM-1 beim EOC spielt, ist noch nicht vollständig verstanden. In den beiden bisher veröffentlichten Arbeiten zu ICAM-1 und dem EOC wurde die Expression auf genetischer Ebene (RNA-Quantifizierung) untersucht und es konnte eine reduzierte ICAM-1 Expression auf Ovarialkarzinomzellen gezeigt werden (58, 59).

Arnold et al. konnten zeigen, dass ICAM-1 in Ovarialkarzinomgewebeproben reduziert exprimiert wurde im Vergleich zu gesundem Ovar. Hierzu verglich die Arbeitsgruppe das Expressionsniveau von fünf gesunden Ovarien mit 20 primären Ovarialkarzinomen und 14 Ovarialkarzinomzelllinien. Zusätzlich konnten Arnold et al. eine positive Assoziation mit der ICAM-1-Expression und dem Überleben zeigen. Die Prognose für ICAM-1 positive Tumoren war besser als die von ICAM-1 negativen Tumoren ($p = 0,03$). Hier wurde erstmalig die Hypothese aufgestellt, dass das Expressionsniveau von ICAM-1 bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom von klinischer Relevanz sein könnte (59). De Groote et al. zeigten ebenfalls eine reduzierte Expression von ICAM-1 im Ovarialkarzinomgewebe. Zusätzlich konnten sie durch Einsatz von artifiziellen Transkriptionsfaktoren die ICAM-1-Expression auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene signifikant steigern. Diese Hochregulation von endogenem ICAM-1 führte zu einer Abnahme des Zellwachstums (58). Auch für Lymphome, das kolorektale Karzinom, Kopf- und Halstumore zeigten sich ein geringeres Tumorwachstum und eine niedrigere Metastasierungsrate, sowie eine insgesamt bessere Prognose bei Patienten mit ICAM-1 positiven Tumoren im Vergleich zu ICAM-1 negativen Tumoren (51-53). Zur genau gegenteiligen Beobachtung kam jedoch eine Reihe von anderen Studien für das Mammakarzinom, das Melanom und kolorektale Karzinom, die eine hohe ICAM-1 Expression fanden (47, 48, 54, 84).

Wir bestimmten ICAM-1 im Plasma und Gewebe von Patientinnen mit EOC mittels ELISA. Wir konnten im Gegensatz zu den beiden Arbeiten von Arnold et al. und Groote et al. zu ICAM-1 und Ovarialkarzinomen eine ICAM-1 Expression mit dem EOC in Zusammenhang bringen (58, 59). Bei

der Korrelation mit den klassischen Prognosemarkern zeigte sich für ICAM-1 im Gewebe eine negative Assoziation mit dem Alter ($p = 0,036$) und eine positive für CA-125 ($p = 0,026$), das FIGO-Stadium ($p = 0,032$), das Vorhandensein von Aszites ($p = 0,018$) und Metastasen ($p = 0,036$) als Ausdruck einer fortgeschrittenen Erkrankung. Für das OS konnte kein Zusammenhang mit der ICAM-1-Expression in unserer Untersuchung gezeigt werden. Für das PFS konnte die ICAM-1 Expression im Gewebe als unabhängiger Marker für das PFS identifiziert werden. Hier war eine hohe ICAM-1 Expression prognostisch für das PFS ungünstig.

Die genaue Rolle von ICAM-1 in der Tumorphathologie ist letztlich nicht endgültig geklärt. Die Grundfunktionen liegt in der Leukozytenadhäsion und -migration und hier rüber in der Inflammation, Angiogenese und Metastasierung (17). Die Funktion von ICAM-1 kann durchaus abhängig von der Tumorart und abhängig von der gleichzeitigen Expression anderer Adhäsionsmoleküle unterschiedlich sein (47, 48, 51-54, 84). Es gibt keine plausible Erklärung für die teilweise konträr scheinenden Rollen des ICAM-1 in der Tumorentstehung. Die Daten deuten insgesamt darauf hin, dass die Rolle von ICAM-1 nicht einseitig ist, sondern in mehreren Signaltransduktionswegen und Interaktionen eine Rolle spielt und dass diese abhängig und maßgeblich bestimmt wird von den Konzentrationen anderer Membranrezeptoren bzw. Moleküle in der Umgebung. So limitiert die Produktion von Prostaglandin E2 in der Tumormikroumgebung die Expression von ICAM-1 in Tumorzellen und führt damit zur Reduktion der zytotoxischen Effektivität von T-Zellen. Dieses konnte im Mausmodell für Melanome gezeigt werden (57). Andere Mechanismen über die ICAM-1 die Metastasenbildung moduliert sind postuliert worden, u. a. eine Interaktion von ICAM-1 mit einer Erhöhung des Hemmstoffes von Matrixmetalloproteinasen. Es wird vermutet, dass solide Tumorzellen an endotheliales ICAM-1 via MUC-1 binden. Durch die Tumorbindung kommt es zu einer Autohochregulation von Tumor-ICAM-1, was weitere Botenstoffe ausschüttet, die Makrophagen anlocken. Diese wiederum binden an Tumor-ICAM-1 und setzen weitere Chemokine und Zytokine frei, die letztendlich über verschiedene Zwischenschritte die Integrität des Endothels aufheben und damit eine Invasion der malignen Zellen ins Gewebe möglich machen. Die Tumorzell-ICAM-1-Expression bestimmt dadurch das Potenzial Metastasen zu bilden und bestimmt damit letztlich die Aggressivität der Tumorerkrankung (47).

Zusammenfassend ist ICAM-1 ein vielversprechendes Zielmolekül aufgrund seiner oben beschriebenen Funktionen insbesondere seiner Rolle in der Zellmigration, in dem es die Passage von Zellen über das Endothel, was Voraussetzung für ein invasives Tumorwachstum und Metastasierung ist, ermöglicht. Aufgrund der Komplexität von Signaltransduktionswegen und Anfälligkeit bzw. Modulation durch die Mikroumgebung, kann die Rolle von ICAM-1 bei der

Endothelpassage sehr variieren. Wie oben beschrieben sind abweichende und teils konträre Ergebnisse abhängig von der Tumorentität für ICAM-1 gefunden worden. Dieses deutet darauf hin, dass keine verallgemeinernde Funktion von ICAM-1 angenommen werden kann. Diese divergierenden Befunde bisheriger Studien zur ICAM-1-Funktion müssen für das EOC weiter differenziert untersucht werden.

Zahlreiche Studien haben die Rolle von VCAM-1 in der Tumorentstehung und -ausbreitung für verschiedene Malignome untersucht und konnten eine erhöhte VCAM-1-Expression mit malignem entartetem Gewebe und Plasma in Zusammenhang bringen (28-31). In den bisherigen Arbeiten zum VCAM-1 und Ovarialkarzinom konnte eine erhöhte VCAM-1 Expression gezeigt werden (33, 60-62). Die Rolle von VCAM-1 im Ovarialkarzinom und dessen Metastasierung ist noch nicht verstanden. Unsere Untersuchung ist die erste, die die VCAM-1-Expression im EOC im Gewebe und Plasma dieser Patientinnen untersucht hat. In vorausgegangenen Arbeiten wurde die VCAM-1-Expression vorwiegend in Mesothelzellen von Patientinnen mit Ovarialkarzinom und in malignen Zelllinien untersucht. Der Nachweis erfolgte hier mittels Immunhistochemie oder Westernblot (33, 60-62). In unserer Untersuchung konnte in jeder Probe im Plasma und Gewebe VCAM-1 nachgewiesen werden. Eine Assoziation zwischen der Expression und im Plasma und mit den etablierten Prognosefaktoren fand sich in unserer Untersuchung nicht. Wir konnten jedoch als erste Arbeitsgruppe VCAM-1 im Gewebe als unabhängigen Marker für das PFS identifizieren.

