



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Expression und Verteilung der Östrogenrezeptor- Isoformen (ER) Alpha (α) und Beta (β) im Ovarialkarzinomgewebe

verfasst von

Katharina Ocko

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger

DANKSAGUNG

Zu Anfang möchte ich Ao.Univ.-Prof. Dr. Theresia Thalhammer (Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung an der Medizinischen Universität Wien) meinen aufrichtigen Dank für ihre Geduld und Hilfe sowie auch für die Unterstützung bezüglich des wissenschaftlichen Arbeitens und des schnellen und sorgfältigen Begutachtens dieser Arbeit aussprechen. Ebenso dankbar bin ich für die großartige Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge von meinem Betreuer Herrn Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger.

Ich danke Ao.Prof. MD Peter Pietschmann, dem Leiter der Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathophysiologie am Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Universität Wien für die Unterstützung und das gute Arbeitsklima.

Weiteres danke ich auch Dr. Stefanie Aust von der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie der Medizinischen Universität Wien für die hervorragende Zusammenarbeit und Hilfe bei den Daten. Besonderer Dank auch Fr. Prof. Dan Cascire-Tong und Hrn. Prof. Robert Zellinger für die Bereitstellung der Präparate und Daten aus dem OVCAD Projekt.

Mein spezieller Dank geht an Frau Erika Bajna (Medizinische-Technische Analytikerin) und meine KollegInnen Felicitas Mungenast und Lukas Klameth für ihre Kooperation und die konstante Unterstützung während meiner Zeit am AKH Wien. Meine gesamten Kenntnisse über das praktische Arbeiten bezüglich meiner Diplomarbeit und der Datenanalyse habe ich ihnen zu verdanken.

Auch allen meinen weiteren KollegInnen am Institut für Pathophysiologie danke ich sehr. Ich habe die Zusammenarbeit sehr geschätzt und war stets dankbar für die Unterstützung, die ich von ihnen bekommen habe.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Adelheid und Peter Ocko bedanken. Sie haben mich stets in allen Belangen unterstützt. Ihnen widme ich von Herzen meine Diplomarbeit.

Abkürzungen

3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
AF1/2	Domäne mit aktivierender Funktion 1/2
AKR1C3	Hydroxysteroid- Dehydrogenase 17B5
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
BAF	Barrier-to-Autointegration-Factor
BMI	Body Mass Index
BRAF	Protoonkogen des B-rapidly accerlerated fibrosarcoma Proteins
BRCA1/2	Breast Cancer Type 1/2 Protein
CA 125/ 72-4	Cancer Antigen 125/ 72-4
CCC	Klarzellkarzinom
CT	Computertomographie
CTNNB1	β -Catenin
CYP19a1	Aromatase
DBD	bindende Domäne
DHEA/ DHEAS	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endometroides Karzinom
EPT	endoskopisch durchgeführte Papillotomie
ERE	Estrogen-Responsive-Element
ER- α/β	Östrogenrezeptor α/β
FDA	Federal Drug Agency
FDG	^{18}F -Fluordesoxyglucose
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GPR30	Glykoprotein 30
H12	Helix 12
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HET	Hormon-Ersatz-Therapie
HGSC	Hochgradig seröses Karzinom
HNF1	hepatocyte nuclear factor 1
HNPCC	hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom

Abkürzungen: Fortsetzung

HSP	Hitze-Schock-Protein
HVL	Hypophysenvorderlappen
IRS	Immune Reactive Score
KRAS	Protoonkogen des K-Rat Sarcoma Proteins
LBD	Liganden bindende Domäne
LGSC	niedergradig seröses Karzinom
LH	Luteinisierendes Hormon
MC	muzinöses Karzinom
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NHR	Nukleärer Hormonrezeptor
NTD	N-terminale Domäne
p53	Tumorsuppressor Protein
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PR-A/B	Progesteronrezeptor A/B
PTEN	Phosphatase, multifunktionelles Enzym
ROI	Region of Interest
SERM	Selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
SHBG	Sexualhormonbindendes Globulin
STIC	seröse intraepitheliale Karzinome
STS	Steroidsulfatase
SULT	Sulfotransferase
TNM	Tumor-Lymphknoten-Metastasen Staging System
TVS	transvaginale Sonographie
US	Ultraschall
WT1	Wilms-Tumor-Protein

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACT (DEUTSCH)	1
ABSTRACT	3
Abkürzungen	5
1 EINLEITUNG	5
1.1 Die Anatomie des Ovars	5
1.2 Die Physiologische Funktion der Ovarien	6
1.3 Ovarialkarzinom	6
1.3.1 Epidemiologie	6
1.3.2 Ätiologie	8
1.3.3 Klinik und Diagnostik.....	8
1.3.4 Zusätzliche Faktoren für die Prognose	9
1.3.5 Therapie.....	10
1.3.6 Karzinomstaging nach FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique)	11
1.3.7 Klassifikation der epithelialen Ovarialkarzinome	13
1.3.8 Weitere Unterteilung der epithelialen Ovarialkarzinome	15
1.4 Hormonelle Regulation	19
1.5 Steroidbiosynthese	19
1.6 Bedeutung von Östrogen	20
1.7 Der Östrogenrezeptor	22
1.7.1 Spezifische Regionen im Östrogenrezeptor.....	23
1.7.2 SERMs.....	26
1.7.3 Expressionsunterschiede von ER- α und ER- β zwischen Krebs- und gesundem Gewebe.....	26
2 ZIEL DER DIPLOMARBEIT	28
3 MATERIALIEN UND METHODEN	29
3.1 Verwendete Materialien und Mischungsverhältnis	29
3.2 Patientinnen	30
3.3 Färbemethoden	31
3.4 Automatisierte mikroskopische Imageanalyse und Datenauswertung ...	34
4 ERGEBNISSE	37

4.1	ER-α Expression in Ovarialkarzinomen	37
4.2	Nachweis von ER-α mittels IHC	37
4.3	Prognostische Bedeutung von ER-α bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom	40
4.3.1	Berechnung des Einflusses von klinischen Parametern und ER- α auf den progressionsfreien Zeitraum; Daten für das Gesamtkollektiv (n=110)	42
4.3.2	Berechnung des Einflusses von klinischen Parametern und ER- α auf das Gesamtüberleben; bezogen auf das Gesamtkollektiv (n=110)	43
4.3.3	Quantitative univariate Analyse der Bedeutung der ER- α -Expression im Gesamtkollektiv (n=110) für das Gesamtüberleben.....	44
4.3.4	Einfluss von ER- α auf den progressionsfreien Zeitraum bei Patientinnen mit serösen Tumoren (n=92)	46
4.3.5	Einfluss von ER- α auf die Gesamtüberlebenszeit, berechnet für die Gruppe der Patientinnen mit serösen Tumoren (n=92)	47
4.4	ER-β Expression in ovariellen Karzinompräparaten	49
4.5	Histologische Beschreibung des immunhistochemisch gefärbten Gewebe mit ER-β	50
4.6	Nachweis von ER-β mittels IHC	51
4.7	Vergleich von positiv gefärbten Zellkerne der Patientinnen B024 und B018 mit ER-α und ER-β	53
5	DISKUSSION	54
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	57
7	TABELLENVERZEICHNIS	58
8	LITERATUR	59
9	CURRICULUM VITAE	77

ABSTRACT (DEUTSCH)

Einleitung: Eierstockkrebs ist maligne Erkrankung, die sehr lange unerkannt bleibt und dadurch eine besonders schlechte Prognose hat. Es ist noch nicht abgeklärt, aus welchen Vorstufen sich Ovarialkarzinome entwickeln. Es ist lediglich bekannt, dass endokrine Faktoren, Genmutationen (z.B. von BRCA 1 oder 2) und auch Lebensstilfaktoren das Risiko einer Erkrankung erhöhen. Ovarialkarzinome wachsen schnell und neigen zu einer frühzeitigen Metastasenbildung. Ein weiteres Problem stellt die Chemoresistenz der Ovarialkarzinome gegenüber Standardzytostatika dar und auch eine hormonelle Therapie, wie dies bei Brustkrebs Standard ist, hat sich bis jetzt nicht als erfolgreich herausgestellt. Hier sind weitere Studien zur Erforschung der Rolle der Steroidhormone und ihrer Rezeptoren notwendig. Die beiden isomeren Subtypen des Östrogenrezeptors (ER- α und - β) übernehmen im Körper unterschiedliche Aufgaben. So steht ER- α beispielsweise für Zellproliferation und ER- β für östrogen-abhängige Apoptose. Es wird angenommen, dass ein erhöhtes Vorhandensein von ER- β eine bessere Prognose darstellt. Ausgehend von den unterschiedlichen Funktionsbereichen der Östrogenrezeptoren, stehen diese im Interesse für weitere Untersuchungen.

Ziele: In dieser Studie wurden an Ovarialkarzinomproben von Patientinnen die Lokalisierung und Verteilung der Östrogenrezeptoren α und β untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den klinischen Daten (Alter, FIGO-Klassifikation, Tumorigradung, vollständige Tumorsektion, progressionsfreier Zeitraum, gemessen am Rezidiv, und der Gesamtüberlebenszeit) in Relation gesetzt.

Methoden: Für ER- α wurden insgesamt 243 Karzinomproben (Microarrays) immunhistochemisch eingefärbt. Für ER- β war eine immunhistochemische Bestimmung auf Microarrays aufgrund des geringen Vorhandenseins des Rezeptors im erkrankten Gewebe nicht möglich. ER- β wurde somit auf größeren Gewebsschnitten von neun Patientinnen immunhistochemisch untersucht. Durch die Immunreaktion der positiv gefärbten Rezeptoren ER- α und ER- β wurden anschließend mit Hilfe des TissueFAXS[®] Cell Analysis System eingescannt und digitalisiert. Der Prozentsatz an positiven Zellen sowie auch die Farbintensität wurden daraufhin mit Hilfe der HistoQuest[®] Software analysiert und der "immunoreaktive Score" (IRS) als Maß für die Rezeptorenanzahl in den Stroma- und Tumorbereichen bestimmt. Diese Methode wurde für die Ovarialkarzinomproben etabliert und validiert. Die statistische Auswertung wurde für ER- α mit dem Programm SPSS 19.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA) vorgenommen. Bei ER- β wurde auf eine statistische Analyse aufgrund der geringen

Rezeptordichte im Gewebe verzichtet und es wurde aber eine Charakterisierung der Tumorsubtypen erzielt.

Resultate und Schlussfolgerung: Eine statistische Auswertung für ER- β war aufgrund des geringen Vorhandenseins des Rezeptors im erkrankten Gewebe nicht möglich. Die statistische Datenauswertung ergab einen signifikanten Unterschied für ER- α Expression (IRS) im Tumor und im jeweiligen Stroma. ER- α wird fast ausschließlich in Tumorzellen exprimiert. In Immunzellen im Stroma wird ER- α nicht exprimiert. Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Einfluss von ER- α auf das Gesamtüberleben im Gesamtkollektiv ($p=0,045$), wie auch in der Gruppe der Patientinnen mit serösen Tumoren ($p=0,037$). Zudem erweist sich ER- α in der multivariaten Analyse als unabhängig signifikanter Einflussfaktor auf den progressionsfreien Zeitraum ($p=0,046$). Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung von ER- α bei Ovarialkarzinomen und können daher auch für therapeutische Überlegungen, z. B. Anwendung von SERMs von großer Bedeutung sein. Daher wäre es wichtig weitere Studien mit einer hormonellen Therapie bei Patientinnen die diesen Rezeptor überexprimieren in einem großen, aussagekräftigen Kollektiv durchzuführen.

ABSTRACT

Introduction: Ovarian Cancer is a malignant disease, which is mostly detected at an advanced stage. Consequently, the prognosis for affected women is rather poor. It is still not known, how ovarian cancer develops. It is only established that endocrine factors, different gene mutations such as mutation in BRCA 1 or 2 and also lifestyle factors increase the risk of ovarian cancer. Ovarian cancer grows fast and has a high metastasis rate. Another problem is the high chemoresistance rate of ovarian cancer cells towards standard chemotherapeutic treatment. Unlike to breast cancer, there is also no established hormonal therapy. To account for these shortcomings, further studies are needed to explore the role of steroid hormones and their receptors. The two subtypes of estrogen receptors, namely ER- α and ER- β , have different functions. ER- α is responsible for cell proliferation, while ER- β accounts for estrogen-induced apoptosis. It is believed that a higher expression level of ER- β is associated with a better prognosis. Based on these findings, there is an increasing research interest regarding the role of the two receptors.

Aims: In this study, malignant tissues of patients with advanced ovarian carcinomas were investigated for the localization and distribution of the estrogen receptors α and β . The results from a quantitative immunohistochemical microscopic evaluation were compared with clinical data, such as age, FIGO-classification, tumor grading, complete tumour resection, progression free survival, and overall survival.

Methods: For ER- α determination, 243 samples of ovarian cancer tissue on microarrays were immunohistochemical stained and immunoreactive proteins were determined. For ER- β , microarray studies failed because of the loss of ER- β with the tumor progression. Only small levels of ER- β were detectable on larger tissue samples from nine patients. All immunoreactive estrogen receptors α and β samples were visualized on the TissueFAXS[®] Cell Analysis System. On virtual images, the percentage of positive stained cells together with their color intensity were analyzed with the HistoQuest[®] Software System to give the immunoreactive score (IRS) in the tumor and stromal areas. This procedure was established and validated for the ovarian cancer samples analyzed. The statistical analysis of ER- α was performed with the program SPSS 19.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA). Because of the low ER- β density in the tissue, no statistical analysis was done.

Results and Conclusion: Due to the fact that the expression of ER- β is very low at advanced stage in ovarian cancer tissue, it was not possible to perform a statistical

analysis for this receptor. For ER- α , Tumor slides were evaluated with respect to different cancer subtypes (serous and non-serous tumors). In all samples, IRS for ER- α showed a significant difference between the stromal and tumor areas. It is nearly exclusively expressed in tumor cells. There is no positive reaction in the immune cells scattered in the stromal area. The most important finding was that the expression levels of ER- α had a significant influence on the cumulative survival in the collective of all patients ($p=0.045$) as well as in the group of patients with serous carcinomas ($p=0.037$). Higher levels of ER- α were associated with a longer survival. Additionally, the multivariate analysis proved that ER- α has an independent significant impact on the progression free survival ($p=0.046$). These results show the relevance of ER- α in ovarian cancer. ER- α expression may have a potential importance for therapeutical considerations as application of SERMs could be considered in a subgroup of patients with high levels of the receptor. To evaluate the effect of the application, further studies should be performed with hormonal therapies in larger collective of selected patients.

1 EINLEITUNG

1.1 Die Anatomie des Ovars

Die paarig angelegten Ovarien (Eierstöcke) mit den Tubae uterinae (Eileitern) liegen an der seitlichen Wand des kleinen Beckens und zeigen im Aufbau zwei voneinander makroskopisch trennbare Zonen: die Rindenzone *Cortex ovarii*, und die Markzone *Medulla ovarii*. In beiden Bereichen findet man ein Bindegewebe, das reich an interstitiellen Zellen ist. Die Oberfläche bildet das Peritonealepithel. Es besteht aus einem einschichtigen kubischen Epithel, das mit Mikrovilli an der Oberfläche besetzt ist. Diese Schicht von flachen, isoprismatischen Zellen wird Müller-Epithel genannt (Böcker et al., 2008). Alter und Funktionszustand beeinflussen laufend die Größe der Ovarien sowie deren Oberflächenepithel (Kreienberg et al., 2009).

Unter der Epithelschicht liegt die straffe, dichte *Tunica albuginea*, ein Bindegewebe, welches kontinuierlich ins *Stroma ovarii* mit den längsgestreckten Fibroblasten übergeht. Die typisch weiße Färbung des Ovars ist auf diese Bindegewebsschicht zurückzuführen (Junqueira und Carneiro, 1996). Das *Stroma ovarii* in der Rindenzone bildet ein dichtes spinozelluläres Bindegewebe. Dort befinden sich auch die *Folliculi ovarii* (Ovarialfollikel), welche die reifenden, von Granulosazellen umgebenen Oozyten (Eizellen), beherbergen (Junqueira und Carneiro, 1996).

Das Ovar ist der Träger der weiblichen Keimzellen und geht aus dem Follikelepithel, dem *Stroma ovarii* (welche den ortsständig lokalisierten Teil bilden) und dem eingewanderten Teil, den Geschlechtszellen, hervor. Das Follikelepithel entsteht aus dem Zölomepithel und das *Stroma ovarii* aus dem Mesenchym der jeweiligen Genitalleiste, welche sich an der hinteren Bauchwand zwischen der Urnierenanlage und der Anlage des *Mesenterium dorsale* befindet. Die Genitalleisten sind paarig im Körper angelegt. Die Geschlechtszellen gehen aus den Urgeschlechtszellen (Gonozyten) hervor. In der fünften bis sechsten Embryonalwoche wandern sie während intensiver Zellteilung vom Entstehungsort in der Allantois-Zone in den ortsständigen Ovarialbereich. Die so entstandenen Oogonien werden zu Tochterzellen, die vernetzt sind und Zellklone bilden. Nur eine Zelle dieser Klone geht in die Oogenese über. Die restlichen Zellen sterben ab. Später differenzieren sich Oogonien zu primären Oozyten. Beim Menschen erfolgt diese Vermehrungsphase ausschließlich pränatal. Von

besonderer Bedeutung für die Ovarentwicklung als Keimzellträger ist die Interaktion zwischen Oogenese und der Differenzierung der Zöломabkömmlinge. Beide Vorgänge sind nur in Abhängigkeit des jeweils anderen korrekt möglich (Junqueira und Carneiro, 1996).

1.2 Die Physiologische Funktion der Ovarien

Die physiologische Funktion der Ovarien liegt in der Bereitstellung von befruchtungsfähigen Eizellen, ausgehend von Follikelreifung und Ovulation durch Östrogen- und Gestagenproduktion. Die Eizellen werden bereits sechs Monate vor dem Eisprung bereitgestellt. Hypophyse und Hypothalamus kontrollieren die endokrine Funktion des Follikels. Obwohl in der Anfangsphase des monatlichen Zyklus eine sehr hohe Konzentration des Follikel-stimulierenden Hormon (FSH) im Plasma messbar ist, verläuft die Östrogensekretion durch die Thekazellen und die Granulosazellen zunächst unabhängig von den Hormonen der Hypophyse. Im Gegensatz dazu stehen die Reifung der Follikel und die Gestagensekretion (Progesteronproduktion) unter der Kontrolle von Gonadotropinen. Die Selektion und Rekrutierung der Follikel wird über den hormonellen Anstieg des luteinisierenden Hormons (LH) und FSH reguliert. LH und FSH sind glykosylierte, heterodimere Proteine. Die Aufnahme von FSH und LH schwankt entsprechend der Entwicklungsphase der Follikelzellen. Sie ist abhängig von Dichte und der Verteilung der LH- und FSH-Rezeptoren. Man unterscheidet zwischen der Follikelphase und der Lutealphase. In der Follikelphase, welche zu Beginn des Zyklus stattfindet, werden mehrere antrale Follikel rekrutiert und anschließend wird ein dominanter, ovulierender Follikel selektiert (Klinke et al., 2005).

1.3 Ovarialkarzinom

1.3.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist der bösartigste Tumor der weiblichen Geschlechtsorgane. Im Jahr 2014 werden mehr als 22.000 Neuerkrankungen und mehr als 14.000 Todesfälle in Europa erwartet (Erickson et al., 2013).

Weltweit zählen 4% aller Krebserkrankungen von Frauen zu Eierstockkrebs, mit mehr als 200.000 Neuerkrankungen jährlich (Gajjar et al., 2012). Im frühen Stadium nach

FIGO I und II beträgt die Fünfjahresüberlebensrate 80-90%. Diese vergleichsweise hohe Rate sinkt jedoch im späteren Stadium (FIGO III und IV) auf lediglich 25%. Hinzukommt, dass nur 30% der Patientinnen in den frühen Stadien FIGO I und II eine entsprechende Diagnose erhalten (Gajjar et al., 2012).

Bösartige Neubildungen des Eierstockes im Zeitverlauf
 altersstandardisierte Raten auf 100.000 Personen
 (WHO-Weltbevölkerung, 2001)

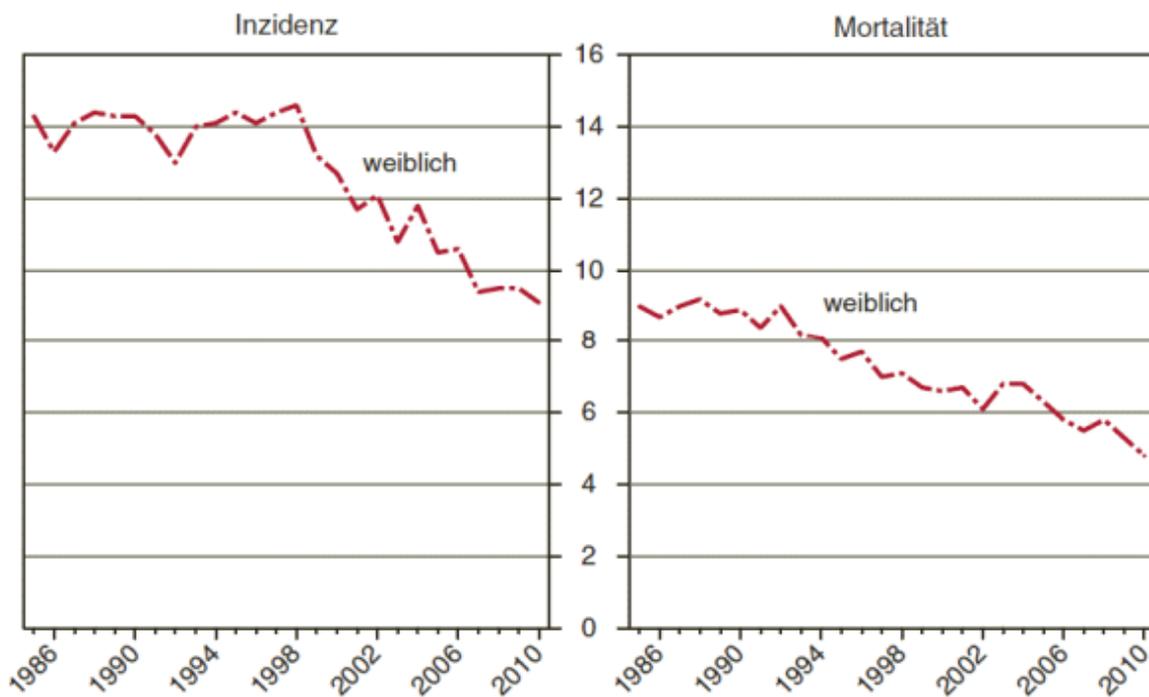


Abb. 01: Graphik zu Inzidenz und Mortalität des Ovarialkarzinoms im Zeitverlauf, Österreichisches Krebsregister (Stans 24.09.2012) und Todesursachenstatistik (Statistik Austria, Stand: 05.10.2012)

Da zunächst nur sehr vage und wenig spezifische Symptome vorliegen, wird der Eierstockkrebs oft als "Silent Killer" bezeichnet. Aufgrund der hohen Überlebensrate im frühen Stadium, hat sich die Forschung nun darauf konzentriert, symptomatisch basierte Methoden zur Diagnostizierung und somit zur Früherkennung der Ovarialkarzinome zu entwickeln. Man fand heraus, dass Ovarialkarzinompatientinnen bereits einige Monate vor der klinischen Diagnostizierung verdächtige Symptome, wie vaginale Blutungen, Völlegefühl und erhöhtes Druckgefühl im Abdominalbereich aufweisen (Gajjar et al., 2012).

1.3.2 Ätiologie

Bis heute ist die Entstehung des Ovarialkarzinoms nicht vollständig geklärt. Mutationen in bestimmten Genen können das Risiko einer Erkrankung erhöhen. Mehr noch spielen Lifestyle-Faktoren (Rauchen, Übergewicht, etc.) eine wichtige Rolle. Zudem können hormonelle Einflüsse, wie die Wirkung von Steroidhormonen (Gonadotropine, Androgene, Östrogene) und Entzündungen die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms begünstigen (Hunn et al., 2012).

