

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. habil. K. Friese

**Expressionsanalyse nukleärer
Hormonrezeptoren im Ovarialkarzinom**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Cornelia Sattler
aus Wien
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Sebastian Stintzing, Prof. Dr. Doris Mayr

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2015

Zusammenfassung

Fragestellung: Das Ovarialkarzinom ist die fünfthäufigste Krebserkrankung bei Frauen. Trotz radikaler chirurgischer Interventionen und nachfolgender Chemotherapie beträgt das Fünfjahresüberleben nur 42%. Die anhaltend schlechte Prognose macht die Suche nach Zielmolekülen im Sinne einer „targeted therapy“ zur Erweiterung des Behandlungsspektrums nötig. Diese Arbeit soll neue Erkenntnisse über die Expression acht verschiedener Rezeptoren der Kernrezeptorsuperfamilie (THR α 2, THR α 1, THR α 1/2, THR β , THR β 1, RXR α , PPAR γ und VitDR) im Ovarialkarzinom bringen und Aussagen zu ihrem prognostischen Stellenwert ermöglichen.

Patienten und Methoden: Das untersuchte Kollektiv besteht aus Patientinnen, die an unserer Klinik zwischen 1990 und 2002 aufgrund eines Ovarialkarzinoms operiert wurden. Die Gewebeproben wurden nach den gängigen Methoden der Immunhistochemie bearbeitet, die Färbungen mittels IRS-Score bewertet und mit SPSS statistisch ausgewertet.

Ergebnisse: Alle von uns untersuchten Rezeptoren werden im Ovarialkarzinom exprimiert und zeigen zusätzlich zu ihrem nukleären Vorkommen eine Koexpression im Zytoplasma. Speziell PPAR γ und THR β 1 kommen überwiegend extranukleär vor. Die Analyse der Rezeptorexpression nach histopathologischen Subtypen ergab eine Spezifität von THR β 1 für klarzellige Ovarialtumore. THR α 1/2 ist in allen Subtypen außer dem muzinösen exprimiert.

Bei Tumorprogression erlischt die Expression mehrerer Rezeptoren: Mit Verschlechterung des Gradings kommt es zum Verlust von THR α 2 in serösen Ovarialkarzinomen und tendenziell auch im Gesamtkollektiv. Beim serösen Ovarialkarzinom wirkt sich dies verkürzend auf das Überleben aus. Auch die Expression des THR β 1 in klarzelligen Tumoren und des VitDR in serösen Karzinomen sinkt signifikant mit der Verschlechterung des Gradings. In fortgeschrittenen FIGO-Tumorstadien verlieren die Karzinome außerdem ihre THR β 1 Rezeptoren, sowie seröse Tumoren tendenziell ihre THR α 1/2 Rezeptoren.

THR β erfährt als einziger Rezeptor eine Expressionszunahme bei Tumorprogression und ist im Stadium III der FIGO-Klassifikation deutlich überexprimiert. Die zytoplasmatische Expression von THR α 2, THR β und VitDR scheint zudem die Mortalität zu erhöhen.

Außerdem zeigt sich eine lange Reihe an Rezeptorkorrelationen.

Diskussion: Im Zuge der Entdifferenzierung des Gewebes zeigte sich für mehrere Rezeptoren (THR α 2, THR α 1/2 und THR β 1) ein intranukleärer Expressionsverlust. Die intranukleäre und zytoplasmatische Expression der von uns untersuchten Rezeptoren korreliert dabei umgekehrt proportional miteinander (Ausnahme VitDR). Eine persistierende intranukleäre THR α 2-Expression ermöglicht zumindest im serösen Ovarialkarzinom ein längeres Überleben, während die zytoplasmatische Expression von THR α 2, THR β und VitDR im Gesamtkollektiv hochsignifikant das Mortalitätsrisiko steigert. Diese Translokation im Rahmen der Tumorprogression könnte evtl. durch einen Entzündungsprozess oder durch eine Schilddrüsenstörung ausgelöst sein. Weitere Untersuchungen mit Vergleich der Rezeptorexpression im gesunden Ovarialgewebe und simultaner Messung von Schilddrüsenhormonen und Entzündungsparametern sind ausstehend.

Die intranukleäre Expression von THR β hingegen nimmt bei Tumorprogression zu. Sein Stellenwert in der Kanzerogenese des Ovarialkarzinoms ist genau wie seine Bedeutung in der Krebsentstehung anderer Tumore noch nicht geklärt.