Typische Metastasierungswege bei soliden Tumoren sind die lymphogene, hämatogene oder ein lokal invasives Wachstum. Der Metastasierungsweg im EOC stellt hier eine Besonderheit dar. Hier erfolgt die Tumorausbreitung über das Mesothel, einer aus einer Zellreihe bestehenden Zellschicht, in die Peritonealhöhle. Die Arbeitsgruppe von J.M. Scaliccia und J.K. Slack-Davis in Virginia, USA bearbeitet das Thema VCAM-1 bei Patientinnen mit EOC primär im Mesothel (33, 60-62). Aufgrund der oben beschriebenen besonderen Bedeutung des Mesothels für die Ausbreitung beim EOC werden diese Arbeiten auch, wenn sie nicht direkt die VCAM-1 Expression im Tumorgewebe untersucht haben, hier in die Diskussion miteingeschlossen (33, 60-62). Jill K. Slack-Davis et. al konnten in der Immunhistochemie eine Überexpression von VCAM-1 auf Mesothelzellen von Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigen. 13 von 14 Biopsien mit Mesothelzellen waren positiv bei nachgewiesenem Ovarialkarzinom. Im Vergleich dazu erbrachten bei gesunden Frauen nur 6 von 15 Biopsien einen positiven VCAM-1 Nachweis ($p = 0,005$). Weiterhin wurde die Ovarialkarzinomzellmigration durch das Mesothel quantifiziert. Eine Inhibition der VCAM-1-Funktion führte zu einer Abnahme der Zellmigration durch das Mesothel. In einem Mausmodell wurde durch VCAM-1-Antikörpergabe das Tumorstadium reduziert und das

Überleben verlängert. Daraus wurde geschlossen, dass die VCAM-1- α 4h1-Integrin-Interaktion eine Rolle in der Metastasierung über das Mesothel spielt und einen Ansatz für neue zielgerichtete Therapien darstellen könnte (60). In einer weiteren Untersuchung der gleichen Arbeitsgruppe konnte die VCAM-1 Expression als Marker für eine Peritonealkarzinose und als Marker für die Response auf eine platinhaltige Chemotherapie identifiziert werden (61). Die Höhe der VCAM-1 Expression korrelierte mit dem Tumorstadium und dem Metastasierungsgrad. Im Mausmodell konnte bei carboplatinsensitiven Tumoren eine reduzierte VCAM-1 Expression gezeigt werden, dieses korrelierte mit einer niedrigeren Tumorlast. Mäuse mit platinresistenten Tumoren zeigten weiterhin auch nach Chemotherapie erhöhte Werte von VCAM-1. Darauf wurde geschlossen, dass die VCAM-1-Expression während der Therapie als Marker für eine Platinresistenz gewertet werden könnte (61). Eine Korrelation mit dem OS oder PFS erfolgte in dieser Untersuchung allerdings nicht. In einer anderen Arbeit wurde die VCAM-1 Expression im Mesothel von 54 Patientinnen mit fortgeschrittenem EOC untersucht. Für VCAM-1-Expression konnte eine negative Assoziation mit dem OS (44 vs. 79 Monate, $p = 0,035$) und dem PFS (18 vs. 67 Monate, $p = 0,01$) gezeigt werden (33). Je höher die VCAM-1 Expression war, desto kürzer waren OS und PFS. Die Untersuchungen im Ovarialkarzinomgewebe selbst wurden nur von Huang et al. (28) durchgeführt. Tas et al. (28) und Jakimovska et al. (32) führten Untersuchungen von VCAM-1 im Plasma durch. Huang et al. und Jakimovska et al. konnten eine erhöhte VCAM-1 Expression mit dem Ovarialkarzinom in Zusammenhang bringen. Bei Tas et al. fand sich kein Zusammenhang. Huang et al. untersuchten 251 Gewebepreparate von EOC, sowie Ovarialkarzinomzelllinien auf ihre VCAM-1-Expression mittels Immunhistochemie und korrelierten diese mit klinisch-pathologischen Parametern. Es wurde festgestellt, dass eine hohe VCAM-1 Expression, definiert als $> 30\%$ VCAM-1 positive Zellen in der Immunhistochemie mit dem Ansprechen auf chirurgische und chemotherapeutische Medikamente ($p = 0,025$) und dem Alter bei Diagnosestellung ($p = 0,008$) zusammenhängt. Die multivariate Analyse zeigte, dass die VCAM-1 Expression in Tumorzellen ein unabhängiger Prognosefaktor für das OS war (HR: 1.937, 95 %-KI: 1.054-2.424, $p = 0,033$). Ovarialkarzinomzellen mit VCAM-1 Überexpression hatten im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen eine erhöhte Zellmigration und ein verstärktes Wachstum von Xenotransplantattumoren bei Mäusen. Dies gibt Hinweise dafür, dass VCAM-1 eine wichtige Rolle beim Wachstum von EOC und als Prognosefaktor und neuartiges therapeutisches Ziel für das EOC weiter untersucht werden sollte (28). Jakimovska et al. zeigten in einer kleinen Studie mit 36 Patientinnen mit Ovarialkarzinom signifikant erhöhte VCAM-1-Werte im Plasma bei 5 Patientinnen, die innerhalb von 11 Monaten des Follow-ups verstarben im Gegensatz zu den 31 Patientinnen, die noch am Leben waren (32). Damit war eine höhere VCAM-1 Expression prognostisch ungünstig für

das OS. Tas et al. untersuchten als einzige in einer Studie mit 50 Patientinnen mittels ELISA die VCAM-1 Expression im Serum. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Serumwerten für VCAM-1 zwischen den EOC Patientinnen und gesunden Kontrollen ($p = 0,24$). Auch konnte kein Zusammenhang mit der VCAM-1 Expression im Plasma und dem OS gezeigt werden (70).

Es lässt sich damit zusammenfassen, dass eine erhöhte VCAM-1 Expression im Mesothel von Patientinnen mit EOC korreliert (33, 60-62). Die Untersuchung im Ovarialkarzinomgewebe selbst (28) zeigte einen Zusammenhang zwischen VCAM-1 und EOC. Die Untersuchungen im Plasma (32, 70) zeigten divergierende Befunde. Zusammenfassend ist auch VCAM-1 trotz der heterogenen Befunde ein vielversprechendes Zielmolekül aufgrund seiner oben beschriebenen Funktionen, insbesondere seiner Rolle in der Zellmigration, in dem es die Passage von Zellen aus dem intravaskulären Bereich über das Endothel, was Voraussetzung für ein invasives Tumorwachstum und Metastasierung ist, ermöglicht. Über diesen Weg spielt VCAM-1 auch eine wesentliche Rolle bei der Angiogenese. Aufgrund der Komplexität von Signaltransduktionswegen und Anfälligkeit bzw. Modulation durch die Mikroumgebung, kann die Rolle von VCAM-1 bei der Endothelpassage sehr variieren. Wie oben beschrieben sind abweichende und teils konträre Ergebnisse abhängig von der Tumorentität für VCAM-1 gefunden worden. Dieses deutet darauf hin, dass keine verallgemeinernde Funktion von VCAM-1 angenommen werden kann. Diese divergierenden Befunde bisheriger Studien zur VCAM-1-Funktion müssen für das EOC weiter differenziert untersucht werden.