Derzeit gibt es mehrere Hypothesen zur Karzinomentstehung im Ovar. Eine davon ist die Hormon-Hypothese. Es ist bekannt, dass das Oberflächenepithel des Ovars Rezeptoren exprimiert, die durch die Hormone FSH, LH, Androgene, Progesterone und Östrogene aktiviert werden und dass dies in Folge zu Stimulierung von verschiedenen proliferativen Signaltransduktionswegen, aber auch zu einer malignen Entartung von Epithelzellen, führen kann (Levanon et al., 2008).

1.3.3 Klinik und Diagnostik

Es wird angenommen, dass etwa 89% aller Ovarialkarzinome spontan auftreten. Nur etwa 11% sind genetisch bedingt (Sogaard et al., 2006). Klinische Symptome, die mit Ovarialkarzinomen in Verbindung gebracht werden können, sind z.B. Schmerzen im Unterbauch, Blutungen, Appetitlosigkeit, erhöhte Miktionsfrequenz, Blähungen und Völlegefühl (Goff et al., 2007). Um eine frühere Diagnose zu erlangen, werden einerseits diese Symptome zur Hilfe genommen, andererseits können aber auch Lebensstilfaktoren und ein bekanntes Auftreten von Ovarialkarzinomen in der Familie in die Diagnose miteinbezogen werden (Hippisley-Cox und Coupland, 2012).

Die Fünfjahresüberlebensrate beträgt bei einer Früherkennung 70-90%, welche bei fortgeschrittener Erkrankung auf 20-30% absinkt (Goff et al., 2007). Früherkennung, maximale Resterkrankung nach zytoreduktiver Operation und Allgemeinzustand sind die wichtigsten Prognosefaktoren (Holschneider und Berek, 2000). Besteht eine nachgewiesene BReast-CANcer-(BRCA)1/2-Mutation, so sollte der Patientin nach abgeschlossener Familienplanung eine prophylaktische bilaterale Salpingo-Oophorektomie, eine risikoreduzierende Mastektomie und eine entsprechende

Chemoprävention angeboten werden. Dies senkt das Erkrankungsrisiko vor dem 40. Lebensjahr um 80% (Domchek et al., 2010).

Da in den meisten Fällen das Ovarialkarzinom erst in einem späteren Stadium entdeckt wird, ist man vor allem an einer aussagekräftigen Früherkennungsmethode interessiert. Der Tumormarker CA 125 (Cancer-Antigen 125) ist wegen seiner hohen Sensitivität derzeit der einzige anerkannte Ovarialkarzinommarker. Er wird sowohl für die Erkennung von Rezidiven, als auch für die Verlaufskontrolle nach Operationen und/oder der Chemotherapie verwendet. CA 125 wird von einem gesunden Ovar nicht exprimiert (Bühling und Friedmann, 2009). Ist das Screening dieses Markers negativ, kommt lediglich beim muzinösen Karzinom noch CA 72-4 in Frage. Es besteht jedoch gleichzeitig keine nachweisliche Verbesserung der Mortalitätsreduktion durch CA 125-Bestimmungen (Goff et al., 2007; Buys et al., 2011).

Für die Differentialdiagnose und zur Untersuchung der Ausdehnung des Ovarialkarzinoms kommen Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zum Einsatz (Kinkel et al., 2005; Nam et al., 2010). Im fortgeschrittenen Stadium wird die peritoneale bzw. mesenteriale Aussaat mittels CT, MRT oder Ultraschall (US) bestimmt. Fluor-Desoxy-Glucose-PET (FDG-PET) liefert hierbei ein rein morphologisches Profil. Lymphknotenmetastasen werden mit FDG-PET, CT oder MRT erfasst (Yuan et al., 2012).

1.3.4 Zusätzliche Faktoren für die Prognose

Risikosenkend sind folgende Faktoren: ein spätes Einsetzen der Periode, die Einnahme von oralen Kontrazeptiva über einen Zeitraum von fünf Jahren, frühe erste Schwangerschaft bzw. häufige Parität, Stillen des Säuglings für 18 Monate oder länger, eine früh eintretende Menopause, Hysterektomie, Tubenligatur sowie eine gesunde Ernährungsweise mit wenig fetthaltigen Nahrungsmitteln. Negative Faktoren sind: Endometriose, die Anwendung einer Hormonersatztherapie mit 17 β -Estradiol ohne Progesterongabe und ein hoher Body-Mass-Index. Familiär bedingte Ovarialkarzinomerkrankungen gehen einher mit einer Genmutation (z.B. BRCA1/2 Mutationen oder dem Lynch-Syndrom (hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom; HNPCC)) (Negri et al., 1991; Lu und Broaddus, 2005; Roett und Evans, 2009).

1.3.5 Therapie

Man unterscheidet hier Therapieansätze für Ovarialkarzinome in frühen und fortgeschrittenen Stadien.

Es wird diskutiert, ob eine Chemotherapie nach einem restlosen Entfernen des Tumors im frühen Stadium sinnvoll ist (Trimbos et al., 2003). Ab den Stadien FIGO IB und IC erfolgt eine platinbasierte Chemotherapie in sechs Zyklen, vorzugsweise mit Carboplatin (Bell et al., 2006). In weit fortgeschrittenen Fällen (FIGO IIIB – IV) kann zusätzlich Bevacizumab verabreicht werden (Burger et al., 2011; Perren et al., 2011).

Trimbos et al., 2003, fanden heraus, dass für die Prognose das Alter bei der Diagnose, das Tumorstadium, der histologische Zelltyp und das vollständige Entfernen des Tumors wichtige unabhängige Prognosefaktoren darstellen. Frauen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen können durch Anwendung einer adjuvanten Chemotherapie tatsächlich eine statistisch signifikante Verbesserung bezüglich der rezidivfreien Überlebensrate bekommen. Meist liegt jedoch kein Unterschied in der Gesamtüberlebenszeit vor (Trimbos et al., 2003).

Bei fortgeschrittener Erkrankung ist unter Umständen die Resektion benachbarter Gewebe notwendig (Uterusadnexe, Omentum, Appendix und Peritoneum der Blase) (Bristow et al., 2002; Schorge et al., 2010; Berek et al., 2012).

Für Frauen und Mädchen im gebärfähigen Alter besteht im Falle der Früherkennung eines epithelialen Ovarialkarzinoms (Stage IA) die Möglichkeit einer fertilitätserhaltenden Karzinomentfernung. Beispielsweise Zystektomie und /oder einseitige Salpingo-Oophorektomie, bei der der gegenüberliegende Ovarteil erhalten bleibt. Es kann auch eine bilaterale Salpingo-Oophorektomie unter der Erhaltung des Uterus erfolgen (Gershenson, 2005).

Bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen können die benachbarten Organe betroffen sein und es kann ein Ileus, Aszites oder Pleuraerguss im fortgeschrittenen Stadium erfolgen. Zur symptomatischen Behandlung eignen sich Antiemetika, Antisekretorika, Analgetika und Kortikosteroide (Feuer und Broadley, 2000). Auch Laxantien kommen bei partiellem Darmverschluss zum Einsatz, müssen jedoch bei vollständiger Obstruktion sofort abgesetzt werden, da es sonst zu Darmdurchbrüchen kommt

(Koukouras et al., 2001; Bizer et al., 1981; Twycross et al., 1994). Ein operativer Eingriff aufgrund einer Darmobstruktion sollte ausschließlich dann vorgenommen werden, wenn ein signifikanter Nutzen für die Patientin besteht (Kucukmetin et al., 2010).

1.3.6 Karzinomstaging nach FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique)

Es existieren zwei Methoden, um das Tumorstadium zu klassifizieren: die Klassifikation der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (das FIGO-Staging-System) und das TNM-System des American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Das FIGO-System definiert die Ausbreitung des Ovarialkarzinoms nach der Tumorentfernung. Auch ein zytologisches Zellprofil aus der peritonealen Spülflüssigkeit wird durchgeführt. Hierbei wird untersucht, ob der Tumor bereits die Lymphknoten oder periphere Organe befallen hat. Das TNM-System beschreibt hingegen die Ausbreitung des primären Tumors (T), die An-/Abwesenheit von Metastasen in den Lymphen (N) bzw. periphere Metastasen (M) (American Cancer Society 2013).

Tab. 01: Karzinomklassifikation nach FIGO und TNM (American Cancer Society 2013)

FIGO	TNM	Pathologisches Profil
Stage I	T1/N0/M0	Nur in einem Ovar finden sich Tumorzellen
IA	T1a/ N0/ M0	Nur 1 Ovar ist betroffen, Kapsel intakt, kein Tumor an der Oberfläche des Ovars, keine malignen Zellen in der Aszites oder der peritonealen Spülflüssigkeit
IB	T1b/ N0/ M0	Beide Ovarien sind betroffen, Kapsel intakt, kein Tumor an der Oberfläche des Ovars, keine malignen Zellen in der Aszites oder peritonealen Spülflüssigkeit
IC	T1c/ N0/ M0	Beide oder ein Ovar betroffen, Kapselruptur, Tumorzellen an der Oberfläche des Ovars, Vorhandensein von malignen Zellen in der Aszites oder peritonealen Spülflüssigkeit
Stage II	T2/ N0/ M0	Beide oder ein Ovar betroffen, mit beckenartiger Ausdehnung oder Implantaten
IIA	T2a/ N0/ M0	Tumorausdehnung und/oder Befall von Uterus, Eileiter(n), keine malignen Zellen in der Aszites oder peritonealen Spülflüssigkeit

Tab. 01: Fortsetzung

IIB	T2b/ N0/ M0	Tumorausdehnung und/ oder Befall von Uterus, Eileiter(n), keine malignen Zellen in der Aszites oder peritonealen Spülflüssigkeit
IIC	T2c/ N0/ M0	Tumorausdehnung und/ oder Befall von Uterus, Eileiter(n), Vorhandensein von malignen Zellen in der Aszites oder peritonealen Spülflüssigkeit
Stage III	T3/ N0/ M0	Tumorzellen befallen einen oder beide Ovarien, mit bestätigten peritonealen Metastasen außerhalb der Beckenregion und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
IIIA	T3a/ N0/ M0	Mikroskopische Peritonealmetastasen außerhalb der Beckenregion
IIIB	T3b/ N0/ M0	Makroskopische Peritonealmetastasen außerhalb der Beckenregion $\leq 2\text{cm}$
IIIC	T3c/ N0/ M0 bzw. jedes T, N1, M0	Makroskopische Peritonealmetastasen außerhalb der Beckenregion $> 2\text{cm}$ und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
Stage IV	Jedes T/ Jedes N/ M1	Fernmetastasen
Nx	-	Regionäre Lymphknotenmetastasen können nicht bestimmt werden
N0	-	Es liegen keine Metastasen in den regionären Lymphknoten vor
N1	-	Es liegen Metastasen in den regionären Lymphknoten vor
M0	-	Es können keine Fernmetastasen nachgewiesen werden
M1	-	Fernmetastasen liegen vor, Ausnahme: Peritonealmetastasen

Ein korrektes Bestimmen des Tumorstadiums geht weit über den prognostischen Wert des anatomischen Fortschreitens des Tumors hinaus. Die immer schlechter werdende Tumorprognose bei der höheren Metastasenausbreitung ist nicht nur auf die höhere Belastung des Körpers durch den Tumor zurückzuführen, sondern beruht auch darauf, dass sich die einzelnen Tumorzellen mit wachsender Infiltrationstiefe auf phänotypischer Ebene verändern. Somit steigt das Potenzial zur weiteren Metastasierung und Tumorausbreitung (Hiddemann et al., 2004).

Weiteres wird auch der Differenzierungsgrad bestimmt. Das Grading (G) erfolgt in vier Stufen, von G1- G4. Eine G1-Zelle gleicht einer physiologischen Zelle. Je höher die betrachteten Zellen eingestuft werden, desto weniger entsprechen sie dem unauffälligen Gewebe und desto mehr proliferieren die Tumorzellen. Eine G3 oder G4 klassifizierte Zelle gilt dann als undifferenziert. Das Grading hat eine Relevanz für Prognose und Therapie (Shimamoto et al., 2003).

Tab. 02: Differenzierungsgradeinteilung der Zellen im Ovarialkarzinom (Diedrich et al., 2000).

Grade	Gewebeszustand
Gx	Keine Beurteilung des Differenzierungsgrades möglich
GB	Borderline-Malignität
G1	Gut differenziertes Gewebe
G2	Mäßig gut differenziertes Gewebe
G3-4	Gewebe ist schlecht/ nicht mehr differenziert

1.3.7 Klassifikation der epithelialen Ovarialkarzinome

Das Ovarialkarzinom wird nicht als einzelne Krankheit betrachtet, sondern ausgehend von der Zellherkunft in die drei Hauptgruppen Stromatumore, Keimzelltumore und Tumore epithelialen Ursprungs unterteilt (Gajjar et al., 2012). Der epitheliale Tumor tritt vorwiegend bei älteren Frauen in westlichen Ländern auf und repräsentiert insgesamt 60% aller ovariellen Tumore.

Die am häufigsten auftretenden epithelialen Ovarialkarzinome werden in seröse, muzinöse, endometroide und klarzellige Tumore eingeteilt, wie in Abb. 02 gezeigt (Gilks und Prat 2009). Wichtig ist die Entwicklung einer Subtyp-spezifischen Behandlung von Ovarialkarzinomen. Beispielsweise sprechen muzinöse und Klarzellkarzinome schlechter auf die platinbasierte Chemotherapie an als hochgradig seröse Subtypen. Auch seröse Karzinome mit einem niedrigen Differenzierungsgrad weisen einen geringeren Therapieerfolg auf als Formen mit einem hohen Differenzierungsgrad (Gershenson et al., 2006; Prat, 2012)

Die Karzinome in jeder dieser Kategorie werden nochmals unterteilt in benigne, maligne und Borderline-Tumore. Dies hilft, ihren klinischen Verlauf besser charakterisieren zu können (Seidman et al., 2002; Shih et al., 2004). 80-90% der epithelialen Tumore sind maligne Ovarialkarzinome (Gilks und Prat, 2009). In industrialisierten Ländern stellen diese Karzinome die vierthäufigste Todesursache bei Frauen, die an gynäkologischen Tumoren erkranken, dar. Ein Hauptgrund dafür ist die Problematik der späten Diagnose. Meist wird das Karzinom erst in Stadium drei oder vier erkannt, wenn bereits Metastasen vorliegen. Somit erweist sich eine weitere Behandlung des Karzinoms als sehr schwierig (Gilks und Prat, 2009).

Eine Reihe von Mechanismen wie Chemoresistenz gegenüber Zytostatika und bereits existierende Resistenzklone, welche nach der Operation des Tumors im Gewebe verbleiben, können die Metastasierung und Invasion fördern. Dies sind einige der Gründe für die schlechte Prognose. Insgesamt haben weniger als 35% der erkrankten Frauen eine Überlebensdauer von zehn Jahren (Gilks und Prat, 2009).

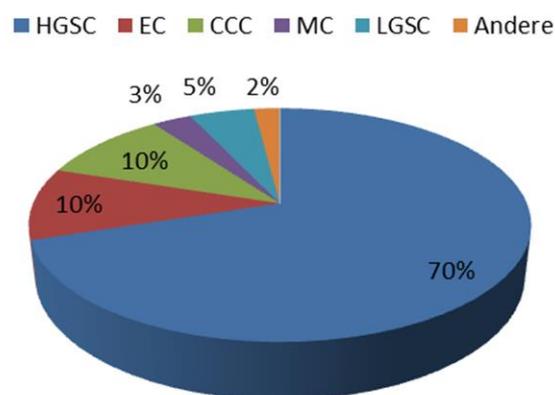


Abb. 02: Verteilung der unterschiedlichen Subtypen von Ovarialkarzinoma.

HGSC= hochgradig seröses Karzinom, EC= endometrioides Karzinom, CCC= Klarzellkarzinom, MC= muzinöses Karzinom, LGSC= niedergradig seröses Karzinom (Verteilung laut Gilks & Prat, 2009)

Sehr wichtig ist hierbei die Erkenntnis, dass „low-grade“ seröse Karzinome (LGSC) und „high-grade“ seröse Karzinome (HGSC) fundamental verschiedene Tumortypen repräsentieren. LGSC stehen in Verbindung mit serösen Borderline-Tumoren und werden nicht mit Mutationen des BRCA-Gens in Verbindung gebracht. Im Gegensatz

dazu sind hochgradig seröse Tumore nicht mit serösen Borderline-Tumoren assoziiert und gehen aus dem Flimmerepithel des Eileiters hervor (Gilks und Prat, 2009).

1.3.8 Weitere Unterteilung der epithelialen Ovarialkarzinome

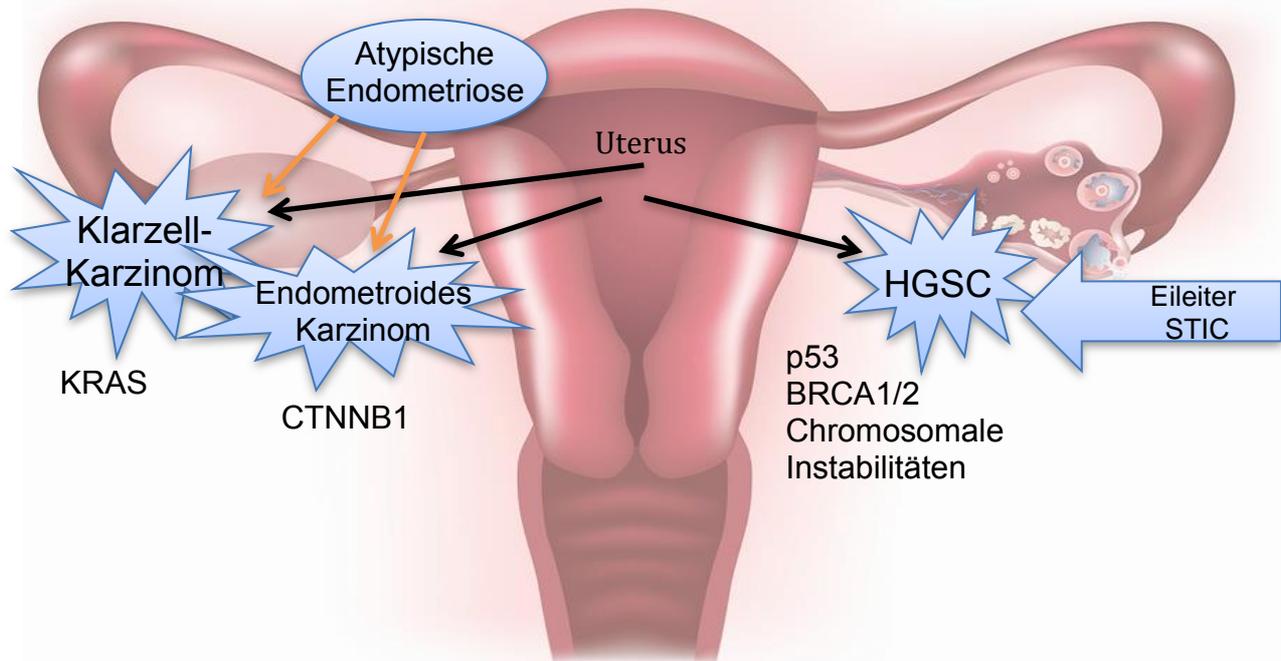


Abb. 03: Entwicklungstheorien unterschiedlicher Ovarialkarzinomtypen.

Klarzellkarzinom (CCC), Endometroides Karzinom (EC), hochgradig seröse Karzinome (HGSC); Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Pathogenese; Diese Abbildung zeigt die Klassifikation der Subtypen des Ovarialkarzinoms, typische Mutationen und ihre Ausgangszellen. EC, sowie auch CCC scheinen beide von einer Endometriose oder aus dem Uterusepithel zu stammen. Niedergradig seröse Karzinome (LGSC) haben ihren Ursprung in epithelialen Borderline- Tumoren des Ovars. Im Gegensatz dazu entwickeln HGSC aus dem Eileiterflimmerepithel; seröse tubare intraepitheliale Karzinome (STIC). Muzinöse Karzinome sind in dieser Abbildung nicht gezeigt, da deren Herkunft noch immer nicht geklärt ist (Gilks und Prat, 2009).

Hochgradig seröse Karzinome (HGSCs)

Diese bilden mit einem Vorkommen von >70% das am häufigsten verbreitete epitheliale Ovarialkarzinom (Gilks und Prat, 2009). Die Patientinnen befinden sich bei der Diagnose des Tumors bereits im fortgeschrittenen Stadium und so ist es meistens der Fall, dass sich der Tumor über die Eierstöcke hinaus ausgebreitet hat (Gilks und Prat, 2009). Diese Tumorart spricht sehr gut auf eine Chemotherapie an, entwickelt jedoch eine hohe Resistenzrate nach der initialen Chemotherapie. Histologisch betrachtet ist ein stark geschichtetes Epithelium mit spaltähnlichen Zwischenräumen typisch (Gilks

und Prat, 2009). Eine sichere Diagnose und Abgrenzung zum LGSC ist durch die hohe Mitoserate gegeben (Köbel et al., 2008b).

Die meisten HGSCs weisen Mutationen von BRCA 1, (BReast CAncer 1, auf Chromosom 17), BRCA 2 (BReast CAncer 2, auf Chromosom 13) (Köbel et al., 2008a; Senturk et al., 2010) oder dem Protein p53 (Gilks und Prat, 2009) auf. Im Fall von BRCA 1 ist meist durch die Promotor-Methylierung die Expression reduziert. Bei BRCA 2 liegt eine Keimzellmutation oder eine somatische Zellmutation vor, die die Expression verändert. Im Fall von p53 wurde eine Mutation oder Deletion beobachtet. Alle diese Veränderungen treten frühzeitig auf. Die DNA ist somit nicht mehr in der Lage die aufgetretenen Doppelstrangbrüche zu reparieren. Es entsteht eine chromosomale Instabilität (Ahmed et al., 2010). Von diesem Zeitpunkt an, treten vermehrt weitere genetische Mutationen auf, welche die DNA-Reparatur weiter verhindern. Die Zellen weisen eine erhöhte Proliferation auf (Gilks und Prat, 2009).

Niedergradig seröse Karzinome (LGSCs)

Diese Art von Karzinomen ist selten. Sie tritt bei lediglich 5% der Patientinnen mit Ovarialkarzinomen auf. Im Normalfall werden diese in jüngeren Patientinnen nachgewiesen (Gershenson et al., 2006). Die Prognose für Patientinnen mit fortgeschrittenem Tumorstadium ist schlecht, obwohl das Fortschreiten der Krebserkrankung sehr langsam erfolgt (Gilks und Prat, 2009). LGSCs besitzen uniforme Kerne und einen differenzierten Aufbau mit papillärem Wachstumsmuster. Die uniformen Kerne sind das Kriterium um HGSC von LGSC zu unterscheiden. Psammomkörper, die durch Kalziumablagerungen aus nekrotischen Zellen entstehen, sind ein bekanntes Merkmal (Gilks und Prat, 2009).

Laut Jones et al., (2012) sind Mutationen des „Proto-oncogene of the B-rapidly accerlerated fibrosarcoma “ (BRAF)-Proteins und des „Proto-oncogene of the K-rat sarcoma“ (KRAS)-Proteins bei vielen LGSCs vorzufinden. Es liegen keine chromosomalen Instabilitäten vor (Jones et al.

, 2012). LGSCs sind nicht mit Keimzellmutationen (BRCA1/2 Mutation) assoziiert (Gilks und Prat, 2009). Die Ansprechrate für diese Art von Ovarialkarzinom ist schwierig einzuschätzen, weil diese Gruppe von Tumoren selten gefunden wird. In den meisten Fällen ist eine schlechte Ansprechrate bzw. kein Ansprechen auf die konventionelle Ovarialkarzinomchemotherapie zu erwarten (Gershenson et al., 2006; Jones et al., 2012; Prat, 2012).

Muzinöse Karzinome (MCs)

Bei dieser Tumorart gleichen die Zellen entweder den Endozervixzellen, Gastropyloruszellen oder Darmzellen. Die meisten muzinösen Tumore zeigen eine gastrointestinale Differenzierung. Bei fortgeschrittener Erkrankung ist die Differenzierung zwischen intestinalem und endozervikalem Typ jedoch schwierig (Gilks und Prat, 2009). Muzinöse Karzinome (MCs) weisen eine hohe Heterogenität auf. Muzinöse Boderline-Tumore mit intraepithelialelem Karzinom haben eine geringe Tendenz für ein Wiederauftreten (<5%). Sollte es zu einem Wiederauftreten kommen, so geschieht dies innerhalb von fünf Jahren. Der Rezidivtumor verhält sich viel aggressiver als der Ersttumor und befällt rasch Knochen, Lunge und weitere distale Gewebe (Gilks und Prat, 2009). Die häufigste Ursache für die Entstehung dieses Subtyps sind KRAS-Mutationen. Weit seltener sind BRCA- oder p53- Mutationen für die Tumorentstehung verantwortlich (Prat, 2012; Frumovitz et al., 2010).