RXR α , PPAR γ und THR α 1 scheinen im Ovarialkarzinom eine untergeordnete Rolle zu haben.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Inhaltsverzeichnis	5
1. Einleitung.....	7
1.1. Das Ovarialkarzinom	7
1.1.1. Epidemiologie	7
1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren.....	7
1.1.3. Pathologie	8
1.1.4. Klinik.....	9
1.2. Nukleäre Rezeptoren	10
1.2.1. Thyroidhormonrezeptoren (THR)	11
1.2.2. Retinoid-X-Rezeptor (RXR).....	13
1.2.3. Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor (PPAR)	15
1.2.4. Vitamin D Rezeptor (VitDR)	17
2. Fragestellung.....	20
3. Patienten und Methoden	21
3.1. Patientenkollektiv	21
3.2. Immunhistochemie	23
3.2.1. Allgemeines zu Antikörpern.....	23
3.2.2. Verwendete Antikörper.....	23
3.2.3. Detektionssysteme	24
3.2.4. Spezielles Vorgehen in der Immunhistochemie.....	27
3.3. Mikroskopische Auswertung mit dem IRS-Score	28
3.4. Statistische Analyse mit SPSS.....	29
3.5. Index ausgewählter verwendeter Materialien.....	30
4. Ergebnisse.....	31
4.1. THR α 2	31
4.2. THR α 1	34
4.3. THR α 1/2	34
4.4. THR β	38
4.5. THR β 1	40
4.6. RXR α	45
4.7. PPAR γ	45
4.8. VitDR	45
5. Diskussion	49
Abkürzungsverzeichnis	58
Abbildungsverzeichnis.....	60

Tabellenverzeichnis.....	60
References	61
Danksagung	71
Publikationen	72
Anhang	73
Eidesstattliche Versicherung	80

1. Einleitung

1.1. Das Ovarialkarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von 3,5% trägt das Ovarialkarzinom bei deutschen Frauen zu 5,6% der tumorbezogenen Mortalität bei und liegt damit an fünfter Stelle der malignen Tumoren. Die Inzidenz steigt bis zum Alter von 85 Jahren an. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt etwa 69 Jahre, das Lebenszeitrisko 1:68. Inzidenz und Mortalität sind in Deutschland rückläufig. 42% der Patientinnen leben 5 Jahre nach Diagnosestellung noch.^{1,2}

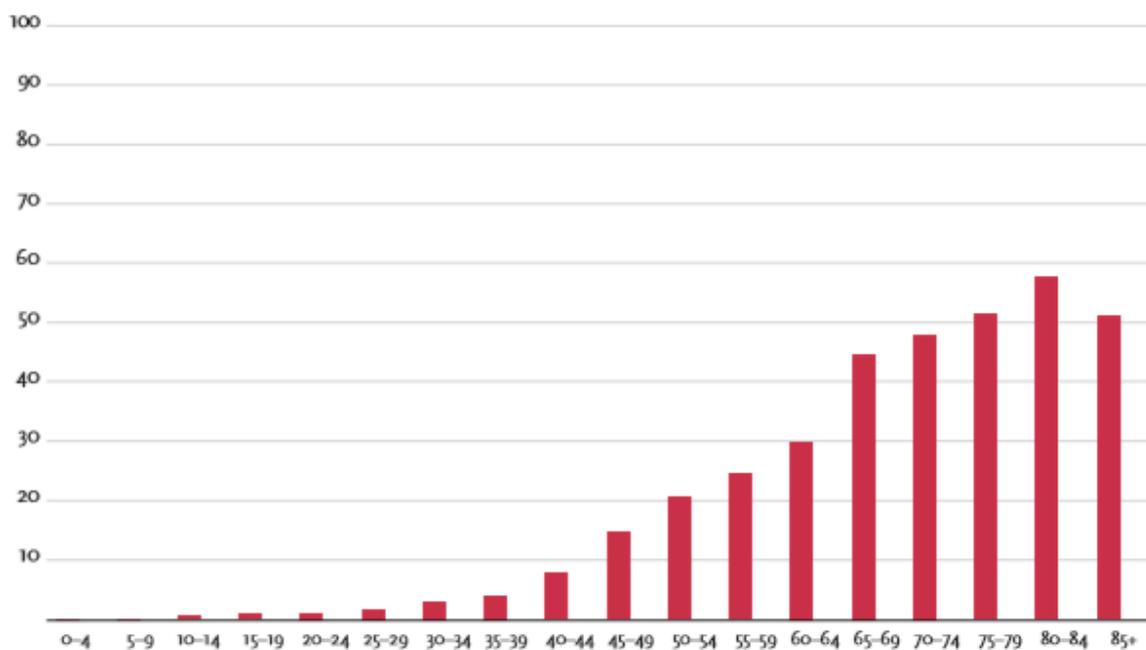


Abbildung 1: Altersspezifische Inzidenz des Ovarialkarzinoms je 100 000. Deutschland 2009-2010.²