Eine mögliche Erklärung für das signifikant bessere PFS von ICAM-1 positiven Zellen könnte sein, dass ICAM-1 positive Zellen einen Marker für die Response to Platin darstellen und diese voraussagen können. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Befunde zweier Arbeitsgruppen, die eine höhere ICAM-1 Expression bei platinresistenten Tumoren fanden als bei platinsensiblen (86, 87, 75). Einschränkend sei hier jedoch erwähnt, dass hierbei Cisplatin untersucht wurde und in der klinischen Routine Carboplatin für das EOC eingesetzt wird. Dieses deutet darauf hin, dass die Carboplatintherapie eine Rolle in der VCAM-1 Expression spielen könnte. Die Carboplatin-Behandlung von Mäusen mit platinsensitiven Tumoren zeigte eine verringerte VCAM-1 Expression, die mit einer verringerten Tumormasse korrelierte. Mäuse mit platinresistenten Tumoren behielten nach der Behandlung eine erhöhte VCAM-1 Expression und Tumormasse bei. Dieses deutet darauf hin, dass die anhaltende VCAM-1 Expression während der Behandlung ein Indikator für die Platinresistenz ist (28, 61). Dieses könnte zum einen das bessere PFS für Patientinnen mit niedrigeren VCAM-1-Werten erklären und bietet einen Ansatz VCAM-1 im

Gewebe als potenziellen Marker für das Ansprechen (“platinsensible vs. platinresistent”) auf eine platinbasierte Chemotherapie zu untersuchen und so möglicherweise die Behandlung dieser Patientinnen zu verbessern. Kritisch anzumerken bezüglich der Hypothese, dass die VCAM-1 Expression ein Marker für die Response to Platin sein könnte, ist jedoch in unserem Kollektiv, dass die VCAM-1 Expression im Gewebe nicht mit dem Ansprechen auf die Platintherapie korrelierte.

5.7 Allgemeine Diskussion

Unsere Arbeit ist die erste Untersuchung, die die ICAM-1 und VCAM-1 Proteinexpression mittels ELISA im EOC im Gewebe und Plasma quantifiziert hat. In vorangegangenen Studien erfolgte der Proteinnachweis lediglich optisch mittels Immunhistochemiefärbung in vorwiegend malignen Zelllinien (59), im Mausmodell (28) oder aber in Mesothelzellen von Patientinnen mit Ovarialkarzinom (33, 60-62). Eine besonders zu betonende Stärke unserer Untersuchung liegt in der guten und homogenen Datenqualität. Das OVCAD-Register wurde standardisiert, prospektiv und multizentrisch mit gynäkologischen Zentren mit hoher Expertise angelegt, mit dem vordefinierten Ziel eine Datenbank mit hoher Qualität zu etablieren, die die Identifikation und Validierung von neuen molekularen Markern für die Früherkennung und Prädiktoren für die Therapieresponse ermöglicht. Das Kollektiv ist repräsentativ für das EOC mit leitliniengerechter Therapie mit radikaler Tumorreduktion bei 88,9 % der Patientinnen und einer makroskopisch tumorfreien Rate von 68,4 % und einer platinbasierten Chemotherapie bei 98,2 %. Weitere Vorteile sind die vergleichsweise hohe Patientenzahl (n = 275), die standardisierte Asservierung von biologischem Material (Gewebe, Plasma und Aszites), die geringe „Lost to follow-up“ Rate und vergleichsweise lange Follow-up-Zeit von 72 Monaten (Median 37 Monate). All dieses führt zu einer sehr hohen Datenqualität und minimiert so u. a. Selektionsbias und Patienten- und Probenvariabilität, die die Ergebnisse verzerren oder negativ beeinflussen könnten.

Weiterhin wird eine hohe Datenqualität unserer Untersuchung durch den Einsatz von standardisierten Kits zum Proteinnachweis, welche eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität für die beiden Proteine, ICAM-1 und VCAM-1, haben gewährleistet. Untersuchungen mit den verwendeten Testkits der Firma R&D Systems konnten bereits zahlreich erfolgreich publiziert werden, sowohl für ICAM-1 (88-91), als auch für VCAM-1 (88, 92, 93).

Potenzielle neue Biomarker werden üblicherweise als kontinuierliche Variablen ausgedrückt. Um eine kontinuierliche Variable in die klinische Entscheidungsfindung mit einbeziehen zu können, ist es notwendig, Cutoffwerte zu bestimmen, um eine Stratifizierung in zwei Gruppen vornehmen zu

können, die dann unterschiedliche Therapien erhalten. Hierfür gibt es verschiedene Methoden, wie z. B. die Minimierung von p-Werte oder die Maximierung von kombinierten Endpunkten zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität (94). Die Literatur ist voll von neuen Biomarkern. Allerdings finden nur nach Jahrzehnten von Forschungsarbeiten vereinzelt Biomarker Eingang in die klinische Routine. Ursache hierfür ist oft eine Überschätzung der neuen Biomarker in den ersten Untersuchungen und dementsprechend eine schlechte Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit. Für die Überschätzung spielt die Cutoffwertoptimierung eine wesentliche Rolle insbesondere, wenn multiple Cutoffwerte untersucht werden und das Problem der multiplen Hypothesentestung ignoriert wird (95). Für die Etablierung von neuen Cutoffwerten ist ein systematisches Vorgehen und eine bessere Objektivierbarkeit notwendig (96). Unsere Cutoffwerte wurden mit dem „Cutoff-Finder“ berechnet. Dieses ist eine etablierte Webapplikation zur Optimierung von Cutoffwerten für Biomarker, die versucht oben genannte Punkte zu optimieren. Für über 200 publizierte Biomarker wurde der Cutoff-Finder zur Findung von Cutoffwerten bereits verwendet und in der US National Library of Medicine (PubMed) bereits über 400 Mal zitiert. Der Vorteil des Cutoff-Finders liegt in der einfachen Anwendung. Fünf verschiedene Methoden für die Cutoffwertfindung werden verwendet. Eine Methode basiert auf der Verteilung des zu untersuchenden Biomarkers und weitere Methoden optimieren die Korrelation der Gruppenbildung in Bezug auf ein bestimmtes Outcome wie in unserer Arbeit z. B. das OS und PFS. Um eine Überschätzung der definierten Cutoff-Werte zu vermeiden wird die Robustheit der Werte überprüft für unterschiedliche Grenzwerte. Diese werden graphisch dargestellt und die Konfidenzintervalle für die einzelnen Werte werden angegeben. In unserer multivariaten Regressionsanalyse zeigten die durch den Cutoffwerte Finder etablierten Cutoffwerte nach Adjustierung für die etablierten Prognosefaktoren für ICAM-1 und VCAM-1 im Gewebe, signifikante Unterschiede für das PFS. Trotz oben beschriebener Optimierung der Cutoffwertfindung müssen diese Ergebnisse sehr kritisch betrachtet werden. Ob diese Grenzwerte klinisch etabliert werden können muss auch hier in einem größeren Kollektiv reproduziert werden.