Mutationen im "Human Epidermal growth factor Receptor 2" (HER 2) sind in 15-20% der Fälle für die Entstehung von Ovarialkarzinomen des MC-Typs verantwortlich (Gilks und Prat, 2009). MCs sprechen nur zu etwa 15–35% auf die platinbasierte Chemotherapie an. Eine Therapie mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab wirkt am besten bei Patientinnen mit einer hohen Amplifikation des HER2 Gens (Gilks und Prat, 2009).

Endometroide Karzinome (ECs)

Endometroide Karzinome (EC) im Ovar treten mit einer Häufigkeit von etwa 10 % (Prat, 2012) fast gleich häufig auf, wie jene im Endometrium. Die meisten EC sind Grad 1 oder 2 und weisen runde oder tubuläre Drüsen auf, welche durchzogen sind von nicht mucinhaltigen Epithelien. Fokales intrazelluläres Mucin ist ein Marker der ECs (Gilks und Prat, 2009).

Typisch sind die somatischen Mutationen von β -Catenin (CTNBI) und dem „phosphatase und tensin homolog“-Gen (PTEN) (Obata et al., 1998; Palacios und Gamallo, 1998; Catasùs et al., 2004). Auch eine Mutation des „AT-rich interactive domain-containing protein 1A“ (ARID 1A), welche mit einem Verlust des „Barrier-to-Autointegration Factor“ (BAF) einher geht, wird oftmals mit der Entstehung von ECs in Verbindung gebracht (Wiegand et al., 2010). Der Therapieerfolg ist bei diesem Subtyp sehr schwer zu bewerten, da viele unterschiedliche Fälle existieren. Von allen Ovarialkarzinom-Subtypen hat aber dieser Subtyp die beste Prognose, da er frühzeitig erkannt wird (Gilks und Prat, 2009).

Klarzellkarzinome (CCCs)

Der Klarzellkarzinom (CCC)-Typ ist der am wenigsten untersuchte Subtyp aller Ovarialkarzinome. Die Anwesenheit von Klarzellen alleine ist noch kein ausreichender Hinweis auf ein CCC, da diese auch im HGSC und im EC auftreten können. Die präzise Diagnose von CCC beruht auf weiteren zytologischen Befunden (Gilks und Prat, 2009). Folgende charakteristische Merkmale sind notwendig: Multiple komplexe Papillen, dichte Hyalinmembranen, die sich auf die Papillenkerne ausbreiten und Hyalinkörper, welche in 25% der Fälle vorhanden sind. Es liegt eine geringe Mitoseaktivität vor (Gilks und Prat, 2009). Die Marker „Hepatocyte Nuclear Factor 1“ (HNF1), Östrogenrezeptor (ER) und „Wilms-Tumor-Protein 1“ (WT1) sind bei einer immunhistochemischen Untersuchung in unklaren Fällen wichtig (Sangoi et al., 2008; Köbel et al., 2009). Der Therapieerfolg nach platinbasierter Chemotherapie ist vergleichbar mit dem Erfolg bei HGSC Tumoren (Gilks und Prat, 2009).

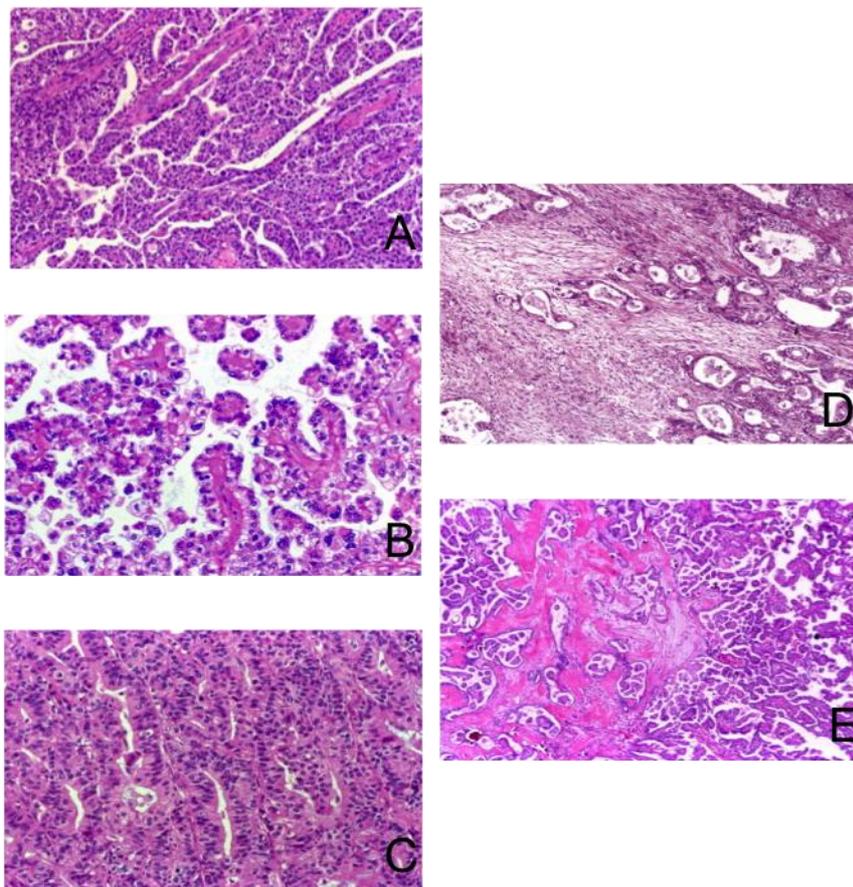


Abb. 04: Die fünf häufigsten Subtypen von Ovarialkarzinoma. Diese Abbildung zeigt histopathologische Bilder der fünf häufigsten Ovarialkarzinomtypen; (A) HGSC, (B) CCC, (C) EC, (D) MC, (E) LGSC (Prat, 2012).

1.4 Hormonelle Regulation

Im Ovar werden einerseits Steroidhormone (Gestagene, Östrogene, Androgene) und andererseits regulative Proteine (Inhibin, Aktivin, Follistatin und „Oocyte Maturation Inhibitor“) produziert (Junqueira und Carneiro, 1996). Der hormonelle Regelkreis beginnt im weiblichen Organismus mit der frühen Follikelphase. Der Hypothalamus produziert Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH). GnRH wirkt stimulierend auf den Hypophysenvorderlappen (HVL), welcher FSH und LH sezerniert. FSH und LH werden anschließend pulsatil ins Blut abgegeben (Klinke et al., 2005). Steigt der FSH-Spiegel, führt dies zu einer erhöhten Teilungsrates der Granulosazellen, welche sich in der inneren Zellschicht um den Follikel befinden. Bei vermehrter LH-Sekretion, werden mehr Androgene (Androstendion) von den Thekazellen, welche sich in der äußeren Zellschicht um einen Follikel befinden, produziert und in den Granulosazellen über das Enzym Aromatase zu dem natürlichen Östrogen Östradiol umgewandelt (Klinke et al., 2005).

1.5 Steroidbiosynthese

Welche Art von Steroidhormon synthetisiert wird, hängt einerseits von den verantwortlichen Rezeptoren (FSH für Östrogen, LH für Progesteron etc.) und andererseits von den vorliegenden Enzymen in den Hormondrüsen der jeweiligen Zelle ab (Silbernagl und Despopoulos, 2007). Die Steroidbiosynthese startet beim Cholesterin. Dieses wird im adrenalen Cortex, in den Leydigzellen der Hoden, in den Thekazellen und Granulosazellen des Ovars und in den Trophoblasten der Plazenta über das Enzym Cholesterin-Monooxygenase zu Pregnenolon umgewandelt (Miller, 1998a; Miller, 1998b). Pregnenolon wird weitersynthetisiert zu Progesteron, welches der Ausgangsstoff für alle restlichen Steroidhormone ist. Das membrangebundene Enzym „3 β -hydroxysteroid dehydrogenase“ (3 β -HSD) katalysiert den entscheidenden Transformationsschritt von Pregnenolon in das 3,20-dion-Steroid Progesteron (Labrie et al., 2005). Progesteron ist ein Steroidhormon und besteht aus 21-Kohlenstoffatomen. Synthesorte im weiblichen Organismus sind der Corpus Luteum, die Plazenta und auch die Nebennierenrinde (Silbernagl und Despopoulos, 2007). In der Nebennierenrinde veranlassen Enzyme in der äußeren Zone eine Hydroxylierung am Kohlenstoffatom (C)-21 des Progesterons, wodurch es in Mineralkortikoide umgewandelt werden kann. Wird zuerst das C-17 Atom hydroxyliert folgt in der mittleren Schicht der Nebennierenrinde die Hydroxylierung am C-21 und

Glukokortikoide entstehen. Oder durch eine weitere Hydroxylierung am C-17 entstehen 17-Ketosteroide, also Androgene und über anschließende Modifizierung durch das Enzym Aromatase entstehen Östrogene (Silbernagl und Despopoulos, 2007).

Im peripheren Gewebe werden über den Aromataseweg ausgehend von Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEAS), DHEA, Androstendion und Testosteron über Steroidsulfatase (STS), 3 β -HSD vom TYP 1 und 2, Aromatase (CYP19a1), reduktive 17 β -HSD vom Typ 1, 2 und 12 und AKR1C3, Östrogene hergestellt. Der „Sulfataseweg“ impliziert die Umwandlung von Östron aus Östron-Sulfat und weiteres die Reduktion von Östron zu Östradiol durch 17 β -HSD. Die oxidativen 17 β -HSD-Typen 2, 4 und 8 katalysieren wiederum die Inaktivierung von Östradiol. Die Sulfotransferasen (SULT) 1E1, 2A1 und 2B1 katalysieren die Konjugation von Östron und DHEA (Rizner, 2013).

Progesteron ist ein gestagenes Hormon. Wie die Bezeichnung „gestagen“ bereits verrät, ist Progesteron in erster Linie dafür verantwortlich eine Schwangerschaft bei einer Frau zu ermöglichen und aufrecht zu erhalten. Durch Progesteron wird das Myometrium aufgebaut und die Schleimhaut drüsig umgebaut, um die Gefäßversorgung zu verbessern. Dies ist für eine eventuelle Nidation von großer Bedeutung (Silbernagl und Despopoulos, 2007). Das zuvor durch Östrogen entstandene proliferative Endometrium wird ab dem 22. Zyklustag durch Progesteron sekretorisch. Der Muttermund, sowie auch der Zervix werden verkleinert und der Schleimpfropfen ist nun für Spermien undurchdringlich. Um Progesteron im Körper gut transportieren zu können, wird es an Transportglobuline gebunden (Silbernagl und Despopoulos, 2007).

Das Trägerprotein um Testosteron und Östrogen im Organismus zu transportieren heißt sexualhormonbindendes Globulin (SHBG). 10-30% der Sexualsteroiden sind an Albumin gebunden und nur 1% liegt frei im Blut vor und wirkt am jeweiligen Rezeptor (Leidenberger et al., 2009).

1.6 Bedeutung von Östrogen

Östrogen ist ein Steroidhormon aus 18-Kohlenstoffatomen. Für die spezifische Wirkung sind der Benzolring (A- Ring) und die zwei Hydroxylgruppen an Kohlenstoffatom 3 und 17 verantwortlich (Leidenberger et al., 2009). Unter dem Einfluss des hypophysären Gonadotropins unterliegen die Eierstöcke einem monatlichen Zyklus, welcher die Entwicklung und die Freisetzung der heranreifenden Eizelle vorantreibt. Auch ovarielle

Hormone werden produziert und regulieren den monatlichen Zyklus. Während der Proliferationsphase werden einige Follikel zum Wachstum angeregt. Die Gipfelung des Reifeprozesses eines Follikels endet mit dem Eisprung. Das freigesetzte einzelne Ei wandert in den Eileiter. Bis dahin bestand die Aufgabe des Follikels darin, Östrogen zu produzieren. Nach Freisetzen des Eies verwandelt sich dieses nun in den Gelbkörper und ist bis zum Beginn des neuen Zyklus verantwortlich für die Progesteron-Produktion. Danach verkümmert er und bildet den *corpus albicans* (Burkitt und Wheather, 1996).

Gonadal haben Östrogene Einfluss auf die Uterusschleimhaut, die langsam aber stetig aufgebaut wird und erhöhen die Kontraktionskraft des Endometriums (Silbernagl und Despopoulos, 2007). Ebenso fördern sie die Follikelreifung und erhöhen durch hochregulieren von Rezeptoren das Ansprechen von Granulosazellen auf Follicitropin und Lutropin. Die Spitzenkonzentration von Östrogen wird kurz vor der Ovulation und in der Mitte der 2. Zyklushälfte erreicht (Junqueira und Carneiro, 1996).

Extragonadal regulieren Östrogene während der Pubertät die Entwicklung der Brust, der Vagina und die Verteilung des Fettes. Nach der Pubertät haben sie weiterhin Einfluss auf die Viskosität des Blutes, Knochenwachstum und -dichte, Elektrolyt und Wasserhaushalt, Blutfettwerte und zahlreiche Funktionen des zentralen Nervensystems (Junqueira und Carneiro, 1996; Silbernagl und Despopoulos, 2007).

Bei prämenopausalen Frauen werden Östrogene in den Ovarien und peripheren Geweben synthetisiert. Postmenopausal lässt die Östrogenproduktion im Ovar nach und beschränkt sich nur noch auf peripheres Gewebe wie zum Beispiel Fettgewebe, Knochen, vaskuläres Endothel, glatte Muskulatur der Aorta und dem Gehirn (Tseng et al., 1982; Rizner, 2013; Simpson, 2002). Im peripheren Gewebe kann Östradiol aus adrenalem DHEAS, DHEA und zusätzlich aus adrenalem und ovariellem Androstendion synthetisiert werden. In postmenopausalen Frauen sind die Plasmakonzentrationen von DHEAS, DHEA und Androstendion mit einem Wert von 1,8 µM, 6.6 nM und 1,9 nM erhöht (Lukanova et al., 2004; Lepine et al., 2010; Audet-Walsh et al., 2011). Im Gegensatz dazu sind die Plasmakonzentrationen von Östradiol und Östron mit 70 pM und 30 pM zu niedrig (Lukanova et al., 2004; Lepine et al., 2010; Audet-Walsh et al., 2011). Es wird vermutet, dass peripheres Gewebe aus DHEAS, DHEA, Androstendion und Östronsulfat (E1S) via Sulfatase (STS), 3β-HSD/5-4-Ketosteroidisomerase (HSD3B), Aromatase (CYP19A1) und die reduktive 17β-HSD17B über den sogenannten „Aromataseweg“, Östrogene herstellen kann. In diesen Geweben kann

Östron also auch über den sogenannten „ Sulfatase- Weg“ hergestellt werden (Rizner, 2013; Secky et al., 2013).

Östrogen spielt auch beim Mann eine Rolle. Physiologisch in den Fugen der Epiphysen, wie auch im Hypothalamus und in der Hypophyse (Silbernagl und Despopoulos, 2007), pathologisch z.B. bei der Brustkrebserkrankung von Männern (Gómez-Raposo et al., 2010). Auch im Hoden wird in kleinen Mengen Östrogen erzeugt für die Herstellung des Ejakulats (Silbernagl und Despopoulos, 2007). Liegt beispielsweise ein Ungleichgewicht von Östrogen und Androgen im männliche Körper vor (z.B. durch eine Lebererkrankung, wodurch mehr Androstendion zu Östrogen aromatisiert wird und eine erhöhte Umwandlung von Östron zu Östradiol vorliegt), steigt das Risiko einer Brustkrebserkrankung (Gómez-Raposo et al., 2010). In der Prostata beispielsweise wird Testosteron erst in die wirksamen Komponenten Östradiol oder Dihydrotestosteron umgewandelt (Silbernagl und Despopoulos, 2007). ER- β Rezeptoren in der Prostata dienen der Zelldifferenzierung und Proliferation und scheinen in der Initialphase der Prostatakarzinomentstehung, sowie auch bei androgen-unabhängigem Tumorwachstum involviert zu sein (Signoretti und Loda, 2001).

1.7 Der Östrogenrezeptor

Der Östrogenrezeptor ist ein Liganden-induzierter, intrazellulärer Transkriptionsfaktor, der östrogenabhängige Genregulationen vermittelt (Lumachi et al., 2011; Muramatsu et al., 2000; Nilsson et al., 2011). Durch den Östrogenrezeptor wird im Zellkern die Expression spezifischer Zielgene durch Interaktion der spezifischen DNA-Abschnitte mit anderen koregulatorischen Proteinen, die Koaktivatoren und –repressoren beinhalten, induziert oder verhindert (Gronemeyer, 1991; Kumar und Thompson, 1991; Parker 1998). Der Liganden-gebundene Östrogenrezeptor bindet als Homodimer an spezifische DNA-Sequenzen, welche „Estrogen-Response-Elements“ (EREs) genannt werden. Er reguliert die Transkription durch Interaktion mit Transkriptionsmodulatoren und durch Rekrutierung der generellen Transkriptionsmaschinerie (Smith und O'Malley, 2004).

Wie auch andere Mitglieder der Familie der nukleären Hormonrezeptoren (NHR), besitzt der ER mehrere funktionale Domänen, welche spezifische Aufgaben

übernehmen (Beato et al., 1995). Beginnend vom N-Terminus bis zum C-Terminus gliedern sich die Domänen in die N-terminale Domäne (NTD), die DNA-bindende Domäne (DBD) und die Liganden-bindende Domäne (LBD). Zwischen der NTD und der LBD, existieren zudem noch zwei Domänen mit aktivierender Funktion (AF), AF1 und AF2, welche in Bezug auf die Regulation der Transkriptionsaktivität von ER von Bedeutung sind (siehe Abb. 05). Die höchste Transkriptionsaktivität von ER wird vermutlich durch Zusammenwirken von AF1 und AF2 erreicht. Deren Aktivitäten sind Promotor- und zellspezifisch. Beispielsweise arbeitet AF1 hormonunabhängig und AF2 ist im Gegensatz dazu auf die Anwesenheit von Steroidhormonen angewiesen (Berry et al., 1990).

Im menschlichen Körper kommen zwei Östrogenrezeptor-Isoformen vor, nämlich ER- α und ER- β . Die dreidimensionale Struktur der DBD und der LBD ist bekannt. Verschiedene physiologische Effekte werden durch die beiden Isoformen ER- α und ER- β , die Regionen mit starker Sequenzhomologie haben, vermittelt (Kumar et al. 2011).

ERs enthalten beide eine spezielle Proteindomäne, die Zinkfingerdomäne, die eine Bindung an die DNA und somit Gentranskription ermöglicht. In der Zinkfingerdomäne ist ein Zinkion chelatartig gebunden und bildet eine schleifenartige Struktur. Zink bestimmt in diesem Fall die tertiäre Struktur des Proteins (Kumar et al. 2011).

1.7.1 Spezifische Regionen im Östrogenrezeptor

Ligandenbindende Domäne (LBD)

Wie auch andere NHR, beinhaltet die LBD, bestehend aus 12 Helices, eine hormonbindende Tasche. Diese ist verantwortlich für die meisten Ligandenbindungsabhängigen Aktivitäten, wie beispielsweise die Bindung zum Koregulator AF2 und der Dimerisierung (Kong et al., 2005). Für ER- α und ER- β erreicht die LBD-Sequenzübereinstimmung ca. 55% (Kuiper et al., 1996). Jedoch weisen die zwei Proteine (ER- α und ER- β) deutlich höhere Sequenzhomologie in anderen Aminosäureregionen auf (Kumar et al., 2011). Interessanter Weise ist der Abschnitt mit der niedrigsten Übereinstimmung zwischen den Isoformen ER- α und ER- β , am besten ablösbar vom Rezeptor. Die besser abgeschirmten Regionen mit höherer Sequenzhomologie sind abbauresistenter. Die beständigeren Regionen stehen in

direktem Kontakt mit dem Liganden (Seielstad et al., 1995). Trotz der niedrigen Sequenzhomologie der LBDs innerhalb der nukleären Hormonrezeptoren ist die dreidimensionale Organisation der LBD-Monomer-Struktur immer gleich. Beide Isoformen von ER-LBDs bilden Dimere nach Bindung von Agonisten und Antagonisten (Kumar et al., 2011).

DNA-bindende Domäne (DBD)

Benachbart zur N-terminalen Transaktivierungsregion (A/B Domäne), umgibt eine schützende C-Domäne die DNA-bindende Sequenz (Kuiper et al., 1996). Die DBD bindet an das ERE (Klein-Hitpass et al., 1989; Wood et al., 2001). Das ERE reguliert nicht nur die Bindungsaffinität von ER, sondern moduliert auch die Rekrutierung von Koaktivatoren (Brown und Sharp, 1990; Glass und Rosenfeld, 2000). Drei Aminosäuren in der Zinkfingerregion sind für die Erkennungsspezifität vom ER zum ERE ausschlaggebend. Die DBD beider Isoformen binden an dasselbe ERE (Schwabe et al., 1993).

Hinge-Region (Gelenkregion)

Die "D"-Domäne, welche sich neben der DBD befindet, wird auch Gelenkregion genannt. Sie beinhaltet nukleäre Lokalisationssignale, welche bei Ligandenbindung frei werden und eine flexible Verbindung zwischen DBD und LBD herstellen. Die Aminosäureidentität der Hinge-Regionen von ER- α und ER- β stimmen nur zu 36% überein (Kuiper et al., 1996).

"F"-Region

Auf die LBD folgt die C-terminale F-Region. Sie enthält 42 Aminosäuren und ihre Funktion wurde durch Single-Point-Mutationen und auch durch ganze Domänen-Eliminierung charakterisiert. Man fand heraus, dass die F-Domäne die Gentranskription von Liganden-spezifischer Seite moduliert. Der Ligand, der Promoter und die gewebsspezifische Modulationsfähigkeiten der F-Domäne wurden kürzlich im Detail von Koide et al., (2007) untersucht. Es ist auch bekannt, dass die F-Domäne die Rezeptordimerisierung beeinflusst (Koide et al., 2007; Montano et al., 1995; Yang et al., 2008).

N- terminale Domäne (NTD)

Bis heute ist nur wenig über die Struktur der NTD bekannt. Die Aminosäuren der NTD weisen eine intrinsisch-ungeordnete Konformation auf. Ein Zusammenspiel von aktivierenden Transkriptionsfaktoren wird vermutet (Chandra et al., 2008; Wärnmark et al., 2001). In den Sequenzbereichen von DBD und LBD weisen ER- α und ER- β mit mehr als 95- beziehungsweise circa 55% bekannter Aminosäureidentität eine hohe Homologie auf. Im Bereich der NTD jedoch ist ER- β kürzer als ER- α und die Aminosäureidentität stimmt nur mit etwa 15% überein (Cowley et al., 1997; Kuiper et al., 1996; Kumar et al., 2011; Mosselman et al., 1996; Tremblay et al., 1997).

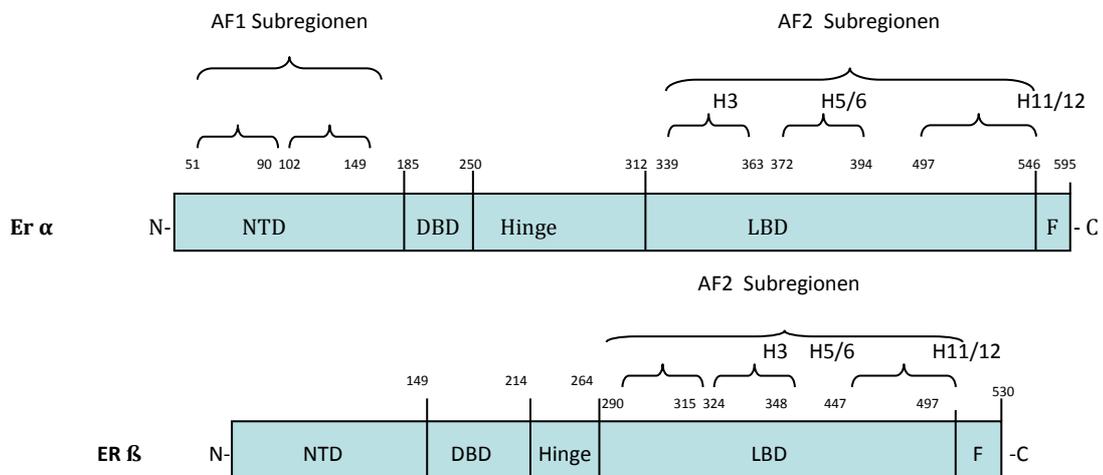


Abb. 05: Östrogenrezeptor α und β .

Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Sequenzbereiche; „Hinge“; Hinge-Region (Gelenkregion), „F“= „F“ Region, „LBD“ =Ligandenbindende Domäne, „DBD“= DNA-bindende Domäne, „NTD“= N-terminale Domäne, „AF 1/2“= Domänen mit aktivierender Funktion, „N“= N-Terminus, „C“= C-Terminus

Nukleäre Rezeptoren sind allosterische Transkriptionsfaktoren, die einen funktionellen Interaktionskomplex mit Liganden, DNA, transkriptionellen Kofaktorproteinen und Korepressoren bilden (Glass und Rosenfeld, 2000; Nagy et al., 1999). Der Carboxyterminale Helix (H12) der LBD agiert hierbei als molekularer Schalter, dessen Position die transkriptionelle Aktivität des Rezeptors bestimmt. Bei Andocken eines Agonisten, bildet H12 eine hydrophobe Bindungstasche für koaktivierende Proteine aus, indem eine Kopplung zwischen H3 und H11 gebildet wird. Die koaktivierenden Proteine interagieren nun mit dem nukleären Rezeptor via Aminosäuremuster, die an diese Bindungstasche docken, auch als AF2-Domäne bekannt (Darimont et al., 1998; Nolte et al., 1998, Shiao et al., 2002). Im Gegensatz dazu, dockt H12 bei Antagonisten-Bindung in seine eigene hydrophobe Tasche. Die Bindungstasche ist folglich für Agonisten nicht

mehr zugänglich und so fungiert H12 durch die dynamische Lokalisation als allosterischer Kontrolleur der Transkriptionsaktivität von AF2 (Brzozowski et al., 1997).

1.7.2 SERMs

Selektive Östrogen Rezeptor Modulatoren (SERMs) sind synthetische nicht-steroidale Moleküle und verfügen über unterschiedliche gewebsspezifische, agonistische oder antagonistische Wirkprofile. Damit steuern sie die Gentranskription an ER- α und ER- β . Ein SERM bindet an ER- α oder ER- β oder an beide. Daraus folgt eine Änderung der dreidimensionalen Konformation des Liganden-Rezeptor-Komplexes. Abhängig vom Gewebe wirken die meisten SERMs im Knochen agonistisch und im Brustgewebe antagonistisch bezüglich Östrogen (Maximov et al., 2013; Clarke und Khosla, 2009). Auf zellulärer Ebene erleichtern agonistische SERMs die Interaktion des ER mit einem Koaktivator, wohingegen antagonistische SERMs das Zusammenspiel des ER mit Korepressoren begünstigen (Hall, 2005; Bjornstrom, 2005).

Derzeit sind Seitens der Federal Drug Agency (FDA) SERMs im Bereich der Osteoporosetherapie (Raloxifen), zur Vorbeugung bzw. zur Behandlung von Brustkrebs (Tamoxifen, Toremifen, Raloxifen) und auch der postmenopausalen Atrophie der Vagina (Ospemifen) in der Therapie zugelassen (Pinkerton, 2013).

1.7.3 Expressionsunterschiede von ER- α und ER- β zwischen Krebs- und gesundem Gewebe

Im gesunden Ovar werden ER- α und ER- β in unterschiedlichen Zelltypen, wie z.B. im Oberflächenepithel exprimiert (Byers et al., 1997). ER- β ist jedoch mit einem Verhältnis von 1:2 (ER- α :ER- β mRNA) vorwiegend exprimiert. Dies konnte auch auf Proteinebene in Studien von Rutherford et al., (2000) gezeigt werden.

Bindet Östrogen an ER- α , so werden Signaltransduktionsprozesse in Gang gesetzt, die die neuronale Zellproliferation stimulieren, wohingegen eine Interaktion mit ER- β eine östrogen-abhängige Apoptose in neuronalen Zellen herbeiführt (Nilsen et al., 2000). ER- β -Transkripte wurden kürzlich in benignen und malignen Epithelialkarzinomen des Ovars gefunden. In metastasierenden Ovarialkarzinomen hingegen ist ER- β kaum nachweisbar. In frühen Tumorstadien kann eine erhöhte Expression von ER- α

beobachtet werden. Metastasierende Tumore exprimieren lediglich ER- α mRNA. Ist ER- β mRNA doch vorhanden, liegt diese nur in einer sehr geringen Konzentration vor. Diese Tumore werden charakterisiert durch das absolute Fehlen von ER- β (Rutherford et al., 2000).

Die Verteilung der ER-Subtypen steht in Zusammenhang mit klinischen Faktoren. Dadurch sollen neue Prognosefaktoren für Ovarialkarzinompatientinnen dargelegt werden. Es zeigte sich, dass die Expression von ER- β , aber nicht ER- α , signifikant höher in unauffälligem Gewebe vorzufinden ist, als in malignem Gewebe. Nach Chan et al., (2008) wird in Stadium I Tumoren deutlich mehr ER- β exprimiert als in Tumoren in einem höheren Stadium. Eine höhere Expression von ER- β soll mit einer längeren krankheitsfreien Überlebensrate und auch mit einem höheren Gesamtüberleben korrelieren (Chan et al., 2008; Rutherford et al., 2000). Der Verlust von ER- β Expression in Ovarialkarzinomen kann somit als Merkmal für eine bösartige Zelltransformation herangezogen werden (Chan et al., 2008).

2 ZIEL DER DIPLOMARBEIT

Obwohl der Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom) eine führende Todesursache bei gynäkologischen Erkrankungen und die fünft-häufigste Krebserkrankung mit Todesfolge für Frauen der westlichen Welt ist, bleibt das Wissen um die Ätiologie dieser Tumore sehr limitiert. Aufgrund der anfänglichen Symptomfreiheit, fehlender Screeningverfahren und der hohen Heterogenität der Tumorarten erfolgt eine Erstdiagnose meist erst im fortgeschrittenen Stadium, was auch zu der schlechten Prognose beiträgt. Ein weiteres Problem stellt die rasche Resistenzentwicklung gegenüber Standardtherapeutika nach anfänglich guter Ansprechbarkeit auf die Chemotherapie dar. Es ist bekannt, dass Steroidhormone und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Ovarialkarzinomen spielen. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren für das Gesamtüberleben der Ovarialkarzinompatientinnen wichtig sind. Die Steroidhormone Progesteron und Östrogen binden an nukleäre Rezeptoren und regulieren dadurch Zellproliferation und Differenzierung. Wichtig ist dabei, dass die zwei Isoformen des Östrogenrezeptors (ER- α und ER- β) eine unterschiedliche Wirkung auf das Fortschreiten dieser Tumore haben. ER- α scheint als Tumorpromoter durch Zellwachstum zu stimulieren, wohingegen ER- β einen proapoptotischen und antiproliferativen Effekt besitzt (Bardin et al., 2004; Choi et al., 2001). In dieser Diplomarbeit war es daher das Ziel, in einem ausgewählten Patientenkollektiv klinische Daten, wie Tumorsubtyp, Alter der Patientin, Tumorgrading, FIGO-Klassifikation, postoperativer Tumorrest, progressionsfreier Zeitraum und Gesamtüberleben mit Expressionsrate und Lokalisation von ER- α und ER- β im tumorösen Gewebe in Beziehung zu setzen. Dies erfolgt durch immunhistochemische Färbung der Rezeptoren an Paraffinschnitten von Tumorgewebe.

Eine quantitative Auswertung der mikroskopischen Bilder sollte unter Verwendung der HistoQuest[®] Software erfolgen. Es soll die Intensität der immunoreaktiven Färbung der Rezeptoren und des Prozentsatzes an positiv gefärbten Zellen als „Immunoreactive Score“ (IRS) in den verschiedenen Proben bestimmt werden. Diese Ergebnisse werden mit den klinischen Daten der Patientinnen in Beziehung gesetzt.

Diese Studie soll es ermöglichen, die Bedeutung der von ER- α und ER- β beim Ovarialkarzinom zu bestimmen, um therapeutische Ansätze, wie die Verwendung von SERMs, untersuchen zu können.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Verwendete Materialien und Mischungsverhältnis

Materialien

- Bovine Serum Albumine (BSA) (PAN Biotech GmbH, Aldenbach, GER)
- ChemMate™ Hematoxylin (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)
- DAKO-Pen (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark)
- Deckgläser 24x50mm Borosilicate Glass, Thickness No.1 (VWR International)
- Epitop Retrieval Solution; DEPP- Buffer (20x Konzentrat; Eubio, Wien, AUT)
- Eppendorf Tubes 1,5 mL (Biozym Biotech Trading GmbH)
- Ethanol absolut (Merck, Darmstadt, GER)
- Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Microwave
- Phosphate-Buffered Saline (PBS) pH 7,4
- Tween® 20 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- Ultra Vision LP Detection System (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA)
 - Ultra Vision Protein Block
 - HRP Polymer
 - DAB Plus Chromogen
 - DAB Plus Substrate
- Vortex Labinco L24
- Xylol (Merck, Darmstadt, GER)

Mischverhältnisse

- Herstellung von 1x PBS, pH7,4
- Herstellung von PBS/Tween 0,05%
- Herstellung von BSA/PBS

Antikörper

- ER- α (Clone 1D5, mouse IgG1, Dako, Denmark)
- ER- β (Clone 14C8, mouse IgG2b, Abcam, UK)

3.2 Patientinnen

Paraffinschnitte von Ovarialkarzinomen wurden in Zusammenarbeit mit dem EU-Projekt „Ovarian Cancer Diagnosis (OVCAD, 2008 to 2010) als Teil einer multizentrischen Studie zwischen Berlin (Charité/Campus Virchow-Klinikum, Universität Berlin, Deutschland), Hamburg (Institut für Tumorbologie, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, Deutschland), Leuven (Division of Gynaecologic Oncology, University Hospitals Leuven, Belgium), Innsbruck (Department für Geburtshilfe und Gynäkologie, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich) und Wien (Department für Geburtshilfe und Gynäkologie, Medizinische Universität Wien, Österreich). Die Berechtigungen des Ethikkomitees bezüglich der OVCAD-Studie waren die Erlaubnis zur Etablierung einer Tumor-Datenbank (EK 260/2003 und EK 366/2003) und die Bewilligung für das Projekt „Charakterisierung neuer molekularer prognostischer Faktoren für Patientinnen mit fortgeschrittenem epithelialen Eierstockkrebs“ (EK 792/2011). Klinische Parameter für jede Patientin wurden bereitgestellt und die Zustimmung aller Patientinnen eingeholt.

Für diese Diplomarbeit wurden im Fall ER- β 9 Ovarialkarzinomproben von Patientinnen, welche sich einer Routineoperation in Folge einer bösartigen Tumorerkrankung unterzogen haben, gezogen und zur pathologischen Untersuchung am AKH bereitgestellt. Im Fall ER- α wurden OVCAD-Microarray-Stanzen von 243 Patientinnen verwendet.

Tab. 03: Patientencode, primärer Antikörper ER- β ; Detektiersystem

Patientencode	Primärer AK	Mischverhältnis	Detektiersystem
3020/07 OVLI V022	ER- β	1:50 (2 μ L + 98 μ L)	Ultra Vision
17115/06B024	ER- β	1:50 (2 μ L + 98 μ L)	Ultra Vision
E11891/06 RE B015	ER- β	1:50 (2 μ L + 98 μ L)	Ultra Vision
E12990/06 II B014	ER- β	1:50 (2 μ L + 98 μ L)	Ultra Vision
2881/06 V008 öd	ER- β	1:50 (2 μ L + 98 μ L)	Ultra Vision
2493/08 V049	ER- β	1:50 (2 μ L + 98 μ L)	Ultra Vision

Tab. 03: Fortsetzung

16325/ 06 II D B018	ER- β	1:50 (2 μ L + 98 μ L)	Ultra Vision
6149/06 III V017 0D	ER- β	1:50 (2 μ L + 98 μ L)	Ultra Vision
E20370/06 RG B028	ER- β	1:50 (2 μ L + 98 μ L)	Ultra Vision

3.3 Färbemethoden

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein spezielles Färbeverfahren, mit welchem Proteinstrukturen von bestimmtem Gewebe mittels spezifischer Antikörper, sichtbar gemacht werden können. Die Grundlage dieser Färbung bildet eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung. Die Qualität des Ergebnisses hängt stark von der des Antikörpers ab und mit welcher Affinität und Spezifität dieser an die Antigenregion (das Epitop) bindet. Ein Epitop besteht aus fünf bis zehn Aminosäuren. Die Immunhistochemie findet häufig Anwendung im Bereich der Pathologie, da diverse Tumorerkrankungen untersucht werden können. Es werden zytologische, sowie auch histologische Präparate (Kyro-, Paraffinschnitte) untersucht (Lloyd, 2010).

Das Verfahren der indirekten Immunhistochemie verläuft in zwei Schritten. Zuerst bindet der sogenannte primäre Antikörper an das Epitop des Antigens vom Gewebe. Anschließend visualisiert man die stattgefundenene Reaktion mittels Bindung eines mit einem Horseradish-Peroxidase (HRP) markierten sekundären Antikörpers (Lloyd, 2010).

Der Antikörper

In der Immunhistochemie werden zwei Arten von Antikörpern angewendet. Polyklonale und monoklonale. Polyklonale Antiseren werden produziert, in dem man ein Versuchstier (wie z.B. Hasen, Ziege, Schaf oder Esel) durch Impfen gereinigter Antigene zur Antikörperproduktion stimuliert. Nach periodischem Abernten wird das Immenserum gewonnen. Polyklonale Antikörper sind sehr reaktiv und besitzen eine hohe Avidität, was jedoch auch zu unerwünschten Kreuzreaktionen mit dem zu

untersuchenden Geweben führen kann und somit bei der Auswertung zu viel unwillkommener Background-Information führt (Lloyd, 2010).

Monoklonale Antikörper hingegen werden durch Fusion von Myelomzellen mit immunglobulinproduzierenden Milzzellen von immunisierten Tieren hergestellt. Durch diese Verbindung sterben die so entstandenen Zellen nicht mehr ab und können somit ständig vom Medium abgeerntet werden. Die Reaktion von monoklonalen Antikörpern ist spezifisch auf ein Epitop ausgerichtet und führt folglich zu einer sehr hohen Reaktionsspezifität (Lloyd, 2010).

Wie bereits erwähnt können zur Untersuchung Gewebestücke oder Zellen verwendet werden. Diese können entweder frisch, gefroren (Kyropräparate) oder konserviert durch die Fixierung in Paraffin (Paraffinschnitte) vorliegen. Für die pathologischen Untersuchungen werden meist Paraffinschnitte verwendet (Lloyd, 2010).

Diese Konservierung führt jedoch oft zur Denaturierung und Präzipitation der Gewebsproteine, wodurch die Epitopstelle für den Antikörper nicht mehr zugänglich ist. Demzufolge muss die Epitopregion und das Antigen mittels Hitze einwirkung wieder hergestellt werden (Lloyd, 2010).

Die Arrays des Ovarialkarzinoms werden bei 4°C im Kühlraum gelagert. Da die Gewebsschnitte bzw. Microarrays in Paraffin eingebettet sind, werden sie zunächst für die Entfettung mit Xylol und anschließend mit 100% Ethanol behandelt. Dies geschieht entweder mittels der Alkoholverdünnungsreihe oder mittels 3 minütiger Xylol/Ethanol-Behandlung und anschließender Zugabe von DEPP-Buffer, in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit des verwendeten Antikörpers. Es wird mittels Probefärbungen und verschiedenen Verdünnungsstufen des Antikörpers die optimale Behandlung und Antikörperkonzentration eruiert. Im Fall des ER- α -Antikörpers wurde die Depp-Buffer-Methode und eine Verdünnungsstufe von 1:50 verwendet. Bei ER- β wurde aufgrund des sensiblen Antikörpers keine Microarrays, sondern Gewebsschnitte, sowie die Alkoholverdünnungsreihe und eine Verdünnungsstufe von 1:50 verwendet. Bei der Alkoholverdünnungsreihe werden die Schnitte als erstes für 25 Min in einen Wärmeschrank mit konstanten 60°C gestellt, um das Paraffin zu schmelzen. Anschließend werden die noch warmen Slides 3x 10 Min mit Xylol, 2x 5 Min mit 100% Ethanol und jeweils 5 Min mit 96%, 85%, 70%, 50% und 30% Ethanol zur

Gewebsrehydrierung gewaschen. Abschließend werden die Schnitte 3x 5 Min mit PBS gewaschen und für 25 Min in einer Citrat-Buffer-Lösung bei pH 6 in einem Plastikgefäß mit aufgelegtem Deckel in den Dampfgarer gestellt. Nach 20 minütigem Abkühlen auf Raumtemperatur wird nach dem Standard-Immunhistoprotokoll weitergearbeitet. Nach der Entparaffinierung werden die Slides in ein Plastikgefäß gelegt, welches mit 1:20 verdünntem Antigen-Retrieval Buffer (DEPP Buffer) gefüllt ist. Da der DEPP-Buffer zwanzigfach konzentriert vorliegt, werden 2,5mL DEPP-Buffer mit bidestilliertem Wasser auf 50mL aufgefüllt. Das Plastikgefäß wird mit daraufgelegtem Deckel für 10 Min in der Mikrowelle auf Stufe 1 erhitzt. Wichtig ist hierbei, dass sich das gesamte zu untersuchende Gewebe in der Flüssigkeit befindet. Im nächsten Schritt wird das Gefäß aus der Mikrowelle genommen und man lässt es ohne Deckel 25 Min auf Raumtemperatur abkühlen. Während dieser Abkühlphase wird die 10%ige BSA-Lösung vorbereitet. Die AK-BSA-Mischung wird hergestellt und vor dem Auftragen gevortext.

Nach dem Abkühlen werden die Slides jeweils 3x 3 Min in PBS/TWEEN 0,05% (pH=7,4) gewaschen um die Membrandurchlässigkeit zu verbessern und die Antigenstellen besser hervorzuheben. Nach dem Waschen werden die Slides vorsichtig mit einem Papiertaschentuch abgetupft und das Gewebe mit einem Fettstift (Dako-Pen) umrandet, um den Flüssigkeitsverbrauch auf den Slides zu minimieren. Als nächstes werden 2-3 Tropfen einer Blocking-Solution ("Ultra V-Block") auf die Gewebsbereiche getropft, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Slides werden mit der Blocking-Solution unter Verwendung einer Feuchtkammer 7 Min lang inkubiert. Im nächsten Schritt wird die überschüssige Flüssigkeit auf einem Papiertuch abgeklopft und 90µL einer AK-BSA-Mischung aufgetragen. Die Präparate werden anschließend bei 4°C im Kühlraum über Nacht gelagert.

Am darauffolgenden Morgen werden die Schnitte wieder jeweils 3x 3 Min mit PBS/TWEEN 0,05% gewaschen und danach für 10 Min mit einem AK-Enhancer versetzt. Es folgt wieder dreimaliges waschen mit PBS/TWEEN 0,05% für jeweils 3 Min. Als nächstes wird das HRP-Polymer in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 30 Min inkubiert. Dieses ist lichtempfindlich und wird somit im dunklen aufgetragen.

Die Slides werden wieder auf einem Papiertuch abgeklopft und 3x 3 Min mit PBS/TWEEN 0,05% gewaschen. Während dem Waschen wird das "DAB Plus Substrat" mit "DAB Plus Chromogen" in einem Verhältnis 1:5 manuell vermischt. Vortexen wäre

hier schadhaft für die Reagenzien, da es sich um färbende Makromoleküle handelt. Die Auftragezeit wird mit Hilfe des Lichtmikroskops bestimmt, während ein Stoppbad aus bidestilliertem Wasser bereitsteht. Die Einwirkzeit war im Fall ER- α 6 Min und ER- β 25 Min.

Es wird anschließend 4x mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin wird zur Kernfärbung eine Mischung von Hämatoxylin und Wasser im Verhältnis 1:2 für genau eine Minute auf den Schnitten inkubiert und im nächsten Schritt in ein Glasgefäß mit Leitungswasser gestellt und 5 Min gut gespült.

Um die Präparate gut zu konservieren, werden mit einer Eppendorfpipette, bei welcher die Spitze der Kanüle mit der Schere abgeschnitten wird, etwa 80 μ L Fluoromount blasenfrei aufgezogen und auf die einzelnen Objektträger aufgetragen. Abschließend wird dieser Tropfen mit einem 24x50 Deckglas (VWR) bedeckt und möglichst luftblasenfrei abgedeckt. Die fertig konservierten und gefärbten Slides werden noch mit Ethanol gereinigt bevor sie im Mikroskop betrachtet werden.

3.4 Automatisierte mikroskopische Imageanalyse und Datenauswertung

Verwendet wurde hierbei das TissueFAXS[®] Cell Analysis System (Version 2.0.4.0147) der Firma TissueGnostics[®] GmbH, Vienna, Austria. Dieses System gliedert sich in folgende Einzelkomponenten:

Zeiss Axio Imager Z1 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Germany)

TissueFAXS[®] Software, Version 4.1.5.10 (TissueGnostics GmbH, Vienna, Austria)

HistoQuest[®] Software, Version 3.5.3.0173 (TissueGnostics GmbH, Vienna, Austria)

HistoQuest[®] Software, Version 4.0.4.0131 (TissueGnostics GmbH, Vienna, Austria)

TissueFAXS®



Abb. 06: TissueFAXS®-System

Das TissueFAXS® ist ein Gerät der Firma TissueGnostics und beinhaltet High-Tech-Hardware, einen Multi-Core-Computer und ein Multi-Kanal-Mikroskop. Mit dem TissueFAXS® ist es möglich, die vorher immunhistochemisch eingefärbten Gewebsschnitte digital in höchster Qualität aufzunehmen. Die digitalen Aufnahmen können in Folge in das weiterführende Programm HistoQuest® exportiert werden. Anschließend ist es möglich eine quantitative Analyse der Gewebsschnitte zu erstellen.

Zuerst wird von den Slides eine Preview erstellt. Die Slides werden einzeln ausgewählt und mit Datum und Namen versehen. Sobald die Preview-Bilder aufgenommen sind, werden die gewünschten Regions of Interest (ROIs), im Fall ER- α die zu untersuchenden Arrays, ausgewählt. Hierbei ist es wichtig, dass der Fokus, die Sättigung, die Durchlichtlampe, der Kondensator und die Exposure-Time richtig eingestellt und protokolliert werden. Zum Schluss erhält man dann einen Gesamtüberblick der Arrays und hat die Möglichkeit jedes einzelne Field of View (FOV) in hoher Auflösung und vergrößert anzusehen. Die Bildaufnahme erfolgte in einer 200-fachen Vergrößerung.

HistoQuest®-Analyse

Die bereits im Vorhinein mit dem TissueFAXS® eingescannten Mikroarrays werden zur quantitativen Analyse mit den Softwareprogrammen (HistoQuest® Software, Version 3.5.3.0173 und HistoQuest® Software, Version 4.0.4.0131) der Firma TissueGnostics

zur statistischen Auswertung von immunhistochemisch gefärbte Zellen erfasst und in einzelne Bildblöcke unterteilt. Anschließend werden zu jedem erfassten Slide bzw. Bildblock Projekte mit der entsprechenden Bezeichnung erstellt und die Master- und Markerfunktionen gewählt. Im Rahmen der Analyse von ER- α handelt es sich um "Nucleus" als Masterfunktion und dem "Östrogenrezeptor- α " als Markerfunktion.

Im nächsten Schritt werden ROIs in den einzelnen Mikroarrays eingezeichnet. Von jeder Patientin liegen jeweils zwei Gewebestanzten vor, welche auf den Slides parallel angeordnet sind. So ist es möglich die Gewebe von jeder Patientin in die drei Gruppen Tumor, Stroma und Immunzellen zu unterteilen. Im Anschluss wird mit Hilfe von eigens gewählten Farbeinstellungen (Blau entspricht dem Nucleus und Braun dem ER- α) und den kreierten ROIs eine differenzierte Analyse gestartet.