1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Etwa 90% der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf.³ Mutationen in der Keimbahn lassen sich bei etwa 10% der Patientinnen mit Ovarialkarzinom in den Genen BRCA1 oder BRCA2 (hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinomsyndrom), seltener in MLH1 oder MSH2 (HNPCC-Syndrom) oder p53 (Li-Fraumeni-Syndrom), nachweisen.⁴ Inwiefern die BRCA-Mutation Einfluss auf das Überleben hat, ist widersprüchlich. Einige Studien berichten, dass BRCA1-assoziierte Karzinome

schlechter differenziert sind als sporadische Malignome und damit mit einer schlechteren Prognose einhergehen,^{5,6} andere Publikationen berichten von einem Überlebensvorteil genau dieser Tumorpatientinnen.^{7,8}

Obwohl nur bei einem Bruchteil der Patientinnen eine genetische Prädisposition nachzuweisen ist, stellt das Auftreten eines Ovarial- oder Mammakarzinoms bei Verwandten ersten Grades den wichtigsten Risikofaktor dar.¹ Einen weiteren großen Einfluss scheint die wiederholte Stimulation des ovariellen Oberflächenepithels aufgrund von ununterbrochener Ovulation bei Nulliparität zu haben. Über einen Entzündungsprozess, ausgehend von Inklusionszysten und Stromarissen, könnte es so zu einer malignen Transformation kommen.^{1,9–11} Weitere Risikofaktoren sind Adipositas, das PCO-Syndrom, Östrogenmonopräparaten bei Frauen nach der Menopause, Asbest- und Talkexposition, Endometriose und eine chronische Unterbauchentzündung. Protektiv wirken Geburten, Stillen, orale Kontrazeptiva, Tubenligatur und Hysterektomie.^{2,3,11} Außerdem variieren die Risiko- und protektiven Faktoren nach histopathologischem Subtyp,¹² wobei vor allem das muzinöse Ovarialkarzinom eine Sonderstellung bezieht. Hier wirken Geburten und orale Kontrazeptiva etwa nicht protektiv.¹³

1.1.3. Pathologie

90% der Ovarialtumore gehen vom Oberflächenepithel aus, der Rest von Granulosazellen und selten von Stroma- oder Keimzellen.¹⁴ Die Tumore des ovariellen Oberflächenepithels werden in vier histopathologische Subtypen unterteilt:

Serös/Papillär	Häufigster Subtyp; mit erhöhtem CA-125 assoziiert; histologisch Psammomkörperchen und Ähnlichkeiten mit dem primär serösen Peritonealkarzinom.
Endometrioid	Assoziation mit Endometriose, dem primären Uteruskarzinom ähnlicher Histologie oder beidem; bei jungen Patientinnen Frühstadien üblicher.
Muzinös	Assoziation mit Pseudomyxoma Peritonei (selten); CA-125 eher nicht erhöht; keine Assoziation mit <i>BRCA1/2</i> -Keimzellmutationen, oft chemoresistent; differentialdiagnostisch ist an Metastasen vom primären Appendixkarzinom zu denken, insbesondere wenn beide Ovarien betroffen sind.
Klarzellig	Ausgesprochen chemoresistent; Assoziation mit Endometriose, Hyperkalzämie oder beidem; histologisch Hobnail-Zellen mit ausgewaschenem Zytoplasma.

Tabelle 1: Einteilung des Ovarialkarzinoms nach histopathologischem Subtyp ¹

Neben der histopathologischen Klassifikation können Ovarialkarzinome auch anhand von pathogenetischen Mechanismen in zwei Gruppen eingeteilt werden. Typ I werden seröse G1-Tumore, sowie alle muzinösen, endometrioiden und klarzelligigen Karzinome zugeordnet. Sie entwickeln sich aus benignen Vorstufen über Boderlinetumore zum Karzinom. Subtypspezifisch treten unterschiedliche Mutationen auf, wie KRAS und BRAF in serösen G1-Tumoren, KRAS in muzinösen Malignomen und PIK3CA in klarzelligigen Karzinomen. Endometrioiden Ovarialtumoren liegen meist Wnt- und PTEN-Mutationen, sowie Mikrosatelliteninstabilitäten zugrunde. Typ II Tumore entstehen de-novo und beinhalten seröse G2- bzw. G3-Tumore, undifferenzierte Karzinome und Karzinosarkome. P53-Mutationen und Chromosomenabberationen sind charakteristisch.^{15,16}