Formal handelt es sich bei unserer Untersuchung um eine explorative retrospektive Studie. Damit birgt dieses methodenkritisch betrachtet einige Nachteile. Sie liefern zwar Hinweise auf Zusammenhänge zwischen den untersuchten Faktoren und einem Ergebnis und tragen somit zur Hypothesengenerierung bei, jedoch liefern sie keine wissenschaftlichen Beweise.

Weiterhin ist bezüglich der statistischen Auswertung anzumerken, dass in unserer Auswertung multiples Testen erfolgt ist. Daher kann es sein, dass die Korrelation der ICAM-1 Expression im Gewebe mit fünf etablierten Prognosefaktoren durch das multiple Testen bedingt sein kann und damit falsch positiv ist. Hier ist wiederum zu erwähnen, dass sich durch das multiple Testen statistisch

gesehen auch Zusammenhänge mit VCAM-1 oder Ratio ICAM-1/VCAM-1 im Plasma und Gewebe hätten zeigen können. Dies ist allerdings nicht der Fall gewesen, sondern zeigte sich tatsächlich nur für ICAM-1 im Gewebe, was die Hypothese, dass es sich hierbei um einen Zufall durch multiples Testen handelt relativiert. Explorative Auswertungen wie unsere können sehr detailliert und anschaulich die Stichprobe beschreiben und neue Zusammenhänge aufdecken. Da wir jedoch keine Rückschlüsse auf die Grundgesamtheit vorgenommen haben, entfällt die Notwendigkeit der Adjustierung Statistik zur Vermeidung einer Alpha-Fehler-Kumulierung.

Eine weitere Limitierung der Aussagekraft unserer Ergebnisse besteht durch den fehlenden Vergleich mit gesundem Gewebe, benignen Veränderungen und Borderlinetumoren. In Hinblick auf die prognostische Aussagekraft dieser Studie konnten in der statistischen Analyse nicht alle Parameter berücksichtigt werden, die die Kanzerogenese des Ovarialkarzinoms mit beeinflussen. In der multivariaten Analyse konnte nur ein Zusammenhang für die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 im Gewebe mit dem PFS gezeigt werden. Inwiefern ein Zusammenhang mit weiteren pathogenetischen Einflussfaktoren, die als Risikofaktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinomes bestehen, wie z. B. Mutationen im BRCA-Gen und Schwangerschaften, bleibt in der Analyse allerdings unberücksichtigt. Auch sind Faktoren, wie eine Niereninsuffizienz, ein gestörter Glucosestoffwechsel und eine KHK nachgewiesene Faktoren, die die ICAM-1 und VCAM-1 Expression beeinflussen, nicht erhoben worden. Deren möglicher Einfluss kann damit nicht untersucht werden, auch wäre die Fallzahl hierfür zu gering. Die hier erhobenen Ergebnisse müssen nun in einer prospektiven Studie mit einer größeren Patientenzahl bestätigt und weiter differenziert untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist das gynäkologische Malignom mit der schlechtesten Prognose. Die 5-Jahresmortalität für alle Tumorstadien liegt weiterhin weltweit bei 30-40 % (1, 11). Ursachen sind zum einen fehlende spezifische Symptome, die späte Diagnosestellung in einem bereits fortgeschrittenen FIGO-Stadium aufgrund fehlender spezifischer Marker und Programme für die Früherkennung. Zum anderen aber auch aufgrund einer fehlenden spezifischen Therapie. Das Grundtherapiekonzept für alle EOC liegt in einer radikalen Tumorresektion (Debulking-OP) gefolgt von einer platinhaltigen Chemotherapie. Diese Chemotherapie beruht darauf, dass sie unspezifisch sich gegen alle schnell proliferierenden Zellen richtet. Daher ist ein selektives Vorgehen gegen

Tumorzellen im Sinne einer „targeted therapy“ anzustreben. Für die Prognoseabschätzung und den Therapieverlauf gibt es zwar klinisch-pathologische Parameter, diese sind jedoch unzureichend. Daher ist zusätzlich die Etablierung von molekularen Markern für die Prognoseabschätzung und den Therapieverlauf notwendig, um eine individualisierte Therapie ermöglichen zu können (3, 4).

Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sind Zellmembranproteine, die bei der Kommunikation zwischen Zellen und Matrixgewebe und bei der Zellmigration jenseits des Epithels, welches die Grundlage für eine Metastasierung darstellt, eine entscheidende Rolle spielen. Daneben tragen sie zur Tumorangiogenese und Metastasierung bei (16, 23-25, 34, 35). Aufgrund dieser Funktionen sind sie daher ein erfolgversprechendes Zielmolekül zum einen im Sinne einer „targeted therapy“, aber auch als potenzieller Früherkennungs- oder Verlaufsmarker.

In vorausgegangenen Studien konnten hierfür für andere Malignome (25-27, 47) und auch für das Ovarialkarzinom bereits erste Hinweise gesammelt werden. Hier zeigten sich teils konträre Befunde. Für ICAM-1 im Gewebe konnte in zwei Arbeiten eine reduzierte Expression im EOC gezeigt werden (58, 59). Beim VCAM-1 im Gewebe war es genau andersherum. Hier konnte eine erhöhte VCAM-1 Expression mit dem EOC in Zusammenhang gebracht werden (28). Die Proteinexpression von VCAM-1 im Plasma mittels ELISA im EOC ist laut Ergebnissen der Literaturrecherche bisher nur in einer Arbeit von Tas et al. (70) untersucht worden. Für ICAM-1 im Plasma im EOC zeigten sich keine Studien. Die vorliegende explorative Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle von ICAM-1 und VCAM-1 für das Ovarialkarzinom leisten.

Hierfür wurden Gewebe- und Plasmaproben von Patientinnen aus dem OVCAD-Register auf die Proteinexpression von ICAM-1 und VCAM-1 mittels ELISA untersucht. Die Ergebnisse wurden in einer retrospektiven Analyse ausgewertet. Untersucht wurde zum einen die Expression im Plasma und Gewebe und ob eine Korrelation dazwischen besteht. Daneben erfolgte eine Korrelation mit den etablierten Prognosefaktoren. In einem Zwischenschritt wurden Cutoff-Werte für ICAM-1 und VCAM-1 berechnet, da es keine Normwerte für das EOC für beide Proteine gibt. Abschließend wurde die Proteinexpression auf ihre prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben untersucht.