Zur Zelldetektion patentierte Algorithmen ermöglichen dem Programm die automatische Auswertung der Farbintensität (Blau und Braun), sowie auch der Flächenprozent des zu bestimmenden Antigens. Zum Schluss wird noch ein manuelles Cut-off gesetzt (36 bei ER- α) und die analysierten Stellen werden in den unterschiedlichen Farb- und Schattenkanälen kontrolliert, was die Analyse zusätzlich präzisiert.

Immuno-reactive-Score

Die Formel für den Immuno-reactive-Score (IRS) ist das Produkt des Mittelwertes der Intensität und der Prozentzahl von immunhistochemisch positiv gefärbten Zellen. Die statische Analyse wurde mit der Software SPSS 19.0 vorgenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 ER- α Expression in Ovarialkarzinomen

Um die Expression von ER- α in ovariellen Karzinomen zu untersuchen, wurden Microarray-Schnitte von 243 Patientinnen immunhistochemisch (IHC) untersucht. Für die Immunhistochemie wurde ein Antikörper gegen ER- α verwendet und als Zweitantikörper wurde ein gegen das IgG des Erstantikörpers gerichteter Peroxidase-markierter Zweitantikörper verwendet. Die immunreaktiven Proteine wurden durch die enzymatische Umwandlung des DAB Chromogen zum braunen Reaktionsprodukt visualisiert. Die Zellkerne, welche mit Hämatoxylin behandelt wurden, erscheinen im mikroskopischen Bild blau und dienen der Erkennung der einzelnen Zellen.

Aufgrund unzureichender Qualität der Präparate und teilweise nicht vorhandener klinischer Daten (Alter, FIGO-Stadium, Tumorgrading, Vorliegen eines postoperativen Resttumors) konnten lediglich 110 der insgesamt untersuchten 243 Patientenproben in die Studie miteinbezogen werden. Die statistische Analyse wurde letztlich mit einem Gesamtkollektiv von 110 Patientinnen durchgeführt. Seröse Tumorsubtypen (n=92) wurden zusätzlich getrennt analysiert, um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten innerhalb der Studie zu erreichen.

Nach der Aufnahme der OVCAD-Microarrays mit dem TissueFAXS[®] wurden die virtuellen Bilder der gefärbten Schnitte im Programm HistoQuest[®] analysiert, wobei „Tumorzellen, Stroma und Immunzellen“ als eigene Gruppen hinsichtlich der Farbintensität und der Anzahl der ER- α -positiven Zellen analysiert wurden.

4.2 Nachweis von ER- α mittels IHC

In Tab. 04 sind die Daten der Ovarialkarzinompatientinnen angeführt, deren Präparate für den Nachweis von ER- α verwendet wurden und die in den Abb. 07-14 gezeigt sind.

Tab. 04: Patientencode, Slide Code, klinische Parameter

Code Patient/ Präparat	Tumortyp	Stadium	Ansprechen auf Chemotherapie	Rezidiv	Lymphknoten/ Fern- metastasen
B024	serös	G3/IIIC	Ja	Nein	N0/M0
B038	serös	G3/IIIC	Ja	Nein	N1/M0
B048	muzinös	G3/IIIC	Ja	Ja	N0/M0
L047	Gemischt epithelial	G3/IIIC	Ja	Ja	N1/M0
L111	Gemischt epithelial	G3/IIIC	Ja	Ja	N0/M0
L141	CCC	G3/IIIC	Nein	Ja	NX/M0
V011	endometroid	G3/IIIC	Nein	Ja	NX/M0
V043	endometroid	G1/IIIC	Ja	Nein	-/-

Beispiele für die Immunlokalisation von ER- α sind in den Abb. 07-14 gezeigt:

Seröses OC:

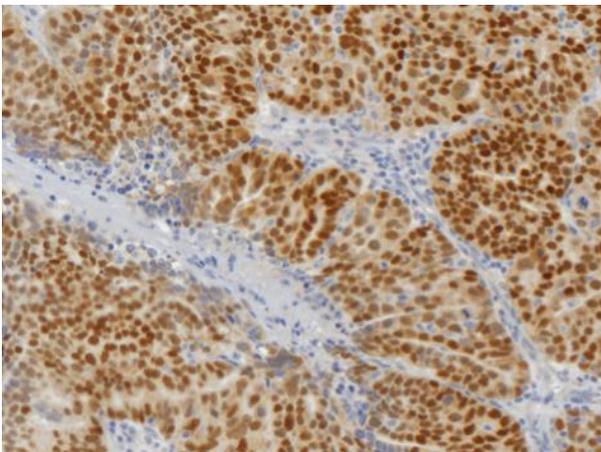


Abb. 07: Nachweis von ER- α in einem Ovarialkarzinompräparat der Patientin B038

Eine sehr starke immunoreaktive ER- α -Färbung ist im Kern und Zytoplasma der Tumorzellen nachweisbar. Keine Färbung ist im Stroma sichtbar. Gelegentlich ist ER- α in den Immunzellen nachweisbar.

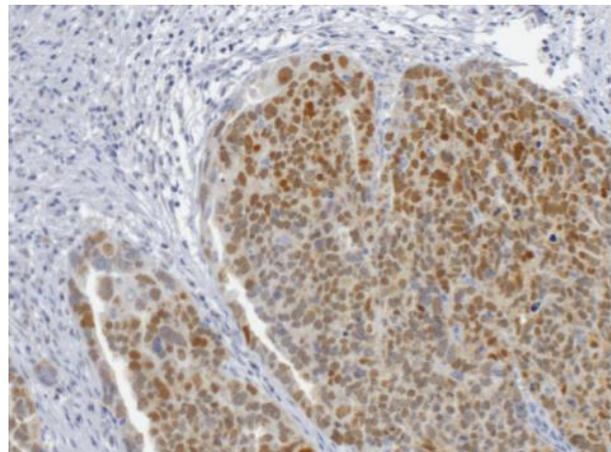


Abb. 08: Nachweis von ER- α in einem Ovarialkarzinompräparat der Patientin B024

Sichtbar ist eine starke ER- α Färbung in den Tumorzellen. Im Zytoplasma ist ER- α schwach nachweisbar. Das Tumorstroma ist negativ.

Gemischt epitheliales OC:

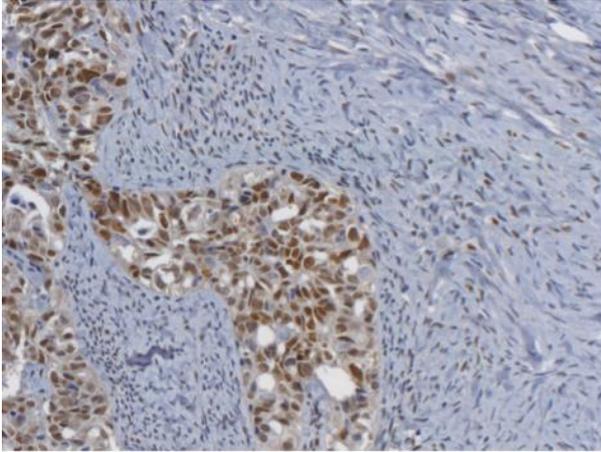


Abb. 09: Nachweis von ER- α in einem Ovarialkarzinompräparat der Patientin L047

ER- α Expression ist in den Kernen der Tumorzellen und auch in Kernen von Stromazellen nachweisbar. Auch im Zytoplasma der Tumorzellen ist ER- α durch eine schwache Färbung nachweisbar.

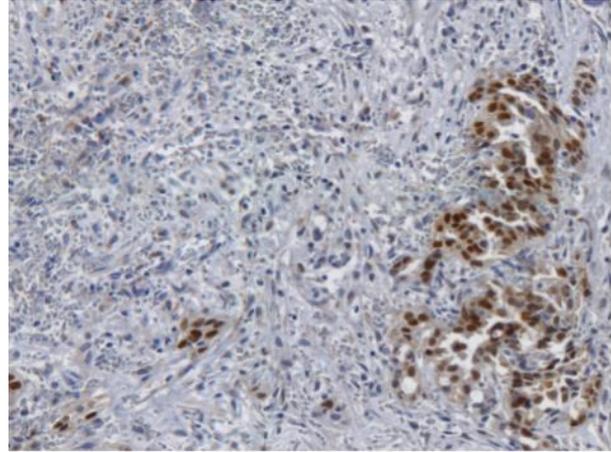


Abb. 10: Nachweis von ER- α in einem Ovarialkarzinompräparat der Patientin L111

Die starke Kernfärbung zeigt ER- α in den Tumorzellen, während im Zytoplasma ER- α nur eine schwache Färbung aufweist. Einzelne Zellen im Stroma sind ER- α positiv.

Muzinöses OC:

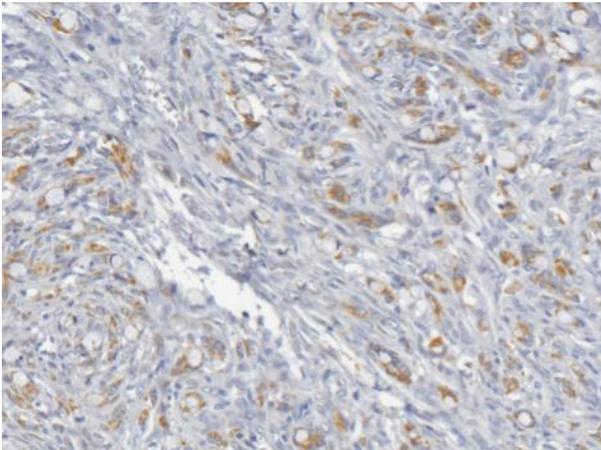


Abb. 11: Nachweis von ER- α in einem Ovarialkarzinompräparat der Patientin B048

Keine ER- α Kernfärbung ist bei diesem Tumor sichtbar. Allerdings lässt sich eine schwache Färbung von ER- α im Zytoplasma der Tumorzellen nachweisen. Die Zellen in diesem Gewebe sind sehr wenig differenziert.

Klarzellkarzinom:

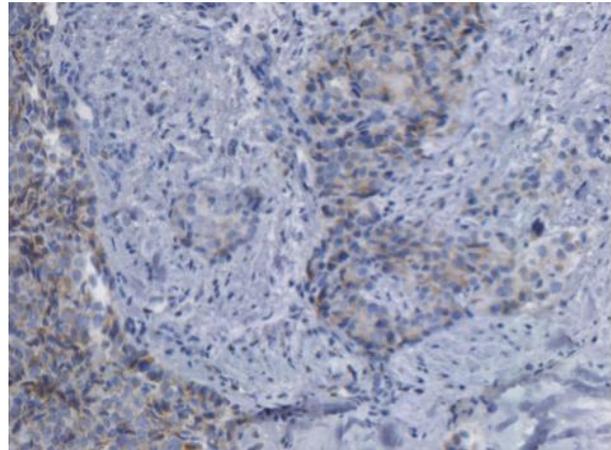


Abb. 12: Nachweis von ER- α in einem Ovarialkarzinompräparat der Patientin L141

Die Kernfärbung für ER- α ist nur in wenigen Zellen zu finden. Meist findet sich ER- α im Zytoplasma der Tumorzellen, während die Stromazellen keine ER- α Immunreaktivität aufweisen.

Endometroides OC:

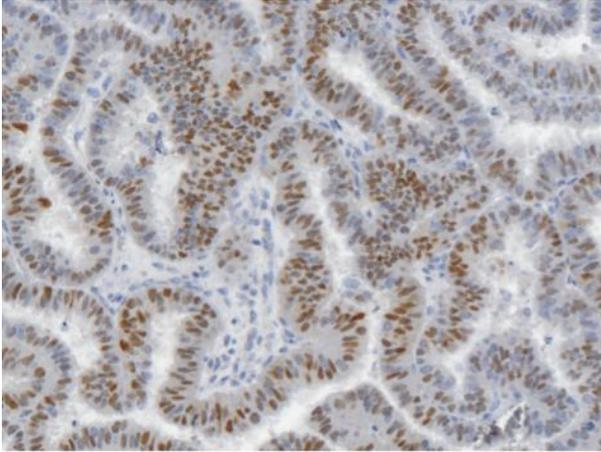


Abb. 13: Nachweis von ER- α in einem Ovarialkarzinompräparat der Patientin V011

Die Kerne der Tumorzellen sind durch den ER- α Antikörper stark gefärbt, während im Zytoplasma die ER- α Färbung sehr schwach ist. Kein immunreaktiver ER- α findet sich in den Stromazellen.

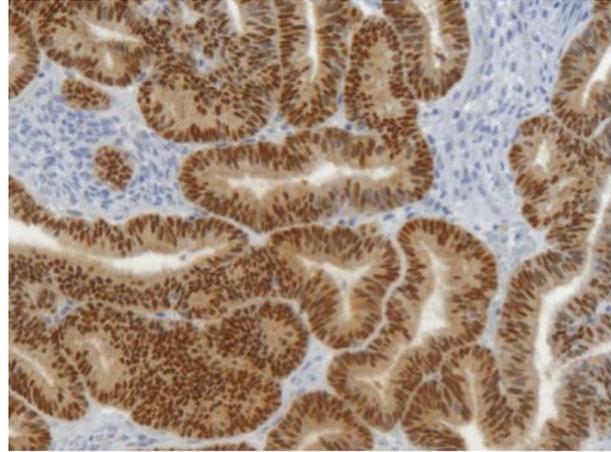


Abb. 14: Nachweis von ER- α in einem Ovarialkarzinompräparat der Patientin V043

Die Kerne der Tumorzellen sind durch den ER- α Antikörper sehr stark braun gefärbt, auch im Zytoplasma ist die ER- α Färbung stark ausgeprägt. Kein ER- α Nachweis findet sich in den Stromazellen.

Zusammenfassung:

Wie in den Abb. 07-14 gezeigt, lässt sich ER- α vorwiegend in den Kernen seröser Tumore lokalisieren. ER- α im Kern ist der aktive Rezeptor, liegt er im Zytoplasma vor, so ist dieser inaktiv. Eine schwache ER- α Färbung im Zytoplasma des Tumors konnte bei serösen, gemischt epithelialen und Klarzellkarzinomen gefunden werden. Kein ER- α im Zellkern konnte bei muzinösen Tumorsubtypen nachgewiesen werden.

4.3 Prognostische Bedeutung von ER- α bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom

Die Zusammenstellung der Daten über eine starke und geringe ER- α -Expression in Ovarialkarzinompräparaten ist in Tab. 05 zusammen mit den klinischen Daten der Patientinnen gezeigt. Die Werte für eine starke (<Medianwert) und eine geringe (>Medianwert) Expression von ER- α wurden nach Berechnung des Medianwertes aus den immunoreaktiven Scores (IRS) von ER- α in allen Ovarialkarzinomschnitten ermittelt.

Tab. 05: Patientenkollektiv, unterteilt nach ER- α gering und ER- α stark exprimierenden Tumoren

Patientencharakteristika: Alter, histologischer Tumortyp, FIGO-Stadium, Tumorigradung, postoperativer Resttumor in Korrelation mit der ER- α -Expression in den Tumoren. Angegeben sind IRS-Werte für ER- α ; Geringe Expression (<Median), starke Expression (>Median).

¹Fisher's Exact test

*) Angaben fehlen in einem Fall

N=110	ER-α-low: n(%)	ER-α-high: n(%)	p
Patientinnenkollektiv	55(50)	55(50)	
Alter			
≤ 55 (n=47)	21(44.7)	26(55.3)	
> 55 (n=63)	34(54)	29(46)	0.335
Histologischer Tumorsubtyp			
Serös (n=92)	47(51.1)	45(48.9)	
Non-serös (n=18)	8(44.4)	10(55.6)	0.606
FIGO-Stadium			
II (n=4)	1(25)	3(75)	
III (n=90)	44(48.9)	46(51.1)	0.393 ¹
IV (n=16)	10(62.5)	6(37.5)	
Tumorigradung			
Grade 1-2 (n=26)	11(42.3)	15(57.7)	
Grade 3 (n=84)	44(52.4)	40(47.6)	0.369
Postoperativer Resttumor*)			
nein (n=79)	38 (48.1)	41(51.9)	
> 0 cm (=30)	16(53.3)	14(46.7)	0.626

Es wurden Ovarialkarzinomproben von 114 Patientinnen mittels IHC auf die Expression von ER- α untersucht. Wegen unvorhersehbarer Komplikationen während der immunhistochemischen Färbung (schlechte Präparatqualität) wurden nur optimal auswertbare Proben von 110 Patientinnen mit der HistoQuest[®] Software quantitativ auf ER- α Immunreaktivität analysiert. Dabei wurde die Intensität der Färbung und die Anzahl der gefärbten Zellen bestimmt und daraus wurde der IRS der Einzelpräparate berechnet. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der IRS-Werte in den einzelnen Proben zeigen, dass vom Median berechnet, 50% der Patientinnen als ER- α hoch und als 50% ER- α niedrig exprimierend einzustufen sind. Repräsentative Bilder bezüglich der ER- α Färbung sind in Abb. 07-14 zu sehen. Das mittlere Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der zytoreduktiven Operation war 56 Jahre (es lag zwischen 18 und 85 Jahren). An allen Patientinnen mit FIGO II (4 Patientinnen; 3,63%), FIGO III (90 Patientinnen; 81,82%) und FIGO IV (16 Patientinnen; 14,55%) wurde eine optimale zytoreduktive Operation mit anschließender Chemotherapie durchgeführt. Die

mediane Verlaufsbeobachtungszeit betrug 51 Monate. Während der Observierungszeit verstarben 49 Patientinnen.

4.3.1 Berechnung des Einflusses von klinischen Parametern und ER- α auf den progressionsfreien Zeitraum; Daten für das Gesamtkollektiv (n=110)

Der Wald-Test basiert darauf, dass die maximale Wahrscheinlichkeit eines unbekanntes Parameters (jeder Parameter der Analyse gilt als Schätzwert) auf einer Normalverteilung beruht. Hierbei wird geprüft, ob unabhängige Variablen (in diesem Fall klinische Parameter (Alter, Tumorgrading, FIGO-Klasse, postoperativer Tumorrest) und der nicht klinische Parameter ER- α) einen signifikanten Einfluss auf ein generalisiertes lineares Regressionsmodell (in diesem Fall progressionsfreier Zeitraum und Gesamtüberleben) haben. Dieser statistische Test wird für große Beobachtungszahlen verwendet. Bei einer univariaten und multivariaten Analyse von einer großen Anzahl (n) der Stichproben, ist die Teststatistik dann asymptotisch Chi-Quadrat-verteilt (stetige Wahrscheinlichkeitsverteilung; aus der Normalverteilung mit Freiheitsgraden (df) abgeleitet) (Pruscha, 2006; Wollschläger 2010).

Tab. 06: Statistische Analyse mit dem Programm SPSS 19.0 für den progressionsfreien Zeitraum im Gesamtkollektiv (n=110)

Es wird eine Korrelation zwischen den klinischen Daten Alter, FIGO-Klasse, Tumorgrading, postoperativer Tumorrest, ER- α und dem progressionsfreien Zeitraum (PFS) gemessen am Rezidiv untersucht.

Die statistische Analyse impliziert folgende Faktoren: Regressionskoeffizient (B), Standardfehler (SE), Waldstatistik (Wald) mit dem Freiheitsgrad (df)

Die Signifikanz (Sig), Exp(B) gibt das Relative Risiko an; Konfidenzintervall von Exp(B) mit dem unteren und oberen Konfidenzbereich (CI).

*Die Daten wurden logarithmiert, um eine Normalverteilung zu erhalten.

Variablen in der Gleichung								
Klinische Daten	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
Alter (≤ 55 vs. > 55)	0,148	0,107	1,898	1	0,168	1,159	0,939	1,431
FIGO (IV vs. III vs. II)	0,507	0,283	3,203	1	0,074	1,661	0,953	2,894
Tumorgrading (3 vs. 1,2)	0,358	0,301	1,413	1	0,235	1,430	0,793	2,582
Postoperativer Tumorrest (Ja vs. Nein)	0,483	0,259	3,461	1	0,063	1,620	0,975	2,694
ER-α (log*)	-0,143	0,122	1,379	1	0,240	0,867	0,683	1,100

Eine multivariate Cox-Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um die Bedeutung von ER- α im Tumorgewebe für das progressionsfreie Überleben zu berechnen. Diese wurde mit dem Programm SPSS 19.0 für das Gesamtkollektiv der Patientinnen (n=110) durchgeführt.

Es zeigt sich, dass ein höherer ER- α IRS sich positiv auf den progressionsfreien Überlebenszeitraum auswirkt. Von den klinischen Daten sind höheres Alter, höheres Tumor-Stadium nach FIGO, ein höherer histologischer Grad und ein postoperativer Tumorrest mit einer geringeren progressionsfreien Überlebenszeit assoziiert, wobei Alter, histologischer Grad (wie auch ER- α) eine geringere Rolle spielen ($p > 0,100$) als das Tumorstadium ($p = 0,083$) und der postoperative Tumorrest ($p = 0,063$). Allerdings wird keine Signifikanz ($p \leq 0,050$) erreicht.

4.3.2 Berechnung des Einflusses von klinischen Parametern und ER- α auf das Gesamtüberleben; bezogen auf das Gesamtkollektiv (n=110)

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 51 Monaten wurden 49 Todesfälle im Gesamtkollektiv von 110 Patientinnen beobachtet. Eine multivariate Cox-Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um die Bedeutung von ER- α im Tumorgewebe für das Gesamtüberleben zu berechnen. Diese wurde mit dem Programm SPSS 19.0 für das gesamte Kollektiv (n=110) durchgeführt.

Wie beim progressionsfreien Überleben sind ein höheres Alter, höheres Tumor-Stadium nach FIGO, ein höherer histologischer Grad und ein postoperativer Tumorrest mit einer geringeren Überlebenszeit assoziiert. Der aussagekräftigste Prognosefaktor beim Ovarialkarzinom ist der postoperative Tumorrest ($p < 0,001$). Für die Bedeutung von ER- α im Gewebe spricht, dass ein Trend ($p = 0,063$) für eine höhere Überlebenszeit abzulesen ist. FIGO-Klassifikation, Alter und Tumorigrad zeigen weniger Einfluss, sie sind aber negativ mit der Überlebenszeit assoziiert. Allerdings wird keine Signifikanz ($p \leq 0,050$) erreicht.

Tab. 07: Statistische Analyse mit dem Programm SPSS 19.0 für das Gesamtüberleben im Gesamtkollektiv (n110); es wird eine Korrelation zwischen den klinischen Daten Alter, FIGO-Klasse, Tumorgrading, postoperativer Tumorrest, ER- α und dem Gesamtüberleben (OS) untersucht.

Die statistische Analyse impliziert folgende Faktoren: Regressionskoeffizient (B), Standardfehler (SE), Waldstatistik (Wald) mit dem Freiheitsgrad (df)

Die Signifikanz (Sig), Exp(B) gibt das relative Risiko an; Konfidenzintervall von (Exp(B) mit dem unterem- und oberen Konfidenzbereich (CI).

*Die Daten wurden logarithmiert, um eine Normalverteilung zu erhalten.

Variablen in der Gleichung								
Klinische Daten	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
Alter (≤ 55 vs. > 55)	0,139	0,140	0,984	1	0,321	1,149	0,873	1,512
FIGO (IV vs. III vs. II)	0,491	,350	1,970	1	0,160	1,634	0,823	3,242
Tumorgrading (3 vs. 1,2)	0,395	,393	1,013	1	0,314	1,485	0,688	3,208
Postoperativer Tumorrest (Ja vs. Nein)	1,102	,313	12,375	1	<0,001	3,010	1,629	5,563
ER-α (log*)	-0,281	0,154	3,343	1	0,067	0,755	0,558	1,020

4.3.3 Quantitative univariate Analyse der Bedeutung der ER- α -Expression im Gesamtkollektiv (n=110) für das Gesamtüberleben

Die univariate Analyse zur Ermittlung der Bedeutung von dem IRS für ER- α in den Tumorproben für das Gesamtüberleben zeigt, dass Alter, FIGO Stadium, und die Art des Tumors signifikant das Gesamtüberleben beeinflussen ($p=0,050$). Wenn ER- α nach dem Median in zwei Gruppen (ER- α hoch und ER- α niedrig) geteilt wird, so ist ein höherer ER- α Wert signifikant mit einem längeren Überleben assoziiert. Der wichtigste Parameter für ein längeres Überleben ist aber die vollständige Entfernung des Tumors ($p<0.001$). Ein signifikanter Einfluss der nicht geteilten ER- α Werte lässt sich nicht ablesen ($p=0.140$).