1.1.4. Klinik

Das Ovarialkarzinom wird zumeist spät erkannt.¹⁷ Unterbauchschmerzen können bei Torsion des Ovars ein frühes Symptom sein. Häufig treten Beschwerden, wie Völlegefühl, Dyspepsie, frühes Sättigungsgefühl und Meteorismus, jedoch erst als Folge eines erhöhten intraabdominellen Drucks durch Aszites oder Affektion des Omentums auf.¹ Ein weiteres diagnostisches Dilemma ist das Fehlen von spezifischen Tumormarkern: CA125 ist zwar bei 80% der Ovarialkarzinome erhöht, jedoch auch bei benignen Tumoren.³ Die Kombination von CA125 mit HE4¹⁸ oder der Sonographie¹⁷ könnte die Spezifität erhöhen.

Diagnostisch als auch therapeutisch folgt auf den Verdacht meist die chirurgische Exploration auch in sehr fortgeschrittenen Stadien. Die darauffolgende Carboplatin/Paclitaxel-haltige Chemotherapie führt oft anfänglich zur Remission. Bei späten Rezidiven folgt eine platinbasierte Mehrfachchemotherapie, bei frühen Rezidiven eine einfache Chemotherapie.^{1,17} Eine antikörperbasierte Therapie („targeted therapy“) gegen VEGF, PARP und Rezeptortyrosinkinasen (EGFR/HER2, PDGFR) ist ein neuer Therapieansatz.^{4,17} Gerade Patientinnen mit Typ I Ovarialkarzinomen könnten aufgrund ihres schlechteren Ansprechens auf die übliche Chemotherapie davon profitieren.¹⁶

1.2. Nukleäre Rezeptoren

Klassische Kernrezeptoren liegen gebunden an Hitzeschockproteine (HSP90) und Korepressoren wie Histon-Deacetylase (HDAC), die die Kondensation der DNA bewirkt, im Zytosol. Nach Diffusion des lipophilen Liganden durch die Zellmembran bindet dieser an den Rezeptor und das HSP und die Korepressoren trennen sich vom Rezeptor. Dadurch wird das NLS (nukleäre Lokalisationssignal) freigelegt und auch Koaktivatoren wie die Histon-Acetyltransferase (HAT) können nun binden. Zwei Rezeptoren vereinigen sich zu einem Dimer, translozieren anschließend in den Kern und binden an palindromische DNA-Sequenzen, die Enhancer/Silencer (=HRE/Hormone-responsive Elements) entsprechen. Über Koregulatoren interagieren die nun DNA-gebundenen Rezeptoren mit der RNA Polymerase und steigern oder hemmen so die Transkription von Zielgenen.^{19,20} Durch die variierende Expression von Koregulatoren kommt es außerdem zu gewebsspezifischen Unterschieden in der Wirkung von Rezeptorliganden.^{21,22}

Allen nukleären Rezeptoren ist ein charakteristischer molekularer Aufbau gemein: Die Ligandenbindungsstelle (E) und die DNA-Bindungsstelle (C) sind die konstantesten Regionen, liegen mittig und sind durch eine Scharnierregion (D) verbunden. An den Enden liegen die variablen Aktivierungsdomänen (A/B und F), wo Koregulatoren und die RNA-Polymerase binden.²³