Wir konnten als erste Arbeitsgruppe ICAM-1 und VCAM-1 in jeder Probe nachweisen. Die mediane Konzentration im Gewebe lag für ICAM-1 bei 766 ng/ml (Range: 16,7-2061 ng/ml) und für VCAM-1 bei 279 ng/ml (Range: 1,59-1141 ng/ml). Im Plasma lagen die Werte für ICAM-1 bei 353 ng/ml (Range: 135-966 ng/ml) und für VCAM-1 bei 1451 ng/ml (Range: 539-3894 ng/ml). Die Mediane für die Ratio im Gewebe lagen bei 6,9 und im Plasma bei 0,24. Damit lag eine sehr große Spannweite

vor. Diese Größenordnung ist vergleichbar mit Ergebnissen von vorausgegangenen Studien, die ICAM-1 und VCAM-1 bei anderen Erkrankungen mittels ELISA nachgewiesen haben (71-74). Ein quantitativer Vergleich der Biomarker (ICAM-1 und VCAM-1) in ng/ml für das EOC mit den bisherigen Ergebnissen von Forschungsarbeiten aus der Literaturrecherche ist nicht möglich, da kein ELISA Anwendung fand, sondern vorwiegend ein immunhistochemischer Nachweis (33, 60-62) oder Western-Blot (32) erfolgte. Eine Ausnahme stellt lediglich die Arbeit von Jakimovska et al. dar, die bei 36 Patientinnen mit EOC VCAM-1 im Serum mit Durchflusszytometrischen Assay auf Perlenbasis nachwies. Die Werte für Serum-VCAM-1 lagen im Bereich von $1639,3 \pm 537,2$ ng/ml und zeigen damit wie bei unserer Analyse, dass eine große Spannweite der Werte besteht. Die absoluten Werte von Jakimovska et al. waren vergleichbar mit unseren (32).

Zusammenfassend konnten wir ICAM-1 und VCAM-1 in allen Proben nachweisen. Dieser Fakt ist bereits bemerkenswert, da dieses nicht in jedem Gewebetyp der Fall ist. Für z. B. Magenmukosa und Mammagewebe fällt der Nachweis mittels Immunhistochemie negativ aus (48, 49). Hier ist allerdings methodenkritisch anzumerken, dass der immunhistochemische Nachweis v. a. im Bereich von sehr niedrigen Konzentrationen weniger sensitiv ist als der Nachweis mittels ELISA. Dadurch sind ein direkter Vergleich und Übertragbarkeit aufgrund der methodischen Unterschiede nicht 1 zu 1 möglich. Eine Korrelation der beiden Proteine zwischen Plasma und Gewebe fand sich nicht. Hier konnten in der Literatur für andere Malignome teils Korrelationen nachgewiesen werden und teils nicht (77, 78). Möglicherweise konnte ein tatsächlich vorhandener Zusammenhang aufgrund der vielen Faktoren, die die Plasmaexpression nachgewiesen beeinflussen, wie eine systemische Inflammation und endotheliale Dysfunktion, nicht gezeigt werden (71-74). Es besteht jedoch eine Korrelation zwischen der VCAM-1 und ICAM-1 Expression im Plasma ($\rho = 0,275$, $p < 0,001$) und der Expression von VCAM-1 und ICAM-1 im Gewebe ($\rho = 0,62$, $p < 0,0001$). Dieser Zusammenhang im Plasma wurde in vorausgegangenen Untersuchungen ebenfalls gezeigt und bestätigt sich in unserer Arbeit (71-74). Bei der Korrelation mit den klassischen Prognosemarkern zeigte sich für ICAM-1 im Gewebe eine negative Assoziation mit dem Alter ($p = 0,036$) und eine positive für CA-125 ($p = 0,026$), das FIGO-Stadium ($p = 0,032$), das Vorhandensein von Aszites ($p = 0,018$) und Metastasen ($p = 0,036$). Aszites ist immer pathologisch und Ausdruck der Tumormikroumgebung. Es ist möglich, dass für das invasive Tumorwachstum und erhöhten Stoffwechselaktivität im Tumor eine erhöhte Produktion von ICAM-1 im Gewebe notwendig ist (82). Aszites, CA-125 und das Vorhandensein von Metastasen wiederum sind mit fortschreitendem Tumorstadium gegeben, was die Assoziation mit dem ICAM-1 erklären könnte. Da VCAM-1 vorwiegend auf vaskulären Endothelzellen exprimiert wird und nachrangig im Tumorgewebe (16) selbst, kann es sein, dass dieses der Grund dafür ist, dass sich oben genannte Korrelationen nur für

ICAM-1 zeigten und nicht für VCAM-1. Für das OS haben die beiden Proteine keine prognostische Bedeutung. Nach Adjustierung für die etablierten Prognosefaktoren konnten in der multivariaten Analyse für ICAM-1 und VCAM-1 im Gewebe beide Proteine als unabhängige Prognosefaktoren für das PFS identifiziert werden. Für ICAM-1 für mittlere Werte zwischen 200-670 ng/ml (HR: 2,23, 95 %-KI: 1,11-4,71, $p = 0,024$) und für hohe Werte > 670 ng/ml (HR: 2,49, 95 %-KI: 1,22-5,01, $p = 0,012$) und für VCAM-1 im Gewebe für Werte > 88 ng/ml (HR: 2,5, 95 %-KI: 1,44-4,43, $p = 0,001$). Hierbei war das PFS kürzer, je höher die Expression.

Welche Rolle ICAM-1 und VCAM-1 in der Tumorbilogie des fortgeschrittenen EOC spielen, kann anhand dieser Untersuchung nicht beantwortet werden. Ob ein kausaler Zusammenhang von ICAM-1 und VCAM-1 und dem EOC besteht oder sie lediglich einen Marker für die Schwere der Erkrankung darstellen, kann nicht beantwortet werden. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte auf der Grundlage von vorangegangenen Studien in einem Zusammenhang mit der Platinsensitivität der Ovarialkarzinome liegen. Zuvor konnte gezeigt werden, dass VCAM-1 in carboplatinresistenten Tumoren erhöht exprimiert wird. Die platinsensitiven Tumore zeigten im Tiermodell niedrigere VCAM-1-Werte vor Therapiebeginn und die platinresistenten zeigten erhöhte Werte. Selbst nach der platinhaltigen Chemotherapie blieben die Werte erhöht (28, 57). Für ICAM-1 konnte dieses nur für Cisplatin gezeigt werden (86, 87). Dieses könnte auch erklären, warum ICAM-1 und VCAM-1 im Gewebe nur prognostische Faktoren für das PFS sind und nicht für das OS. Die hier erhobenen Ergebnisse müssen nun in einer prospektiven Studie mit einer größeren Patientenzahl bestätigt und weiter differenziert untersucht werden. Insbesondere sollte hierbei ein Schwerpunkt auf die Funktion von ICAM-1 im Gewebe vom EOC gelegt werden. Es sollten Untersuchungen erfolgen, die sowohl den Effekt einer Induktion als auch den Effekt einer Inhibition von ICAM-1 im EOC und ebenfalls im gesunden Ovargewebe bearbeiten.