Tab. 08: Quantitative univariate statistische Analyse mit dem Programm SPSS 19.0;

Varianzanalyse mit den klinischen Daten Alter, FIGO-Klasse, histologischer Tumorsubtyp (serös vs. non-serös), postoperativer Tumorrest, Tumorgrading, ER- α -Wert im Tumor (log-Wert) und dessen Median im Kollektiv unter Angabe des 95%- Konfidenzintervalls und der Signifikanz p. HR: Hazard Ratio mit Confidenzintervall

*Daten wurden logarithmiert, um eine Normalverteilung zu erhalten.

**Die Werte wurden am Median geteilt.

	Univariat (Varianzanalyse)	
	ER- α	
Klinische Daten	HR (CI95%)	p
Alter (≤ 55 vs. > 55)	2,04 (1,1-3,7)	0,018
FIGO (IV vs. III vs. II)	2,00 (1,1-3,7)	0,028
Serös vs. non-serös	2,13 (1,1-4,0)	0,019
Postoperativer Tumorrest (Ja vs. Nein)	3,29 (1,9-5,8)	<0,001
Tumorgrading (3 vs. 1,2)	1,95 (0,9-4,2)	0,083
ER-α (log*)	0,81 (0,6-1,1)	0,140
ER-α (log*_median**)	0,57 (0,3-1,0)	0,050

Die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier in Abb. 15 veranschaulicht graphisch das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von hoher und niedriger Expression von ER- α im tumorösen Gewebe. Je höher die ER- α Expression im Tumor ist, desto länger ist das Gesamtüberleben der einzelnen Patientinnen. Daten wurden über den Beobachtungszeitraum von 51 Monaten erhoben.

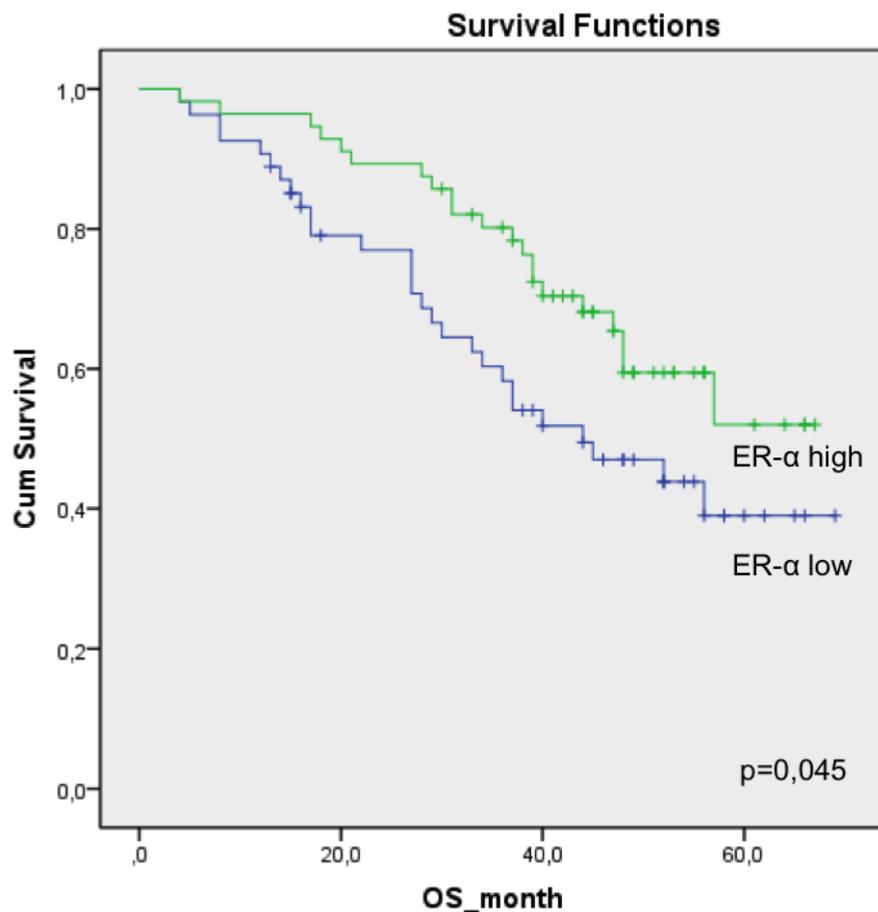


Abb. 15: Kaplan-Meier Kurve für hohe ER- α (grüne Kurve) vs. niedriger ER- α (blaue Kurve) Expression im Gesamtkollektiv bezogen auf das Gesamtüberleben (n=110); Diese Abbildung zeigt den Einfluss der ER- α -Expression auf das Gesamtüberleben.

4.3.4 Einfluss von ER- α auf den progressionsfreien Zeitraum bei Patientinnen mit serösen Tumoren (n=92)

Es wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse unter Einbeziehung der klinischen Parameter (Alter, FIGO-Stadium, Tumorgading, postoperativer Tumorrest) durchgeführt, um den Einfluss von ER- α auf den PFS (Diagnose eines Rezidivs) für Patientinnen mit serösen Karzinomen (n=92) zu ermitteln. Das Cox-Modell (proportionale Hazardregression) für eine multivariate Analyse wird dann eingesetzt, wenn der gleichzeitige Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine zeitabhängige Zielvariable (hier PFS) untersucht werden soll. Die multivariate Analyse (Tab. 09) zeigt, dass ER- α einen unabhängigen positiven Einfluss auf den progressionsfreien Zeitraum hat (HR= 0,75; 95%CI [0,6-1,0]).

Wie in Tab. 09 gezeigt, beeinflusst ER- α das PFS signifikant ($p=0.045$) und könnte daher, neben der Berücksichtigung des FIGO-Stadiums, ein wichtiger Parameter für die Entscheidung für eine bestimmte Therapie, z.B. mit Steroidhormonen sein.

Tab. 09: Multivariate statistische Analyse mit dem Programm SPSS 19.0

Multivariate Analyse zwischen den klinischen Daten Alter, FIGO-Klasse, Grading, postoperativer Tumorrest, ER- α und dem progressionfreien Zeitraum (PFS) gemessen am Rezidiv für seröse Karzinome ($n=92$).

*Daten wurden logarithmiert um eine bessere Normalverteilung zu erhalten.

Multivariat Analysis		
ER- α		
Klinische Daten	HR (CI95%)	p
Alter (≤ 55 vs. >55)	1,24 (0,9-1,6)	0,057
FIGO (IV vs. III vs. II)	2,20 (1,1-4,3)	0,021
Grading (3 vs. 1,2)	1,88 (0,9-3,8)	0,077
Postoperativer Tumorrest (Ja vs. Nein)	1,25 (0,7-2,2)	0,454
ER-α (log*)	0,75 (0,6-1.0)	0,046

4.3.5 Einfluss von Er- α auf die Gesamtüberlebenszeit, berechnet für die Gruppe der Patientinnen mit serösen Tumoren ($n=92$)

Es wurde eine multivariate und univariate Analyse der klinischen Daten (Alter, FIGO-Stadium, histologischer Grad, postoperativer Tumorrest) und ER- α für das Gesamtüberleben (OS) bei Patientinnen mit serösen Karzinomen ($n=92$) durchgeführt.

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse unter Einbeziehung von Alter, FIGO-Stadium, histologischer Grad, und postoperativer Tumorrest zeigt, dass ER- α ein unabhängiger, signifikanter Faktor für eine längere Gesamtüberlebenszeit ist ($p=0.033$). Auch in der univariaten Analyse zeigt sich eine Tendenz, die aussagt, dass eine höhere ER- α -Expression mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit korreliert.

Tab. 10: Multivariate und univariate statistische Analyse mit dem Programm SPSS 19.0

Es wird eine Korrelation zwischen den klinischen Daten Alter, FIGO-Klasse, Tumorgrading, postoperativer Tumorrest, ER- α und das Gesamtüberleben (OS) untersucht.

HR: Hazard Ratio mit dem Konfidenzintervall (CI)

*Daten wurden logarithmiert um eine Normalverteilung zu erhalten.

	Multivariat		Univariat	
	ER- α		ER- α	
Klinische Daten	HR (CI95%)	p	HR (CI95%)	p

Tab. 10: Fortsetzung

Alter (≤ 55 vs. > 55)	1.24 (0.9-1.7)	0.172	1,36 (1,0-1,8)	0,038
FIGO (IV vs. III vs. II)	1,83 (0,8-4,1)	0,138	2,58 (1,3-5,3)	0,009
Tumorgrading (3 vs. 1,2)	1,85 (0,7-4,9)	0,212	2,59 (1,0-6,6)	0,048
Postoperativer Tumorrest (Ja vs. Nein)	2,6 (1,3-5,3)	0,006	3,20 (1,7-6,1)	<0,001
ER-α (log*)	0.67 (0.47-0.97)	0.033	0,72 (0,5-1,0)	0,053

Auch im Patientenkollektiv der serösen Karzinome, zeigt sich eine deutliche Korrelation zwischen hoher ER- α -Expression im tumorösen Gewebe und des höheren Gesamtüberlebens.

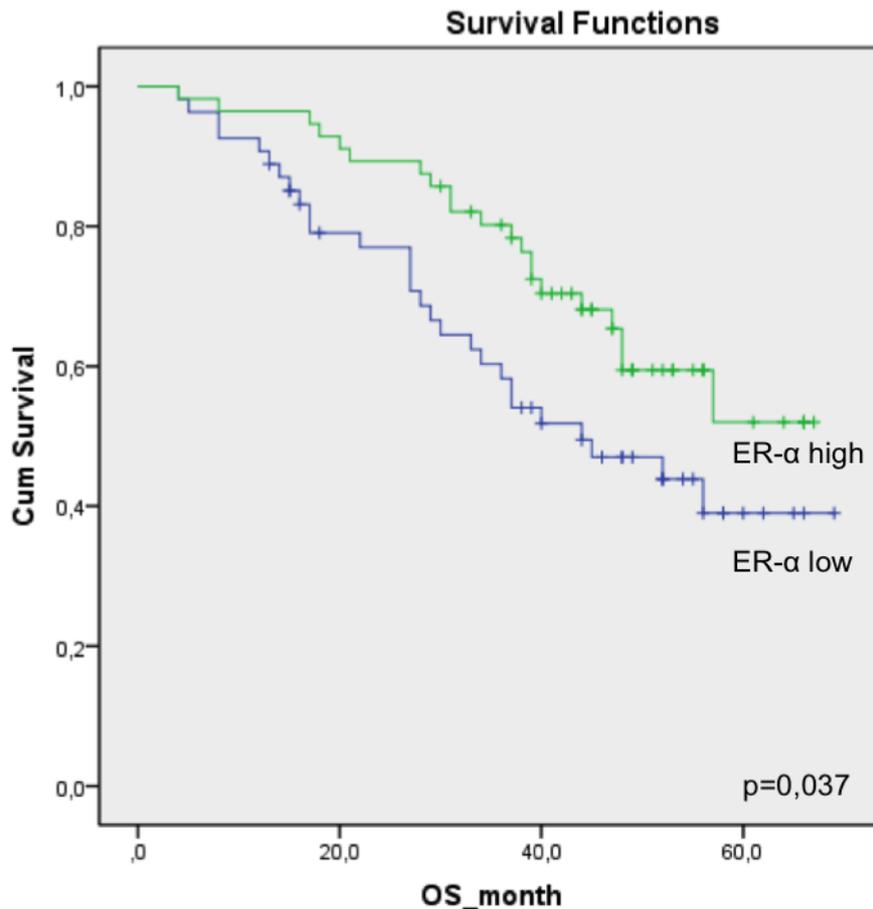


Abb. 16: Kaplan-Meier Kurve für hohe ER- α (grüne Kurve) vs. niedriger ER- α (blaue Kurve) Expression in serösen Karzinomen bezogen auf das Gesamtüberleben (n=92)
 Diese Abbildung zeigt den Einfluss von der ER- α -Expression auf das Gesamtüberleben.

4.4 ER- β Expression in ovariellen Karzinompräparaten

Die immunhistochemische Färbung von ER- β wurde lediglich an 9 Tumorpräparaten durchgeführt, da sich zeigte, dass ER- β bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen nur schwach exprimiert ist (Chan et al., 2008). Bei diesen Präparaten war die Anzahl der positiven Zellen sehr gering. Ein immunhistochemisches Staining wurde zwar auf denselben OVCAD-Microarrays, welche auch für das Staining von ER- α verwendet wurden, vorgenommen, jedoch konnte auf Grund der geringen Expression kein zufriedenstellendes positives Ergebnis erzielt werden. Die Präparate wurden unterteilt in die seröse (6 Patientinnen), gemischt epitheliale (1 Patientin), Klarzellkarzinome (1 Patientin) und endometroide Tumore (1 Patientin). Auffällig ist eine gute Färbung von ER- β in den Zellkernen von einzelnen Zellen mit einem weitgehend negativen Stroma. Ein Gewebsschnitt konnte wegen dem gehäuften Auftreten von Psammomkörpern, welche durch die Ablagerung von Kalzium aus nekrotischen Tumorzellen in Verbindung stehen, nicht analysiert werden. Psammomkörper treten beim Subtyp „low grade serous carcinoma“ auf. Auf eine statistische Analyse wurde wegen der geringen Anzahl an positiv gefärbten Zellen und einem zu geringen Patientenkollektiv verzichtet.

Tab. 11: Patientencode, Slide Code, klinische Parameter

Code Patient/ Slide	Tumortyp	Staging	Responder Chemotherapie	Recurrence	Lymphknoten- / Fern- metastasen
B014/ E12990/06 II	serös	IIIc	Ja	Ja	N1/M0
B015/ E11891/06	serös	IIIc	Ja	Ja	N1/MX
B018/ 16325/ 06 II D	Gemischt epithelial	IIIc	Nein	Ja	N1/MX
B024/ 17115/06	serös	IIIc	Ja	Nein	N0/M0
B028/ E20370/06 RG	endometroid	IIIc	Ja	Ja	N1/M0

Tab. 11: Fortsetzung

V008/ 2881/06	serös	IIc	Ja	Nein	NX/M0
V017/ 6149/06 III	CCC	IIIb	Ja	Ja	N0
V022/ 3020/07 OVLI	serös	IIIc	Ja	Ja	–
V049/ 2493/08	serös	IV	Ja	Nein	–

4.5 Histologische Beschreibung des immunhistochemisch gefärbten Gewebe mit ER- β

Die in Tab. 11 aufgezählten Präparate wurden immunhistochemisch auf die Lokalisation von ER- β unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers untersucht. Es wurden zahlreiche Testfärbungen mit dem ER- β -Antikörper von der Firma Abcam vorgenommen und schließlich ein Konzentrationsverhältnis von 1:50 ER- β verwendet (Antikörper wurde mit BSA verdünnt). Auch bei einer höheren Konzentration verbesserte sich weder die Anzahl positiv gefärbter Zellen, noch die Intensität der Färbung. Bei allen Schnitten konnte eine schwach positive Färbung von ER- β beobachtet werden, jedoch war aufgrund der geringen Intensität der Färbung und niedrigen Dichte der positiven Zellen keine Auswertung mit der HistQuest[®] Software möglich. Auffallend war ein erhöhtes Vorkommen von ER- β in Tumorzellen, die in der Nähe vom Stroma lagen. Ein Schnitt (E7998/06) konnte aufgrund des Vorhandenseins von Psammoma bodies (Kalkablagerungen) und der dadurch starken und unspezifischen Braunfärbung nicht verwendet werden.

In Schnittnummer **E 12990/06** ist eine schwache Kernfärbung in den Tumorzellen zu sehen. Die Tumorzellen sind bereits weitläufig ins Stroma infiltriert.

Das Gewebe in **E 11891/06** weist eine im Verhältnis zu den anderen Schnitten intensivere Kernfärbung in den Tumorzellen auf. Stroma- und Tumorbereiche sind gut voneinander abgegrenzt. Die Tumorzellen kommen gruppiert vor.

In **16325/06 II D** zeigen die Tumorzellen eine stärkere ER- β Kernfärbung. Auffallend hierbei ist, dass die positiven Zellen sich eher an der Grenze zu den Stromabereichen aufhalten. Tumorzellen liegen auch hier gruppiert vor.

17115/06 ist ein Gewebsschnitt mit mäßiger ER- β Kernfärbung in den Tumorzellen. Die gruppierten Tumorzellen sind durch mehrere Stromastränge getrennt.

Der Schnitt **E20370/06 RG** zeigt sehr wenige Zellkerne, welche mit den Antikörper reagiert haben (A). Das Gewebe lässt sich gut in Stroma- und Tumorareale unterteilen.

2881/06 zeigt lediglich eine sehr schwache Färbung der Tumorzellkerne mit dem ER- β -Antikörper.

In **6149/06 III** lässt sich gut der Karzinomsubtyp CCC veranschaulichen. Die inselförmigen Bereiche sind klar voneinander abgegrenzt. Die Kernfärbung ist schwach und es sind nur vereinzelt positive Kerne vorzufinden.

Das Gewebe in **3020/07 OVLI** zeigt, dass nur wenige Tumorzellkerne positiv gefärbt vorliegen.

Im Schnitt **2493/08** sind sehr viele Immunzellen zu sehen, welche jedoch ER- β negativ sind (B). Eine positive Kernfärbung liegt vereinzelt nur in den Tumorzellen vor. Es ist auch viel Gefäßendothel zu sehen (C).

4.6 Nachweis von ER- β mittels IHC

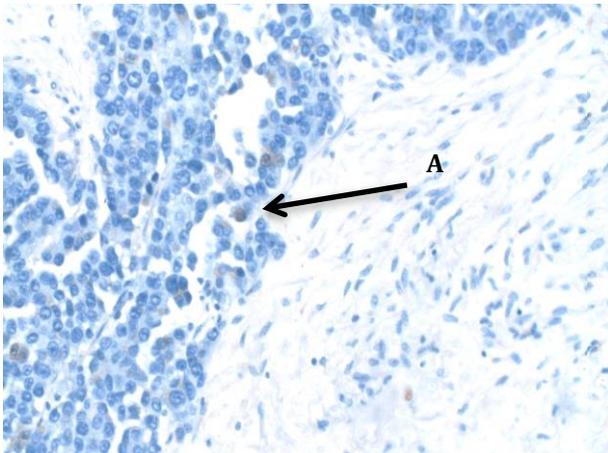


Abb. 17: ER- β Patientin V022
Seröses Karzinom mit einzelnen positiven Zellkernen (A).

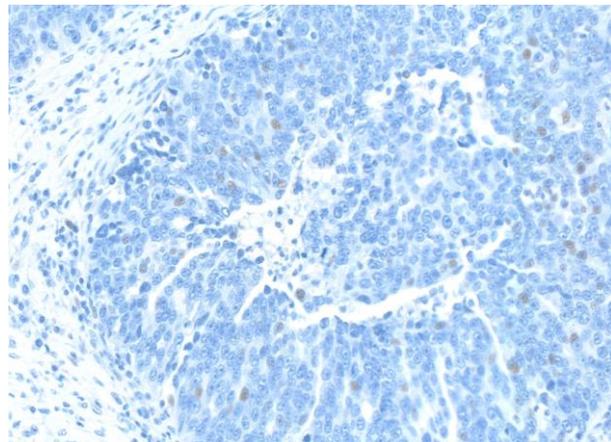


Abb. 18: ER- β Patientin B024
Seröses Karzinom. Tumor- und Stromabereiche sind gut voneinander abgegrenzt.

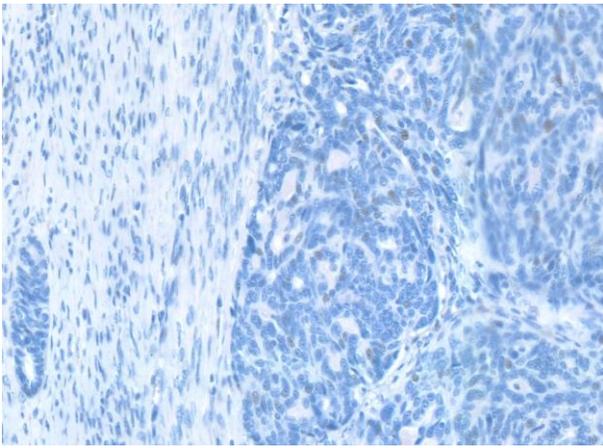


Abb. 19: ER- β Patientin B015
Seröses Karzinom. Tumorzellen kommen gruppiert vor.

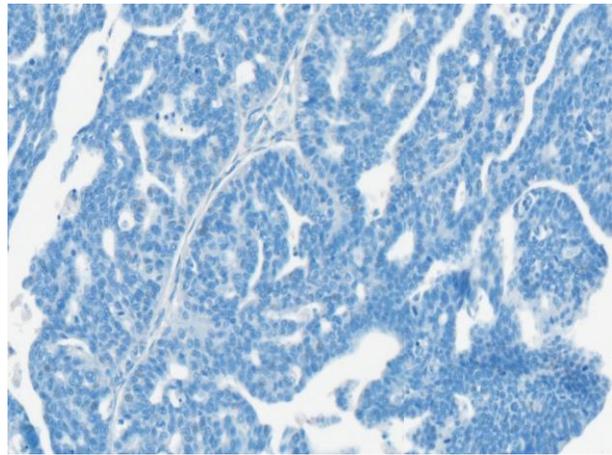


Abb. 20: ER- β Patientin B014
Bei diesem serösen Karzinom sind die Tumorzellen bereits in das Stroma infiltriert.

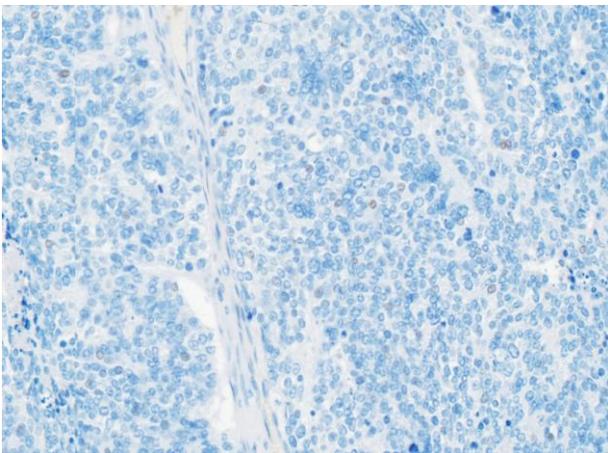


Abb. 21: ER- β Patientin V008 oD
Seröses Karzinom mit schwacher Kernfärbung

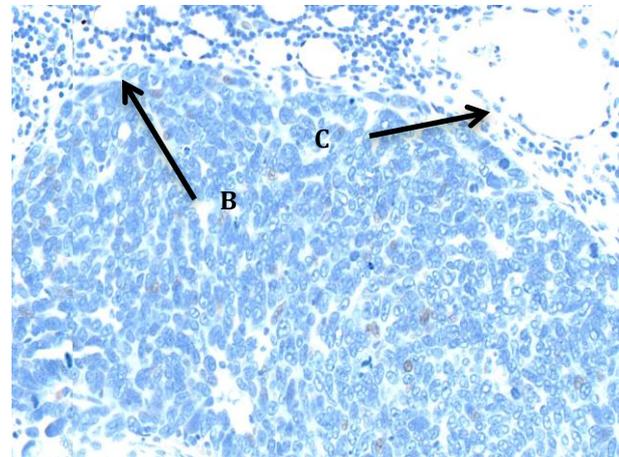


Abb. 22: ER- β Patientin V049
Seröses Karzinom im Endstadium, Immunzellen liegen vor.

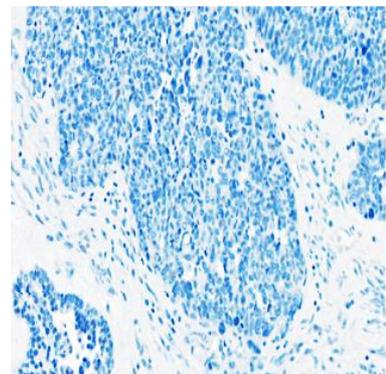
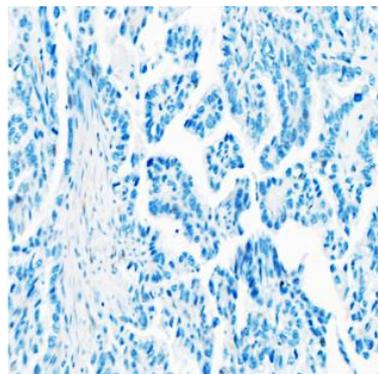
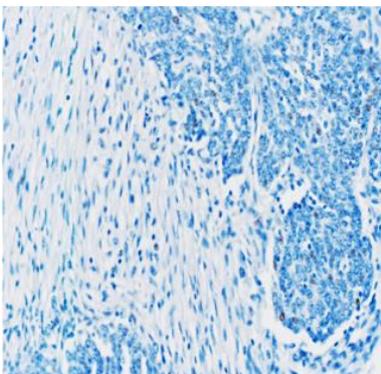


Abb. 23: ER- β Kernfärbung im Ovarialkarzinom von Patientin B018, Patientin V017 OD und Patientin B028 (von links nach rechts)

Diese drei Bilder zeigen die schwach vorhandene Kernfärbung von ER- β in den Tumorzellen

4.7 Vergleich von positiv gefärbten Zellkerne der Patientinnen B024 und B018 mit ER- α und ER- β

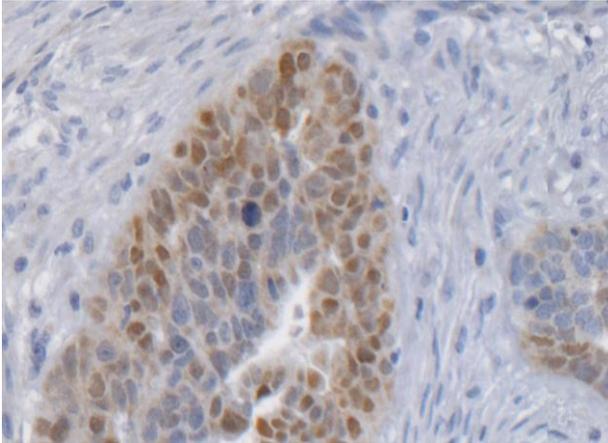


Abb. 24: ER- α Patientin B024
Starke Kernfärbung, mäßige
Zytoplasmafärbung, negative Stromafärbung

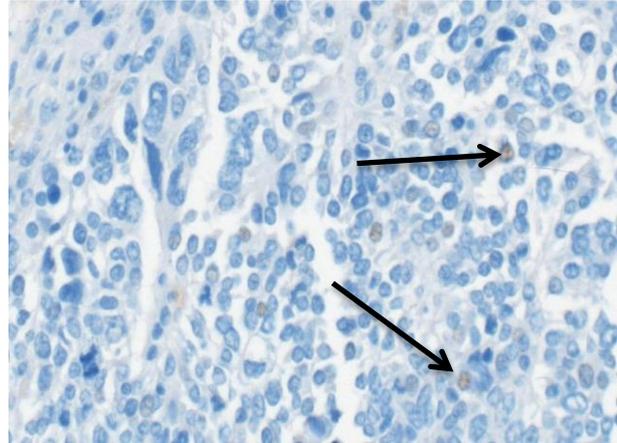


Abb. 25: ER- β Patientin B024
Vereinzelt gefärbte Kerne (Pfeile schwarz),
negative Zytoplasmafärbung, negative
Stromafärbung

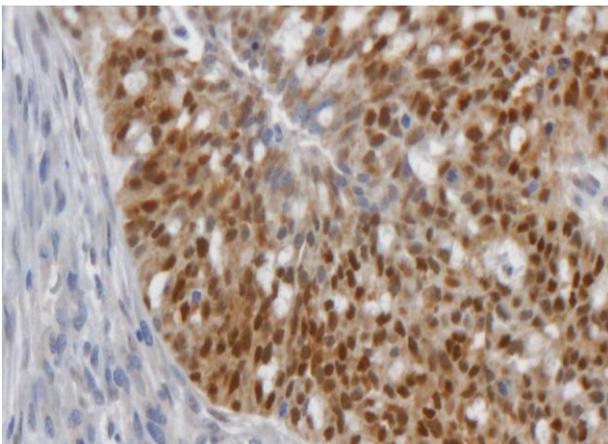


Abb. 26: ER- α Patientin B018
Sehr intensive Kernfärbung, mäßige
Zytoplasmafärbung, negative Stromafärbung

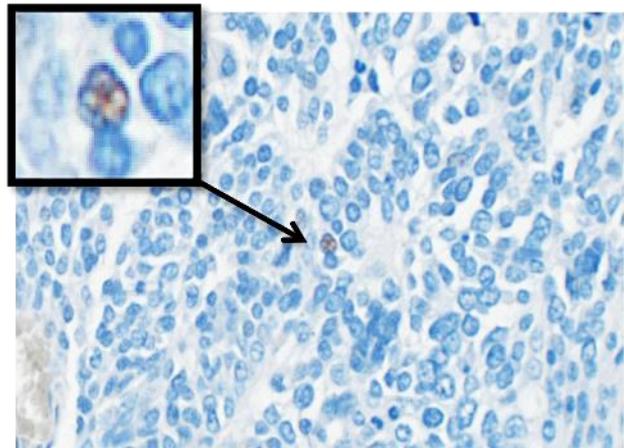


Abb. 27: ER- β Patientin B018
Sehr wenige gefärbte Kerne; Stroma und
Zytoplasma nicht gefärbt

5 DISKUSSION

Ziel der Studie war es, die Bedeutung von ER- α - und ER- β bei Patientinnen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen zu untersuchen.

In einem Kollektiv bestehend aus 114 Patientinnen mit Ovarialkarzinomen FIGO Stadium 2-4 wurde an Microarrays, die aus den Tumorpräparaten angefertigt wurden, immunhistochemisch die Lokalisation und die Menge an immunreaktiven ER- α bestimmt. Die dafür erforderliche quantitative Analyse von ER- α wurde mit dem Programm HistoQuest[®] an virtuellen mikroskopischen Bildern von Tumorpräparaten durchgeführt. Es wurde für eine Anzahl an ausgewählten Regionen innerhalb des Tumors der Prozentsatz an positiven Zellen sowie die Farbintensität des immunreaktiven Proteins bestimmt und der IRS für ER- α pro Präparat bzw. pro Patientin berechnet.

Die Ermittlung eines IRS für ER- β ließ sich aufgrund der schwachen Rezeptorfärbung und der geringen Anzahl von ER- β -positiven Zellen in fortgeschrittenen Tumoren nicht durchführen. Eine Abnahme der ER- β -Expression mit der Tumorprogression wurde auch in anderen Studien gezeigt (Chan et al., 2008, Rutherford, 2000). Zum Beispiel ist in Metastasen ER- β kaum nachzuweisen (Rutherford, 2000). Daher wurde lediglich an Tumorproben von 9 Patientinnen immunhistochemisch die Expression und Lokalisation von ER- β auf Paraffinschnitten untersucht und eine deskriptive Aussage über die Lokalisation des Rezeptors in den Tumorarealen getroffen.

Im malignen Gewebe verändert sich auch der Expressionslevel von ER- α (Chan et al., 2008, Rutherford, 2000). Im Gegensatz zu ER- β der im gesunden Gewebe hoch exprimiert ist, steigt die Expression von ER- α mit der Tumorprogression an. ER- α gilt als Tumorpromoter in hormonsensitiven Geweben, wie z.B. im Brustgewebe und im Gewebe des Ovars. ER- β wirkt hier proapoptotisch (Bardin et al., 2004; Choi et al., 2001). Die hier präsentierten Daten und Ergebnisse stimmen überein mit den Daten aus drei kürzlich veröffentlichten Studien, in denen mittels PCR-Analyse Unterschiede in der Regulierung auf mRNA- und Proteinebenen für die beiden Rezeptorisotypen gezeigt wurde (Chan et al., 2008; Geisler et al., 2008; Rutherford, 2000). Zusätzlich haben mehrere Studien gezeigt, dass die zwei Östrogenrezeptoren antagonistisch wirken. Sie konkurrieren nicht nur um die Steroidhormonliganden sondern auch um generelle Transkriptionsfaktoren (Koehler et al., 2005; Zhao et al., 2008)

Die Auswertung und statistische Analyse von ER- α und den klinischen Parametern zur Bestimmung der Rolle der Faktoren für die Dauer des progressionsfreien Zeitraumes (gemessen am Auftreten des Rezidivs) und der Gesamtüberlebenszeit zeigte, dass Patientinnen mit einem höheren ER- α -IRS auch ein längeres Gesamtüberleben haben. Dies zeigt die Bedeutung dieses Rezeptors für die Malignität der Ovarialkarzinome. Die Daten stimmen auch mit denen von kürzlich durchgeführten Studien überein, die zu einem ähnlichen Ergebnis führten (Aust et al., 2012; Burges et al., 2010; Halon et al., 2011; Hogdall et al., 2007). Zwei frühere Studien an Ovarialkarzinompatientinnen, bei denen die Expression von ER- α aber nicht von ER- β bestimmt wurde, zeigten für Patientinnen mit einem „high-grade“ Tumor einen Zusammenhang zwischen hohem Vorkommen von ER- α und einer besseren Prognose (Hogdall et al., 2007; Wong et al., 2007). Es liegen jedoch auch Studien vor, in denen dieser Zusammenhang nicht beobachtet werden konnte (Lee et al., 2005; Tangjitgamol et al., 2009). Bei jüngeren Frauen, konnte durch höhere ER- α -Expression keine längere Gesamtüberlebenszeit gezeigt werden. Nur in Kombination mit einer zusätzlich erhöhten Progesteronrezeptor-Expression ergab sich auch eine entsprechende prognostische Voraussage (Yang et al., 2009).

Der progressionsfreie Zeitraum innerhalb der ersten 6 Monate ist ein wichtiger prognostischer Faktor, nachdem sich die weitere Behandlungsstrategie richtet. Liegt diese unter 6 Monate, sinkt das Gesamtüberleben der Patientinnen stark und ein weiterer chemotherapeutischer Zyklus oder eine palliativ orientierte Behandlung muss erwogen werden. Liegt die progressionsfreie Zeit zwischen 6 Monaten und einem Jahr, erweist sich ein weiterer chemotherapeutischer Zyklus als hilfreich. Bei einer progressionsfreien Zeit über einem Jahr, kann der Patientin auch eine zweite chirurgische Entfernung des Karzinoms vor Anwendung eines weiteren chemotherapeutischen Zyklus empfohlen werden. Eine statistische Untersuchung wurde sowohl für das Gesamtkollektiv (n=110) als auch für das Kollektiv der serösen Karzinome (n=92) durchgeführt. Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Einfluss von ER- α auf das Gesamtüberleben im Gesamtkollektiv (p=0,045), wie auch in der Gruppe der Patientinnen mit serösen Tumoren (p=0,037). Zudem erweist sich ER- α in der multivariaten Analyse als unabhängig signifikanter Einflussfaktor auf den progressionsfreien Zeitraum (p=0,046).

Die nukleären Östrogenrezeptor-Isoformen ER- α und ER- β sind unterschiedlich in tumorösem Gewebe des Ovars exprimiert (Chan et al., 2008). Obwohl beide Östrogenrezeptoren Ähnlichkeiten in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren haben, gibt es aber signifikant Unterschiede, was ihre klinische Bedeutung betrifft (Borges et al., 2010). Im Gegensatz zu ER- α , sprechen Daten von verschiedenen Tumoren für ein tumorsuppressives Potential von ER- β (Lazennec, 2006). Auch in einer Ovarialkarzinomzelllinie konnte der Antitumoreffekt von ER- β nachgewiesen werden (Treeck et al., 2007).

Gut untersucht ist die Bedeutung der beiden ER-Isoformen bei Brustkrebs. Auch bei Brustkrebs haben Tumore, die ER- α hoch exprimiert haben, eine bessere Prognose als Tumore, die ER- α negativ sind. Zusätzlich wird durch Anwendung von Tamoxifen die hormonelle Stimulierung des Brustkrebswachstums unterdrückt. Eine ähnliche Strategie könnte auch für die Behandlung von einer Subgruppe von Patientinnen mit Ovarialkarzinom von Bedeutung sein. Darüber hinaus könnte ER- α als Biomarker für die Identifizierung von Hochrisikopatientinnen sein. Dies würde es ermöglichen, eine entsprechend aggressive adjuvante Therapie für diese Patientinnen auszuwählen (Borges et al., 2010).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse über die Expression von ER- α und ER- β neue Erkenntnisse über die Bedeutung dieser Rezeptoren für die Prognose von fortgeschrittenen Ovarialkarzinompatientinnen bringen. Darüber hinaus lassen sich daraus auch therapeutische Überlegungen für die Behandlung von Ovarialkarzinompatientinnen mit SERMS ableiten.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 01:	Graphik zu Inzidenz und Mortalität des Ovarialkarzinoms	07
Abb. 02:	Verteilung der unterschiedlichen Subtypen von Ovarialkarzinoma	14
Abb. 03:	Entwicklungstheorien unterschiedlicher Ovarialkarzinomtypen.	15
Abb. 04:	Die fünf häufigsten Subtypen von Ovarialkarzinoma	18
Abb. 05:	Östrogenrezeptor α und β .	25
Abb. 06:	Tissue FAXS- System	35
Abb. 07:	ER- α Patient B038	38
Abb. 08:	ER- α Patient B024	38
Abb. 09:	ER- α Patient L047	39
Abb. 10:	ER- α Patient L111	39
Abb. 11:	ER- α Patient B048	39
Abb. 12:	ER- α Patient L141	39
Abb. 13:	ER- α Patient V011	40
Abb. 14:	ER- α Patient V043	40
Abb. 15:	Kaplan-Meier Kurve für hohe ER- α (grüne Kurve) vs. niedriger ER- α (blaue Kurve) Expression im Gesamtkollektiv bezogen auf das Gesamtüberleben (n=114)	46
Abb. 16:	Kaplan-Meier Kurve für hohe ER- α (grüne Kurve) vs. niedriger ER- α (blaue Kurve) Expression in serösen Karzinomen bezogen auf das Gesamtüberleben (n=92)	48
Abb. 17:	ER- β Patient V022	51
Abb. 18:	ER- β Patient B024	51
Abb. 19:	ER- β Patient B015	52
Abb. 20:	ER- β Patient B014	52
Abb. 21:	ER- β Patient V008	52
Abb. 22:	ER- β Patient V049	52
Abb. 23:	ER- β Patient B018, ER- β Patient V017 OD, ER- β Patient B028	52
Abb. 24:	ER- α Patient B024	53
Abb. 25:	ER- β Patient B024	53
Abb. 26:	ER- α Patient B018	53
Abb. 27:	ER- β Patient B018	53

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 01:	Karzinomklassifikation nach FIGO und TNM	11
Tab. 02:	Differenzierungsgradeinteilung der Zellen im Ovarialkarzinom	13
Tab. 03:	Patientencode, primärer Antikörper ER- β ; Detektiersystem	30
Tab. 04:	Patientencode, Slide Code, klinische Parameter	37
Tab. 05:	Patientenkollektiv, unterteilt nach ER- α gering und ER- α stark exprimierenden Tumoren	41
Tab. 06:	Statistische Analyse mit dem Programm SPSS 19.0 für den progressionsfreien Zeitraum im Gesamtkollektiv (n=110)	42
Tab. 07:	Statistische Analyse mit dem Programm SPSS 19.0 für das Gesamtüberleben im Gesamtkollektiv (n=110)	44
Tab. 08:	Quantitative univariate statistische Analyse mit dem Programm SPSS 19.0	45
Tab. 09:	Multivariate statistische Analyse mit dem Programm SPSS 19.0	47
Tab. 10:	Multivariate und univariate statistische Analyse mit dem Programm SPSS 19.0	47
Tab. 11:	Patientencode, Slide Code, klinische Parameter	49

8 LITERATUR

AHMED, A. A., ETEMADMOGHADAM, D., TEMPLE, J., LYNCH, A. G., RIAD, M., SHARMA, R., STEWART, C., FEREDAY, S., CALDAS, C., DEFAZIO, A., BOWTELL, D. & BRENTON, J. D. 2010. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J Pathol*, 221, 49-56.

AMERICAN CANCER SOCIETY, *Cancer facts & figures 2012*. Atlanta: American Cancer Society 2012

AMERICAN CANCER SOCIETY (2012, March 21). How is ovarian cancer staged?. [cancer.org](http://www.cancer.org/cancer/ovariancancer/detailguide/ovarian-cancer-staging). Retrieved May 25, 2013, from <http://www.cancer.org/cancer/ovariancancer/detailguide/ovarian-cancer-staging>

AUDET-WALSH, E., LEPINE, J., GREGOIRE, J., PLANTE, M., CARON, P., TETU, B., AYOTTE, P., BRISSON, J., VILLENEUVE, L., BELANGER, A. & GUILLEMETTE, C. 2011. Profiling of endogenous estrogens, their precursors, and metabolites in endometrial cancer patients: association with risk and relationship to clinical characteristics. *J Clin Endocrinol Metab*, 96, E330-9.

AUST, S., BACHMAYR-HEYDA, A., PATEISKY, P., TONG, D., DARB-ESFAHANI, S., DENKERT, C., CHEKEROV, R., SEHOULI, J., MAHNER, S., VAN GORP, T., VERGOTE, I., SPEISER, P., HORVAT, R., ZEILLINGER, R. & PILS, D. 2012. Role of TRAP1 and estrogen receptor alpha in patients with ovarian cancer -a study of the OVCAD consortium. *Mol Cancer*, 11, 69.

BARDIN, A., BOULLE, N., LAZENNEC, G., VIGNON, F. & PUJOL, P. 2004. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*, 11, 537-51.

BEATO, M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56, 335-44.

BEATO, M., HERRLICH, P. & SCHUTZ, G. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, 83, 851-7.

BELL, J., BRADY, M. F., YOUNG, R. C., LAGE, J., WALKER, J. L., LOOK, K. Y., ROSE, G. S. & SPIRTOS, N. M. 2006. Randomized phase III trial of three versus six cycles of adjuvant carboplatin and paclitaxel in early stage epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*, 102, 432-9.

BEREK, J. S., CRUM, C. & FRIEDLANDER, M. 2012. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet*, 119 Suppl 2, S118-29.

BERRY, M., METZGER, D. & CHAMBON, P. 1990. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J*, 9, 2811-8.

BIZER, L. S., LIEBLING, R. W., DELANY, H. M. & GLIEDMAN, M. L. 1981. Small bowel obstruction: the role of nonoperative treatment in simple intestinal obstruction and predictive criteria for strangulation obstruction. *Surgery*, 89, 407-13.

BJORNSTROM, L. & SJOBERG, M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*, 19, 833-42.

BÖCKER W, DENK H, HEITZ PU, MOCH H. Pathologie. Weibliche Geschlechtsorgane. Kapitel 39, 4. Auflage. 2008. Elsevier in Urban&Fischer Verlag. p. 927-933.

BRISTOW, R. E., TOMACRUZ, R. S., ARMSTRONG, D. K., TRIMBLE, E. L. & MONTZ, F. J. 2002. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol*, 20, 1248-59.

BROWN, M. & SHARP, P. A. 1990. Human estrogen receptor forms multiple protein-DNA complexes. *J Biol Chem*, 265, 11238-43.

BRZOZOWSKI, A. M., PIKE, A. C., DAUTER, Z., HUBBARD, R. E., BONN, T., ENGSTROM, O., OHMAN, L., GREENE, G. L., GUSTAFSSON, J. A. & CARLQUIST, M. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389, 753-8.

BÜHLING, K.J., FRIEDMANN, W., Intensivkurs Gynäkologie und Geburtshilfe. 2. Auflage. Elsevier Urban und Fischer Verlag. 2009. p. 241- 246

BURGER, R. A., BRADY, M. F., BOOKMAN, M. A., FLEMING, G. F., MONK, B. J., HUANG, H., MANNEL, R. S., HOMESLEY, H. D., FOWLER, J., GREER, B. E., BOENTE, M., BIRRER, M. J. & LIANG, S. X. 2011. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med*, 365, 2473-83.

BURGES, A., BRUNING, A., DANNENMANN, C., BLANKENSTEIN, T., JESCHKE, U., SHABANI, N., FRIESE, K. & MYLONAS, I. 2010. Prognostic significance of estrogen receptor alpha and beta expression in human serous carcinomas of the ovary. *Arch Gynecol Obstet*, 281, 511-7.

BURKITT, H. G. AND WHEATER P. R.(1991). *Wheater's Basic Histopathology: A Colour Atlas and Text*, 2. Auflage 1991, Churchill Livingstone, p.184

BUYS, S. S., PARTRIDGE, E., BLACK, A., JOHNSON, C. C., LAMERATO, L., ISAACS, C., REDING, D. J., GREENLEE, R. T., YOKOCHI, L. A., KESSEL, B., CRAWFORD, E. D., CHURCH, T. R., ANDRIOLE, G. L., WEISSFELD, J. L., FOUAD, M. N., CHIA, D., O'BRIEN, B., RAGARD, L. R., CLAPP, J. D., RATHMELL, J. M., RILEY, T. L., HARTGE, P., PINSKY, P. F., ZHU, C. S., IZMIRLIAN, G., KRAMER, B. S., MILLER, A. B., XU, J. L., PROROK, P. C., GOHAGAN, J. K. & BERG, C. D. 2011. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 305, 2295-303.

BYERS, M., KUIPER, G. G., GUSTAFSSON, J. A. & PARK-SARGE, O. K. 1997. Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol*, 11, 172-82.

CATASUS, L., BUSSAGLIA, E., RODRIGUEZ, I., GALLARDO, A., PONS, C., IRVING, J. A. & PRAT, J. 2004. Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Hum Pathol*, 35, 1360-8.

CHAN, K. K., WEI, N., LIU, S. S., XIAO-YUN, L., CHEUNG, A. N. & NGAN, H. Y. 2008. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol*, 111, 144-51.

CHANDRA, V., HUANG, P., HAMURO, Y., RAGHURAM, S., WANG, Y., BURRIS, T. P. & RASTINEJAD, F. 2008. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, 456, 350-6.

CHOI, K. C., KANG, S. K., TAI, C. J., AUERSPERG, N. & LEUNG, P. C. 2001. Estradiol up-regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. *Endocrinology*, 142, 2351-60.

CLARKE, B. L. & KHOSLA, S. 2009. New selective estrogen and androgen receptor modulators. *Curr Opin Rheumatol*, 21, 374-9.

COCH, M., GAEDKE, H., JENKINS, H. Family history of ovarian cancer patients: a case controlled study. *Int J Epidemiol*. 1989;18;782-785

COWLEY, S. M., HOARE, S., MOSSELMAN, S. & PARKER, M. G. 1997. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem*, 272, 19858-62.

DANIELIAN, P. S., WHITE, R., LEES, J. A. & PARKER, M. G. 1992. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J*, 11, 1025-33.

DARIMONT, B. D., WAGNER, R. L., APRILETTI, J. W., STALLCUP, M. R., KUSHNER, P. J., BAXTER, J. D., FLETTERICK, R. J. & YAMAMOTO, K. R. 1998. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev*, 12, 3343-56.

DIEDRICH, K., HOLZGREVE, W., JONAT, W., SCHULTZE- MOSGAU, A., SCHNEIDER, KTM., WEISS, JM. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer. Heidelberg. 2000. p. 245- 255

DOMCHEK, S.M., FRIEBEL, T. M., SINGER, C. F. & ET AL. 2010. Association of risk-reducing surgery in brca1 or brca2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA*, 304, 967-975.

ERICKSON, B. K., CONNER, M. G. & LANDEN, C. N., JR. 2013. The role of the fallopian tube in the origin of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 209, 409-14.

FEUER, D. J. & BROADLEY, K. E. 2000. Corticosteroids for the resolution of malignant bowel obstruction in advanced gynaecological and gastrointestinal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001219.

FRUMOVITZ, M., SCHMELER, K. M., MALPICA, A., SOOD, A. K. & GERSHENSON, D. M. 2010. Unmasking the complexities of mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 117, 491-6.

GAJJAR, K., OGDEN, G., MUJAHID, M. I. & RAZVI, K. 2012. Symptoms and risk factors of ovarian cancer: a survey in primary care. *ISRN Obstet Gynecol*, 2012, 754197.

GERSHENSON, D. M. 2005. Fertility-sparing surgery for malignancies in women. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 43-7.

GEISLER, J. P., BULLER, E. & MANAHAN, K. J. 2008. Estrogen receptor alpha and beta expression in a case matched series of serous and endometrioid adenocarcinomas of the ovary. *Eur J Gynaecol Oncol*, 29, 126-8.