7 Literaturverzeichnis

1. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med.* 2017;14(1):9-32.
2. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland für 2013/2014.* 11. Ausgabe. Berlin, 2017
3. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, Gaudet MM, Jemal A, Siegel RL. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(4):284-96.
4. Birrer MJ. Ovarian cancer: targeting the untargetable. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2014:13-5.
5. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. *Biomed Res Int.* 2014;2014:934261.
6. Neff RT, Senter L, Salani R. BRCA mutation in ovarian cancer: testing, implications and treatment considerations. *Ther Adv Med Oncol.* 2017;9(8):519-31.
7. Li K, Husing A, Fortner RT, Tjonneland A, Hansen L, Dossus L, Chang-Claude J, Bergmann M, Steffen A, Bamia C, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Palli D, Mattiello A, Agnoli C, Tumino R, Onland-Moret NC, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Gram IT, Weiderpass E, Sanchez-Cantalejo E, Chirlaque MD, Duell EJ, Ardanaz E, Idahl A, Lundin E, Khaw KT, Travis RC, Merritt MA, Gunter MJ, Riboli E, Ferrari P, Terry K, Cramer D, Kaaks R. An epidemiologic risk prediction model for ovarian cancer in Europe: the EPIC study. *Br J Cancer.* 2015;112(7):1257-65.
8. Henderson JT, Webber EM, Sawaya GF. Screening for Ovarian Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA.* 2018;319(6):595-606.
9. Yawn BP, Barrette BA, Wollan PC. Ovarian cancer: the neglected diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2004;79(10):1277-82.
10. Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer.* 2000;89(10):2068-75.
11. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 3.0, 2019, AWMF-Registernummer: 032/035OL, verfügbar unter: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>, [abgerufen am: 18.04.2019]
12. Champer M, Huang Y, Hou JY, Tergas AI, Burke WM, Hillyer GC, Ananth CV, Neugut AI, Hershman DL, Wright JD. Adherence to treatment recommendations and outcomes for women with ovarian cancer at first recurrence. *Gynecol Oncol.* 2018;148(1):19-27.
13. Makar AP, Baekelandt M, Trope CG, Kristensen GB. The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 1995;56(2):175-80.
14. Kong DH, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4).
15. Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK, Chi DS. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19(2):91-104.
16. Mojcik CF, Shevach EM. Adhesion molecules: a rheumatologic perspective. *Arthritis Rheum.* 1997;40(6):991-1004.
17. Abd El-Kader SM, Saiem Al-Dahr MH. Weight loss improves biomarkers endothelial function and systemic inflammation in obese postmenopausal Saudi women. *Afr Health Sci.* 2016;16(2):533-41.
18. Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, Kutarska E, Kolesnik OO, Ivanchenko VV, Dudnichenko AS, Aleknaviciene B, Razbadauskas A, Gore M, Ganea-Motan E, Ciuleanu T, Wimberger P, Schmittel A, Schmalfeldt B, Burges A, Bokemeyer C, Lindhofer H, Lahr A, Parsons SL. The trifunctional antibody

catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer*. 2010;127(9):2209-21.

19. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med*. 1999;107(1):85-97.
20. Birdsall HH, Lane C, Ramser MN, Anderson DC. Induction of VCAM-1 and ICAM-1 on human neural cells and mechanisms of mononuclear leukocyte adherence. *J Immunol*. 1992;148(9):2717-23.
21. Ardehali A, Laks H, Drinkwater DC, Ziv E, Drake TA. Vascular cell adhesion molecule-1 is induced on vascular endothelia and medial smooth muscle cells in experimental cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*. 1995;92(3):450-6.
22. van Oosten M, van de Bilt E, de Vries HE, van Berkel TJ, Kuiper J. Vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on rat liver cells after lipopolysaccharide administration in vivo. *Hepatology*. 1995;22(5):1538-46.
23. www.rndsystems.com, R&D Systems. "VCAM-1" Verfügbar unter: <https://www.rndsystems.com/resources/articles/vcam-1-cd106>. [abgerufen am: 19.04.2018]
24. Garton KJ, Gough PJ, Philalay J, Wille PT, Blobel CP, Whitehead RH, Dempsey PJ, Raines EW. Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM 17). *J Biol Chem*. 2003;278(39):37459-64.
25. Huang J, Zhang J, Li H, Lu Z, Shan W, Mercado-Uribe I, Liu J. VCAM1 expression correlated with tumorigenesis and poor prognosis in high grade serous ovarian cancer. *Am J Transl Res*. 2013;5(3):336-46.
26. Shin J, Kim J, Ryu B, Chi SG, Park H. Caveolin-1 is associated with VCAM-1 dependent adhesion of gastric cancer cells to endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*. 2006;17(5-6):211-20.
27. Vonderheide RH, Tedder TF, Springer TA, Staunton DE. Residues within a conserved amino acid motif of domains 1 and 4 of VCAM-1 are required for binding to VLA-4. *J Cell Biol*. 1994;125(1):215-22.
28. Chen Q, Massague J. Molecular pathways: VCAM-1 as a potential therapeutic target in metastasis. *Clin Cancer Res*. 2012;18(20):5520-5.
29. Jakimovska M, Cerne K, Verdenik I, Kobal B. Circulating serum sVCAM-1 concentration in advanced ovarian cancer patients: correlation with concentration in ascites. *Radiol Oncol*. 2014;48(3):307-13.
30. Carter RA, Wicks IP. Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): a multifaceted regulator of joint inflammation. *Arthritis Rheum*. 2001;44(5):985-94.
31. Scalici JM, Thomas S, Harrer C, Raines TA, Curran J, Atkins KA, Conaway MR, Duska L, Kelly KA, Slack-Davis JK. Imaging VCAM-1 as an indicator of treatment efficacy in metastatic ovarian cancer. *J Nucl Med*. 2013;54(11):1883-9.
32. Yukami T, Hasegawa M, Matsushita Y, Fujita T, Matsushita T, Horikawa M, Komura K, Yanaba K, Hamaguchi Y, Nagaoka T, Ogawa F, Fujimoto M, Steeber DA, Tedder TF, Takehara K, Sato S. Endothelial selectins regulate skin wound healing in cooperation with L-selectin and ICAM-1. *J Leukoc Biol*. 2007;82(3):519-31.
33. Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Bang H, Heiss G, Duncan BB, Folsom AR, Pankow JS. Circulating oxidised low-density lipoprotein and intercellular adhesion molecule-1 and risk of type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetologia*. 2007;50(1):36-42.
34. Covarrubias M, Ware LB, Kawut SM, De Andrade J, Milstone A, Weinacker A, Orens J, Lama V, Wille K, Bellamy S, Shah C, Demissie E, Christie JD, Lung Transplant Outcomes G. Plasma intercellular adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2007;7(11):2573-8.
35. Cottone S, Mule G, Nardi E, Vadala A, Lorito MC, Guarneri M, Arsena R, Palermo A, Cerasola G. C-reactive protein and intercellular adhesion molecule-1 are stronger predictors of oxidant stress than blood pressure in established hypertension. *J Hypertens*. 2007;25(2):423-8.
36. Brake DK, Smith EO, Mersmann H, Smith CW, Robker RL. ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291(6):C1232-9.