GILKS, C. B. & PRAT, J. 2009. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum Pathol*, 40, 1213-23.

GLASS, C. K. & ROSENFELD, M. G. 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, 14, 121-41.

GOFF, B. A., MANDEL, L. S., DRESCHER, C. W., URBAN, N., GOUGH, S., SCHURMAN, K. M., PATRAS, J., MAHONY, B. S. & ANDERSEN, M. R. 2007.

Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection. *Cancer*, 109, 221-7.

GÓMEZ-RAPOSO, C., ZAMBRANA TÉVAR, F., SERENO MOYANO, M., LÓPEZ GÓMEZ, M. & CASADO, E. 2010. Male breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 36, 451-457.

GRONEMEYER, H. 1991. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet*, 25, 89-123.

HALL, J. M. & MCDONNELL, D. P. 2005. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv*, 5, 343-57.

HALON, A., MATERNA, V., DRAG-ZALESINSKA, M., NOWAK-MARKWITZ, E., GANSUKH, T., DONIZY, P., SPACZYNSKI, M., ZABEL, M., DIETEL, M., LAGE, H. & SUROWIAK, P. 2011. Estrogen receptor alpha expression in ovarian cancer predicts longer overall survival. *Pathol Oncol Res*, 17, 511-8.

HARB, A., KING, E., LLOYD, H., HARB, Z. & PAYNE, J. G. 2010. Primary omental mesothelioma: a rare but important differential diagnosis in previous asbestos exposure. *J Gastrointest Surg*, 14, 423-5.

HIDDEMANN, HUBER, BARTRAM; *Die Onkologie Teil I*. 2004, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, p35,36

HILLS, A. P., HENNIG, E. M., BYRNE, N. M. & STEELE, J. R. 2002. The biomechanics of adiposity--structural and functional limitations of obesity and implications for movement. *Obes Rev*, 3, 35-43.

HIPPISLEY-COX, J. & COUPLAND, C. 2012. Identifying women with suspected ovarian cancer in primary care: derivation and validation of algorithm. *BMJ*, 344, d8009.

HOGDALL, E. V., CHRISTENSEN, L., HOGDALL, C. K., BLAAKAER, J., GAYTHER, S., JACOBS, I. J., CHRISTENSEN, I. J. & KJAER, S. K. 2007. Prognostic value of estrogen receptor and progesterone receptor tumor expression in Danish ovarian

cancer patients: from the 'MALOVA' ovarian cancer study. *Oncol Rep*, 18, 1051-9.

HOLSCHNEIDER, C. H. & BEREK, J. S. 2000. Ovarian cancer: Epidemiology, biology, and prognostic factors. *Seminars in Surgical Oncology*, 19, 3-10.

HUNN, J. & RODRIGUEZ, G. C. 2012. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol*, 55, 3-23.

JONES, S., WANG, T. L., KURMAN, R. J., NAKAYAMA, K., VELCULESCU, V. E., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K. W., PAPADOPOULOS, N. & SHIH IE, M. 2012. Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. *J Pathol*, 226, 413-20.

JORDAN, V. C., MITTAL, S., GOSDEN, B., KOCH, R. & LIEBERMAN, M. E. 1985. Structure-activity relationships of estrogens. *Environ Health Perspect*, 61, 97-110.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO J., Histologie ;Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen ,Unter Berücksichtigung der Histophysiologie ,4. Auflage 1996 Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.579 - 593

KINKEL, K., LU, Y., MEHDIZADE, A., PELTE, M. F. & HRICAK, H. 2005. Indeterminate ovarian mass at US: incremental value of second imaging test for characterization--meta-analysis and Bayesian analysis. *Radiology*, 236, 85-94.

KLEIN-HITPASS, L., TSAI, S. Y., GREENE, G. L., CLARK, J. H., TSAI, M. J. & O'MALLEY, B. W. 1989. Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response element. *Mol Cell Biol*, 9, 43-9.

KLINKE, R., PAPE, HC., SILBERNAGL, S., Physiologie. Sexuallfunktion, Schwangerschaft und Geburt. 5. Auflage. Thieme Verlag. Stuttgart New York. 2005. S561-570

KÖBEL, M., HUNTSMAN, D. & GILKS, C. B. 2008a. Critical molecular abnormalities in high-grade serous carcinoma of the ovary. *Expert Rev Mol Med*, 10, e22.

KÖBEL, M., KALLOGER, S. E., BOYD, N., MCKINNEY, S., MEHL, E., PALMER, C., LEUNG, S., BOWEN, N. J., IONESCU, D. N., RAJPUT, A., PRENTICE, L. M., MILLER, D., SANTOS, J., SWENERTON, K., GILKS, C. B. & HUNTSMAN, D. 2008b. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med*, 5, e232.

KÖBEL, M., KALLOGER, S. E., CARRICK, J., HUNTSMAN, D., ASAD, H., OLIVA, E., EWANOWICH, C. A., SOSLOW, R. A. & GILKS, C. B. 2009. A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *Am J Surg Pathol*, 33, 14-21.

KOEHLER, K. F., HELGUERO, L. A., HALDOSEN, L. A., WARNER, M. & GUSTAFSSON, J. A. 2005. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev*, 26, 465-78.

KOIDE, A., ZHAO, C., NAGANUMA, M., ABRAMS, J., DEIGHTON-COLLINS, S., SKAFAR, D. F. & KOIDE, S. 2007. Identification of regions within the F domain of the human estrogen receptor alpha that are important for modulating transactivation and protein-protein interactions. *Mol Endocrinol*, 21, 829-42.

KONG, E. H., HELDRING, N., GUSTAFSSON, J. A., TREUTER, E., HUBBARD, R. E. & PIKE, A. C. 2005. Delineation of a unique protein-protein interaction site on the surface of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3593-8.

KOUKOURAS, D., MASTRONIKOLIS, N. S., TZORACOLEFTHERAKIS, E., ANGELOPOULOU, E., KALFARENTZOS, F. & ANDROULAKIS, J. 2001. The role of nasogastric tube after elective abdominal surgery. *Clin Ter*, 152, 241-4.

KREIENBERG, R., BOIS, A., PFINGSTERER, J., SCHINDELMANN, S., SCHMALFELDT, B., Management des Ovarialkarzinoms. *Onkologie aktuell*, Kapitel 2 Anatomie und Embryologie, Springer Verlag, Heidelberg, 2009. S18 (E-Book)

KUCUKMETIN, A., NAIK, R., GALAAL, K., BRYANT, A. & DICKINSON, H. O. 2010. Palliative surgery versus medical management for bowel obstruction in ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007792.

KUIPER, G. G., CARLSSON, B., GRANDIEN, K., ENMARK, E., HAGGBLAD, J., NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138, 863-70.

KUIPER, G. G., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M., NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5925-30.

KUMAR, R. & THOMPSON, E. B. 1999. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*, 64, 310-9.

KUMAR, R., ZAKHAROV, M. N., KHAN, S. H., MIKI, R., JANG, H., TORALDO, G., SINGH, R., BHASIN, S. & JASUJA, R. 2011. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids*, 2011, 812540.

KUMAR, V., GREEN, S., STACK, G., BERRY, M., JIN, J. R. & CHAMBON, P. 1987. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*, 51, 941-51.

LABRIE, F., LUU-THE, V., BELANGER, A., LIN, S. X., SIMARD, J., PELLETIER, G. & LABRIE, C. 2005. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *Journal of Endocrinology*, 187, 169-196.

LAZENNEC, G. 2006. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett*, 231, 151-7.

LEE, P., ROSEN, D. G., ZHU, C., SILVA, E. G. & LIU, J. 2005. Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 96, 671-7.

LEES, J. A., FAWELL, S. E. & PARKER, M. G. 1989. Identification of constitutive and steroid-dependent transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. *J Steroid Biochem*, 34, 33-9.

LEES, J. A., FAWELL, S. E. & PARKER, M. G. 1989. Identification of two transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. *Nucleic Acids Res*, 17, 5477-88.

LEIDENBERGER, F., STROWITZKI, T., ORTMANN, O., *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte, Kapitel 2 Wirkungen und Stoffwechsel der wichtigsten natürlichen Sexualsteroid der Frau, 4.Auflage, 2009, Springer- Verlag Berlin, Heidelberg, p. 24-45*

LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF):Leitlinienreport zur S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren,Langversion 1.0,AWMF Registrierungsnummer: 032035OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>

©Leitlinienprogramm Onkologie|Leitlinienreport S3-Leitlinie Ovarialkarzinom|Juni 2013

LENHARD, M., TEREZA, L., HEUBLEIN, S., DITSCH, N., HIMSL, I., MAYR, D., FRIESE, K. & JESCHKE, U. 2012. Steroid hormone receptor expression in ovarian cancer: progesterone receptor B as prognostic marker for patient survival. *BMC Cancer*, 12, 553.

LEPINE, J., AUDET-WALSH, E., GREGOIRE, J., TETU, B., PLANTE, M., MENARD, V., AYOTTE, P., BRISSON, J., CARON, P., VILLENEUVE, L., BELANGER, A. & GUILLEMETTE, C. 2010. Circulating estrogens in endometrial cancer cases and their relationship with tissular expression of key estrogen biosynthesis and metabolic pathways. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 2689-98.

LEVANON, K., CRUM, C. & DRAPKIN, R. 2008. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J Clin Oncol*, 26, 5284-93.

LEIDENBERGER F.A., STROWITZKI T., ORTMANN O., 2009. *Klinischen Endokrinologie für Frauenärzte. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 4.Auflage, Kapitel 2, p. 24-47*

LIU, J. F., HIRSCH, M. S., LEE, H. & MATULONIS, U. A. 2009. Prognosis and hormone receptor status in older and younger patients with advanced-stage papillary serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 115, 401-6.

LLOYD, R., V., 2010. *Endocrine Pathology, Differential Diagnosis and Molecular Advances*, 2. Auflage, Springer New York Dordrecht Heidelberg London, p. 1-5

LU, K. H. & BROADDUS, R. R. 2005. Gynecologic Cancers in Lynch Syndrome/HNPCC. *Fam Cancer*, 4, 249-54.

LUIZI, B. F., XU, W. X., OTWINOWSKI, Z., FREEDMAN, L. P., YAMAMOTO, K. R. & SIGLER, P. B. 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, 352, 497-505.

LUKANOVA, A., LUNDIN, E., MICHELI, A., ARSLAN, A., FERRARI, P., RINALDI, S., KROGH, V., LENNER, P., SHORE, R. E., BIESSY, C., MUTI, P., RIBOLI, E., KOENIG, K. L., LEVITZ, M., STATTIN, P., BERRINO, F., HALLMANS, G., KAAKS, R., TONIOLO, P. & ZELENIUCH-JACQUOTTE, A. 2004. Circulating levels of sex steroid hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women. *Int J Cancer*, 108, 425-32.

LUMACHI, F., LUISETTO, G., BASSO, S. M., BASSO, U., BRUNELLO, A. & CAMOZZI, V. 2011. Endocrine therapy of breast cancer. *Curr Med Chem*, 18, 513-22.

MAXIMOV P. Y., LEE T. M., JORDAN V. C., 2013. The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice
Curr. Clin. Pharmacol., 8, pp. 135–155

MILLER WL. Lessons from congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*. 1998a;5:155-161)

MILLER WL. Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1998b; 12: 67–81

MONTANO, M. M., MULLER, V., TROBAUGH, A. & KATZENELLENBOGEN, B. S. 1995. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the

transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol*, 9, 814-25.

MOORE, T. W., MAYNE, C. G. & KATZENELLENBOGEN, J. A. 2010. Minireview: Not picking pockets: nuclear receptor alternate-site modulators (NRAMs). *Mol Endocrinol*, 24, 683-95.

MOSSELMAN, S., POLMAN, J. & DIJKEMA, R. 1996. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 392, 49-53.

MUNSTEDT, K., STEEN, J., KNAUF, A. G., BUCH, T., VON GEORGI, R. & FRANKE, F. E. 2000. Steroid hormone receptors and long term survival in invasive ovarian cancer. *Cancer*, 89, 1783-91.

MURAMATSU, M. & INOUE, S. 2000. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun*, 270, 1-10.

NAGY, L., KAO, H. Y., LOVE, J. D., LI, C., BANAYO, E., GOOCH, J. T., KRISHNA, V., CHATTERJEE, K., EVANS, R. M. & SCHWABE, J. W. 1999. Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev*, 13, 3209-16.

NAM, E. J., YUN, M. J., OH, Y. T., KIM, J. W., KIM, J. H., KIM, S., JUNG, Y. W., KIM, S. W. & KIM, Y. T. 2010. Diagnosis and staging of primary ovarian cancer: correlation between PET/CT, Doppler US, and CT or MRI. *Gynecol Oncol*, 116, 389-94.

NEGRI, E., FRANCESCHI, S., TZONOU, A., BOOTH, M., LA VECCHIA, C., PARAZZINI, F., BERAL, V., BOYLE, P. & TRICHOPOULOS, D. 1991. Pooled analysis of 3 European case-control studies: I. Reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, 49, 50-6.

NILSEN, J., MOR, G. & NAFTOLIN, F. 2000. Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system. *J Neurobiol*, 43, 64-78.

NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A. 2011. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther*, 89, 44-55.

NOLTE, R. T., WISELY, G. B., WESTIN, S., COBB, J. E., LAMBERT, M. H., KUROKAWA, R., ROSENFELD, M. G., WILLSON, T. M., GLASS, C. K. & MILBURN, M. V. 1998. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, 395, 137-43.

OBATA, K., MORLAND, S. J., WATSON, R. H., HITCHCOCK, A., CHENEVIX-TRENCH, G., THOMAS, E. J. & CAMPBELL, I. G. 1998. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res*, 58, 2095-7.

PALACIOS, J. & GAMALLO, C. 1998. Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res*, 58, 1344-7.

PARKER, M. G. 1998. Transcriptional activation by oestrogen receptors. *Biochem Soc Symp*, 63, 45-50.

PERREN, T. J., SWART, A. M., PFISTERER, J., LEDERMANN, J. A., PUJADE-LAURINE, E., KRISTENSEN, G., CAREY, M. S., BEALE, P., CERVANTES, A., KURZEDER, C., DU BOIS, A., SEHOULI, J., KIMMIG, R., STAHL, A., COLLINSON, F., ESSAPEN, S., GOURLEY, C., LORTHOLARY, A., SELLE, F., MIRZA, M. R., LEMINEN, A., PLANTE, M., STARK, D., QIAN, W., PARMAR, M. K. & OZA, A. M. 2011. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 365, 2484-96.

PINKERTON, J. V. & THOMAS, S. 2013. Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.

PRAT, J., 2012. Ovarian Carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathical features. *Virchows Arch.*, 460(3), pp 237- 249

RIZNER, T. L. 2013. Estrogen biosynthesis, phase I and phase II metabolism, and action in endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 381, 124-39.

ROBERTSON, J. F. 2004. Selective oestrogen receptor modulators/new antioestrogens: a clinical perspective. *Cancer Treat Rev*, 30, 695-706.

ROCHE, P. J., HOARE, S. A. & PARKER, M. G. 1992. A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol*, 6, 2229-35.

ROETT, M. A. & EVANS, P. 2009. Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician*, 80, 609-16.

RUTHERFORD, T., BROWN, W. D., SAPI, E., ASCHKENAZI, S., MUNOZ, A. & MOR, G. 2000. Absence of estrogen receptor-beta expression in metastatic ovarian cancer. *Obstet Gynecol*, 96, 417-21.

SANGOI, A. R., SOSLOW, R. A., TENG, N. N. & LONGACRE, T. A. 2008. Ovarian clear cell carcinoma with papillary features: a potential mimic of serous tumor of low malignant potential. *Am J Surg Pathol*, 32, 269-74.

SCHORGE, J. O., MCCANN, C. & DEL CARMEN, M. G. 2010. Surgical debulking of ovarian cancer: what difference does it make? *Rev Obstet Gynecol*, 3, 111-7.

SCHWABE, J. W., CHAPMAN, L., FINCH, J. T., RHODES, D. & NEUHAUS, D. 1993. DNA recognition by the oestrogen receptor: from solution to the crystal. *Structure*, 1, 187-204.

SECKY, L., SVOBODA, M., KLAMETH, L., BAJNA, E., HAMILTON, G., ZEILLINGER, R., JAGER, W. & THALHAMMER, T. 2013. The sulfatase pathway for estrogen formation: targets for the treatment and diagnosis of hormone-associated tumors. *J Drug Deliv*, 2013, 957605.

SEIDMAN, J. D., RONNETT, B. M. & KURMAN, R. J. 2002. Pathology of borderline (low malignant potential) ovarian tumours. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 16, 499-512.

SEIELSTAD, D. A., CARLSON, K. E., KUSHNER, P. J., GREENE, G. L. & KATZENELLENBOGEN, J. A. 1995. Analysis of the structural core of the human

estrogen receptor ligand binding domain by selective proteolysis/mass spectrometric analysis. *Biochemistry*, 34, 12605-15.

SENTURK, E., COHEN, S., DOTTINO, P. R. & MARTIGNETTI, J. A. 2010. A critical re-appraisal of BRCA1 methylation studies in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 119, 376-83.

SHANG, Y. 2006. Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 6, 360-8.

SHIAU, A. K., BARSTAD, D., LORIA, P. M., CHENG, L., KUSHNER, P. J., AGARD, D. A. & GREENE, G. L. 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95, 927-37.

SHIAU, A. K., BARSTAD, D., RADEK, J. T., MEYERS, M. J., NETTLES, K. W., KATZENELLENBOGEN, B. S., KATZENELLENBOGEN, J. A., AGARD, D. A. & GREENE, G. L. 2002. Structural characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism. *Nat Struct Biol*, 9, 359-64.

SHIH IE, M. & KURMAN, R. J. 2004. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*, 164, 1511-8.

SHIMAMOTO, T., AMADA, S., ASADA, Y., HAYASHI, T. Prognostic value of histologic grading of ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol*. 2003 an; 22(1):52-6

SIGNORETTI, S. & LODA, M. 2001. Estrogen receptor beta in prostate cancer: brake pedal or accelerator? *Am J Pathol*, 159, 13-6.

SILBERNAGL, S., DESPOPOULOS, A., Taschenatlas Physiologie, 7. Auflage, 2007, Georg Thieme Verlag, Stuttgart S296-307

SIMPSON, E. R. 2002. Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. *Fertil Steril*, 77 Suppl 4, S6-10.

SMITH, C. L. & O'MALLEY, B. W. 2004. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev*, 25, 45-71.

SOGAARD, M., KJAER, S. K. & GAYTHER, S. 2006. Ovarian cancer and genetic susceptibility in relation to the BRCA1 and BRCA2 genes. Occurrence, clinical importance and intervention. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 85, 93-105.

STATISTIK AUSTRIA 2013,

http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/eierstock/index.html, Stand 31.10.2013

TANGJITGAMOL, S., MANUSIRIVITHAYA, S., KHUNNARONG, J., JESADAPATARAKUL, S. & TANWANICH, S. 2009. Expressions of estrogen and progesterone receptors in epithelial ovarian cancer: a clinicopathologic study. *Int J Gynecol Cancer*, 19, 620-7.

TREECK, O., PFEILER, G., MITTER, D., LATTRICH, C., PIENDL, G. & ORTMANN, O. 2007. Estrogen receptor {beta}1 exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. *J Endocrinol*, 193, 421-33.

TREMBLAY, G. B., TREMBLAY, A., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A., LABRIE, F. & GIGUERE, V. 1997. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol*, 11, 353-65.

TRIMBOS, J. B., VERGOTE, I., BOLIS, G., VERMORKEN, J. B., MANGIONI, C., MADRONAL, C., FRANCHI, M., TATEO, S., ZANETTA, G., SCARFONE, G., GIURGEA, L., TIMMERS, P., COENS, C. & PECORELLI, S. 2003. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst*, 95, 113-25.

TSAI, M. J. & O'MALLEY, B. W. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*, 63, 451-86.

TSENG, L., MAZELLA, J., MANN, W. J. & CHUMAS, J. 1982. Estrogen synthesis in normal and malignant human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 55, 1029-31.

TWYXCROSS, R. G., BERGL, S., JOHN, S. & LEWIS, K. 1994. Monitoring drug use in palliative care. *Palliat Med*, 8, 137-43.

WARNSMARK, A., WIKSTROM, A., WRIGHT, A. P., GUSTAFSSON, J. A. & HARD, T. 2001. The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured in vitro and show different TBP binding properties. *J Biol Chem*, 276, 45939-44.

WIEGAND, K. C., SHAH, S. P., AL-AGHA, O. M., ZHAO, Y., TSE, K., ZENG, T., SENZ, J., MCCONECHY, M. K., ANGLIOSIO, M. S., KALLOGER, S. E., YANG, W., HERAVI-MOUSSAVI, A., GIULIANI, R., CHOW, C., FEE, J., ZAYED, A., PRENTICE, L., MELNYK, N., TURASHVILI, G., DELANEY, A. D., MADORE, J., YIP, S., MCPHERSON, A. W., HA, G., BELL, L., FEREDAY, S., TAM, A., GALLETTA, L., TONIN, P. N., PROVENCHER, D., MILLER, D., JONES, S. J., MOORE, R. A., MORIN, G. B., OLOUMI, A., BOYD, N., APARICIO, S. A., SHIH IE, M., MES-MASSON, A. M., BOWTELL, D. D., HIRST, M., GILKS, B., MARRA, M. A. & HUNTSMAN, D. G. 2010. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med*, 363, 1532-43.

WILLIAMS, S. P. & SIGLER, P. B. 1998. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature*, 393, 392-6.

WONG, K. K., LU, K. H., MALPICA, A., BODURKA, D. C., SHVARTSMAN, H. S., SCHMANDT, R. E., THORNTON, A. D., DEAVERS, M. T., SILVA, E. G. & GERSHENSON, D. M. 2007. Significantly greater expression of ER, PR, and ECAD in advanced-stage low-grade ovarian serous carcinoma as revealed by immunohistochemical analysis. *Int J Gynecol Pathol*, 26, 404-9.

WOOD, J. R., LIKHITE, V. S., LOVEN, M. A. & NARDULLI, A. M. 2001. Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol*, 15, 1114-26.

WU, Y. L., YANG, X., REN, Z., MCDONNELL, D. P., NORRIS, J. D., WILLSON, T. M. & GREENE, G. L. 2005. Structural basis for an unexpected mode of SERM-mediated ER antagonism. *Mol Cell*, 18, 413-24.

YANG, J., SINGLETON, D. W., SHAUGHNESSY, E. A. & KHAN, S. A. 2008. The F-domain of estrogen receptor-alpha inhibits ligand induced receptor dimerization. *Mol Cell Endocrinol*, 295, 94-100.

YANG, X. Y., XI, M. R., YANG, K. X. & YU, H. 2009. Prognostic value of estrogen receptor and progesterone receptor status in young Chinese ovarian carcinoma patients. *Gynecol Oncol*, 113, 99-104.

YUAN, Y., GU, Z. X., TAO, X. F. & LIU, S. Y. 2012. Computer tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography or positron emission tomography/computer tomography for detection of metastatic lymph nodes in patients with ovarian cancer: a meta-analysis. *Eur J Radiol*, 81, 1002-6.

ZHAO, C., DAHLMAN-WRIGHT, K. & GUSTAFSSON, J. A. 2008. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*, 6, e003.

9 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Katharina Stefanie Ocko
Geburtsort: Klagenfurt
Nationalität: Österreich

Ausbildung

Sept. 2013- Febr. 2014 Diplomarbeit am Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung der Medizinischen Universität Wien.

Seit Oktober 2006 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

27.06.2006 Matura mit Auszeichnung am BRG Klagenfurt-Viktring, Realgymnasium mit besonderer Berücksichtigung der musischen Ausbildung

Berufliche Erfahrung

1.- 31. Juli 2012 Praktikum Uni-Apotheke Klagenfurt Mag. Pharm. Elfriede Fugger Universitätsstraße 23, 9020 Klagenfurt

1.- 31. Juli 2011 Praktikum Uni-Apotheke Klagenfurt Mag. Pharm. Elfriede Fugger Universitätsstraße 23, 9020 Klagenfurt

1.- 31. Juli 2010 Praktikum Uni-Apotheke Klagenfurt Mag. Pharm. Elfriede Fugger Universitätsstraße 23, 9020 Klagenfurt