37. Madej A, Okopien B, Kowalski J, Haberka M, Herman ZS. Plasma concentrations of adhesion molecules and chemokines in patients with essential hypertension. *Pharmacol Rep.* 2005;57(6):878-81.
38. Kang X, Wang F, Xie JD, Cao J, Xian PZ. Clinical evaluation of serum concentrations of intercellular adhesion molecule-1 in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2005;11(27):4250-3.
39. Etienne-Manneville S, Chaverot N, Strosberg AD, Couraud PO. ICAM-1-coupled signaling pathways in astrocytes converge to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and TNF-alpha secretion. *J Immunol.* 1999;163(2):668-74.
40. Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, Rossmann MG. The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(8):4140-5.
41. Timmerman I, Daniel AE, Kroon J, van Buul JD. Leukocytes Crossing the Endothelium: A Matter of Communication. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2016;322:281-329.
42. Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC, Jr. ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery.* 2007;141(6):705-7.
43. Maruo Y, Gochi A, Kaihara A, Shimamura H, Yamada T, Tanaka N, Orita K. ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1 level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer. *Int J Cancer.* 2002;100(4):486-90.
44. Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwable W, Riethmuller G. De novo expression of intercellular adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(2):641-4.
45. Koshiol J, Castro F, Kemp TJ, Gao YT, Roa JC, Wang B, Nogueira L, Araya JC, Shen MC, Rashid A, Hsing AW, Hildesheim A, Ferreccio C, Pfeiffer RM, Pinto LA. Association of inflammatory and other immune markers with gallbladder cancer: Results from two independent case-control studies. *Cytokine.* 2016;83:217-25.
46. Terol MJ, Lopez-Guillermo A, Bosch F, Villamor N, Cid MC, Rozman C, Campo E, Montserrat E. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 in non-Hodgkin's lymphoma: relationship with tumor dissemination and prognostic importance. *J Clin Oncol.* 1998;16(1):35-40.
47. Maeda K, Kang SM, Sawada T, Nishiguchi Y, Yashiro M, Ogawa Y, Ohira M, Ishikawa T, Hirakawa YSCK. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2002;9(3):511-4.
48. Shirai A, Furukawa M, Yoshizaki T. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope.* 2003;113(11):1955-60.
49. Guo P, Huang J, Wang L, Jia D, Yang J, Dillon DA, Zurakowski D, Mao H, Moses MA, Auguste DT. ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(41):14710-5.
50. Ogawa Y, Hirakawa K, Nakata B, Fujihara T, Sawada T, Kato Y, Yoshikawa K, Sowa M. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in invasive breast cancer reflects low growth potential, negative lymph node involvement, and good prognosis. *Clin Cancer Res.* 1998;4(1):31-6.
51. Schroder C, Witzel I, Muller V, Krenkel S, Wirtz RM, Janicke F, Schumacher U, Milde-Langosch K. Prognostic value of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137(8):1193-201.
52. Straetemans T, Berrevoets C, Coccoris M, Treffers-Westerlaken E, Wijers R, Cole DK, Dardalhon V, Sewell AK, Taylor N, Verweij J, Debets R. Recurrence of melanoma following T cell treatment: continued antigen expression in a tumor that evades T cell recruitment. *Mol Ther.* 2015;23(2):396-406.
53. de Groote ML, Kazemier HG, Huisman C, van der Gun BT, Faas MM, Rots MG. Upregulation of endogenous ICAM-1 reduces ovarian cancer cell growth in the absence of immune cells. *Int J Cancer.* 2014;134(2):280-90.

54. Arnold JM, Cummings M, Purdie D, Chenevix-Trench G. Reduced expression of intercellular adhesion molecule-1 in ovarian adenocarcinomas. *Br J Cancer*. 2001;85(9):1351-8.
55. Krzystyniak J, Ceppi L, Dizon DS, Birrer MJ. Epithelial ovarian cancer: the molecular genetics of epithelial ovarian cancer. *Ann Oncol*. 2016;27 Suppl 1:i4-i10.
56. Scalici JM, Arapovic S, Saks EJ, Atkins KA, Petroni G, Duska LR, Slack-Davis JK. Mesothelium expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) is associated with an unfavorable prognosis in epithelial ovarian cancer (EOC). *Cancer*. 2017;123(6):977-84.
57. Scalici JM, Harrer C, Allen A, Jazaeri A, Atkins KA, McLachlan KR, Slack-Davis JK. Inhibition of alpha4beta1 integrin increases ovarian cancer response to carboplatin. *Gynecol Oncol*. 2014;132(2):455-61.
58. Slack-Davis JK, Atkins KA, Harrer C, Hershey ED, Conaway M. Vascular cell adhesion molecule-1 is a regulator of ovarian cancer peritoneal metastasis. *Cancer Res*. 2009;69(4):1469-76.
59. Chekerov R, Braicu I, Castillo-Tong DC, Richter R, Cadron I, Mahner S, Woelber L, Marth C, Van Gorp T, Speiser P, Zeillinger R, Vergote I, Sehouli J. Outcome and clinical management of 275 patients with advanced ovarian cancer International Federation of Obstetrics and Gynecology II to IV inside the European Ovarian Cancer Translational Research Consortium-OVCAD. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(2):268-75.
60. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One*. 2012;7(12):e51862.
61. Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry J, Scolyer RA, Davies MJ, Heinzelmann M, Kalish LH, Bali A, Kench JG, Edwards LS, Vanden Bergh PM, Hacker NF, Sutherland RL, O'Brien PM. Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(13):4427-36.
62. Spizzo G, Went P, Dirnhofner S, Obrist P, Moch H, Baeuerle PA, Mueller-Holzner E, Marth C, Gastl G, Zeimet AG. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2006;103(2):483-8.
63. Kim JH, Herlyn D, Wong KK, Park DC, Schorge JO, Lu KH, Skates SJ, Cramer DW, Berkowitz RS, Mok SC. Identification of epithelial cell adhesion molecule autoantibody in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(13):4782-91.
64. Tas F, Karabulut S, Serilmez M, Ciftci R, Duranyildiz D. Clinical significance of serum epithelial cell adhesion molecule (EPCAM) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) levels in patients with epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol*. 2014;35(4):3095-102.
65. El Amine M, Sohawon S, Lagneau L, Gaham N, Noordally S. Plasma levels of ICAM-1 and circulating endothelial cells are elevated in unstable types 1 and 2 diabetes. *Endocr Regul*. 2010;44(1):17-24.
66. Papayianni A, Alexopoulos E, Giamalis P, Gionanlis L, Belechri AM, Koukoudis P, Memmos D. Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular events. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(3):435-41.
67. Turhan H, Saydam GS, Erbay AR, Ayaz S, Yasar AS, Aksoy Y, Basar N, Yetkin E. Increased plasma soluble adhesion molecules; ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin levels in patients with slow coronary flow. *Int J Cardiol*. 2006;108(2):224-30.
68. Clausen P, Jacobsen P, Rossing K, Jensen JS, Parving HH, Feldt-Rasmussen B. Plasma concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 are elevated in patients with Type 1 diabetes mellitus with microalbuminuria and overt nephropathy. *Diabet Med*. 2000;17(9):644-9.
69. Kowalewska M, Nowak R, Chechlińska M. Implications of cancer-associated systemic inflammation for biomarker studies. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1806(2):163-71.
70. Christiansen I, Sundstrom C, Kalkner KM, Bring J, Totterman TH. Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) are elevated in advanced stages of non-Hodgkin's lymphomas. *Eur J Haematol*. 1999;62(3):202-9.

71. Christiansen I, Sundstrom C, Totterman TH. Elevated serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) closely reflect tumour burden in chronic B-lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1998;103(4):1129-37.
72. Morisaki N, Saito I, Tamura K, Tashiro J, Masuda M, Kanzaki T, Watanabe S, Masuda Y, Saito Y. New indices of ischemic heart disease and aging: studies on the serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in patients with hypercholesterolemia and ischemic heart disease. *Atherosclerosis.* 1997;131(1):43-8.
73. Chowdhury MA, Xiubin Z, Wei H, Chenghao G. Cancer antigen-125 and ICAM-1 are together responsible for ascites in liver cirrhosis. *Clin Lab.* 2014;60(4):653-8.
74. Kobayashi E, Ueda Y, Matsuzaki S, Yokoyama T, Kimura T, Yoshino K, Fujita M, Kimura T, Enomoto T. Biomarkers for screening, diagnosis, and monitoring of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21(11):1902-12.
75. Pruumboom WM, Bac DJ, van Dijk AP, Garrelds IM, Tak CJ, Bonta IL, Wilson JH, Zijlstra FJ. Levels of soluble intercellular adhesion molecule 1, eicosanoids and cytokines in ascites of patients with liver cirrhosis, peritoneal cancer and spontaneous bacterial peritonitis. *Int J Immunopharmacol.* 1995;17(5):375-84.
76. Matsuoka H, Eura M, Chikamatsu K, Nakano K, Kanzaki Y, Masuyama K, Ishikawa T. Low doses of anticancer drugs increase susceptibility of tumor cells to lysis by autologous killer cells. *Anticancer Res.* 1995;15(1):87-92.
77. Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest.* 2002;110(6):835-42.
78. Yu W, Jin C, Lou X, Han X, Li L, He Y, Zhang H, Ma K, Zhu J, Cheng L, Lin B. Global analysis of DNA methylation by Methyl-Capture sequencing reveals epigenetic control of cisplatin resistance in ovarian cancer cell. *PLoS One.* 2011;6(12):e29450.
79. Choi YL, Xuan YH, Shin YK, Chae SW, Kook MC, Sung RH, Youn SJ, Choi JW, Kim SH. An immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in gallbladder lesions. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(5):591-601.
80. Wright JK, Hayford K, Tran V, Al Kibria GM, Baqui A, Manajir A, Mahmud A, Begum N, Siddiquee M, Kain KC, Farzin A. Biomarkers of endothelial dysfunction predict sepsis mortality in young infants: a matched case-control study. *BMC Pediatr.* 2018;18(1):118.
81. Tian Y, Gawlak G, O'Donnell JJ, 3rd, Mambetsariev I, Birukova AA. Modulation of Endothelial Inflammation by Low and High Magnitude Cyclic Stretch. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153387.
82. Kearney CJ, Cullen SP, Tynan GA, Henry CM, Clancy D, Lavelle EC, Martin SJ. Necroptosis suppresses inflammation via termination of TNF- or LPS-induced cytokine and chemokine production. *Cell Death Differ.* 2015;22(8):1313-27.
83. McDonald CR, Darling AM, Conroy AL, Tran V, Cabrera A, Liles WC, Wang M, Aboud S, Urassa W, Fawzi WW, Kain KC. Inflammatory and Angiogenic Factors at Mid-Pregnancy Are Associated with Spontaneous Preterm Birth in a Cohort of Tanzanian Women. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134619.
84. Mok CC, Soliman S, Ho LY, Mohamed FA, Mohamed FI, Mohan C. Urinary angiostatin, CXCL4 and VCAM-1 as biomarkers of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1):6.
85. Oleszowsky M, Seidel MF. Serum Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Overexpression Is a Disease Marker in Patients with First-Time Diagnosed Antinuclear Antibodies: A Prospective, Observational Pilot Study. *Biomed Res Int.* 2018;2018:8286067.
86. Perkins NJ, Schisterman EF. The inconsistency of "optimal" cutpoints obtained using two criteria based on the receiver operating characteristic curve. *Am J Epidemiol.* 2006;163(7):670-5.
87. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, Statistics Subcommittee of the NCI EWGoCD. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol.* 2005;23(36):9067-72.

88. Mazumdar M, Glassman JR. Categorizing a prognostic variable: review of methods, code for easy implementation and applications to decision-making about cancer treatments. *Stat Med.* 2000;19(1):113-32.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Saba Suhail Arain, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „ICAM-1 und VCAM-1 Expression in Tumorgewebe und Plasma von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom“ 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum: 12.02.2020

Unterschrift: Saba Suhail Arain

9 Lebenslauf

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

10 Publikationsliste

1. Tscholl V, Lsharaf AK, Lin T, Bellmann B, Biewener S, Nagel P, Suhail S, Lenz K, Landmesser U, Roser M, Rillig A. Two years outcome in patients with persistent atrial fibrillation after pulmonary vein isolation using the second-generation 28-mm cryoballoon. *Heart Rhythm*. 2016 Sep;13(9):1817-22.
2. Bellmann B, Roser M, Suhail S, Muntean BG. Is it ventricular tachycardia or not? Multiple ICD therapies in a patient with ischemic cardiomyopathy. *Minerva Cardioangiol*. 2016 Aug;64(4):499-500.
3. Muntean BG, Roser M, Suhail S, Nagel P, Bellmann B. Wide QRS complex tachycardia in a patient with ischemic cardiomyopathy and prior ventricular tachycardia ablation. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*. 2015 Dec;26(4):367-70.
4. Tölle A, Suhail S, Jung M, Jung K, Stephan C. Fatty acid binding proteins (FABPs) in prostate, bladder and kidney cancer cell lines and the use of IL-FABP as survival predictor in patients with renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2011 Jul 18;11:302.

11 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Jalid Sehouli meinen Dank aussprechen für die Überlassung des Promotionsthemas und in seiner Arbeitsgruppe mitwirken zu können. Ich danke ihm insbesondere für seine Unterstützung in der Endphase der Arbeit. Bei Frau Prof. Dr. med. Elena Ioana Braicu möchte ich mich für die initiale Betreuung bei der experimentellen Laborarbeit bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern der Tumorbank Ovarian Cancer (TOC) für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Insbesondere bei Frau Monika Mentze möchte ich mich für ihre große Geduld und stetige Hilfsbereitschaft bedanken. Sie hat maßgeblich zum Gelingen des experimentellen Teiles der Arbeit und bei der Auswertung der Laborergebnisse beigetragen.

Herrn Dr. Rolf Richter danke ich für seinen statistischen Beistand und große Geduld.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen und Freunden, Sara Nasser, Mani Nassir und Magdalena Balczerek, für ihre Geduld, fachlichen Beistand und Begleitung über den gesamten Zeitraum der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinem Chef, Herrn Prof. Dr. med. Landmesser, und meinen rhythmologischen Oberärzten, PD Dr. med. Philipp Attanasio, Dr. med. Martin Huemer und Dr. med. Patrick Nagel, für Ihr Vertrauen und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinen lieben Eltern und meinem Ehemann, Imad, aussprechen für den unermüdlichen Zuspruch, Geduld, emotionale Unterstützung und Vertrauen, die sie mir stets über viele Jahre ausgesprochen und entgegengebracht haben.

Mein Dank gilt nicht zuletzt allen Patientinnen, die durch ihre Einwilligung an der OVCAD-Studie die Voraussetzung für diese Arbeit geliefert haben. Ihr Schicksal verpflichtet uns, unsere Forschung nach bestem Wissen und Gewissen weiter voranzutreiben.