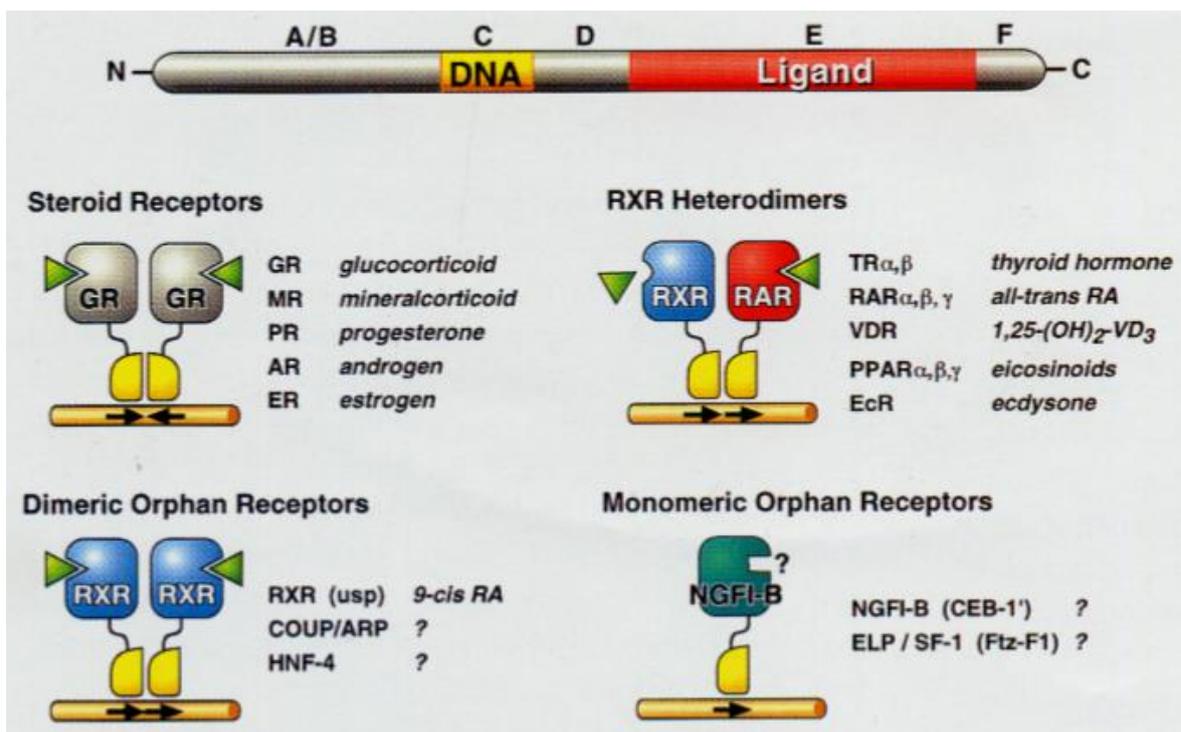


Abbildung 2: Molekulare Aufbau von Kernrezeptoren²⁴

Eine weitere Besonderheit der Kernrezeptoren ist ihre Interaktion mit anderen Signalwegen: Zum einen interagieren Kernrezeptoren mit anderen Transkriptionsfaktoren (zum Beispiel Glukokortikoide mit NF- κ B). Zum anderen können Kernrezeptoren Zielmoleküle anderer Signalwege sein, die den Rezeptor posttranskriptionell, etwa durch Phosphorylierung, modifizieren (zum Beispiel kommt es im Zuge des PKA-Signalweges in Zellen des Mammakarzinoms zur Phosphorylierung von ER α , der dadurch resistent gegenüber Tamoxifen wird). Außerdem verfügen Kernrezeptoren über eine nichtgenomische Aktivität etwa an der Zytoplasmamembran.²⁰

Kernrezeptoren werden nach ihrer Funktion in mehrere Gruppen unterteilt: Typ I Rezeptoren sind die klassischen Steroidhormonrezeptoren für Glukokortikoide, Mineralokortikoide und Sexualhormone, die wie oben beschrieben nach Bindung ihres Liganden vom Zytosol in den Zellkern translozieren und dort als Homodimere an palindromische DNA-Sequenzen binden. Typ II Rezeptoren hingegen liegen zusätzlich im Kern vor, bilden Heterodimere bevorzugt mit RXR und binden an sich wiederholende Nukleotidsequenzen. Zu dieser Gruppe gehören die Rezeptoren für Schilddrüsenhormone, Retinoide, Vitamin D und Fettsäuren. Typ III „Orphan“ Rezeptoren binden ohne oder mit einem noch unbekanntem Liganden an die DNA.²⁵

1.2.1. Thyroidhormonrezeptoren (THR)

Die Schilddrüse sezerniert nach kaskadischer Stimulation durch den Hypothalamus (TRH) und die Hypophyse (TSH) zum Großteil das inaktive Thyroxin (T4) und in geringeren Mengen das aktive Triiodthyronin (T3). Die beiden Hormone gelangen durch spezifische Transporter ins Zellinnere, wo T4 zu T3 aktiviert wird.²⁶

Thyroidhormonrezeptoren existieren in Zellkern und Zytoplasma, an Mitochondrien und an der Zytoplasmamembran und binden T3 mit 15-fach höherer Affinität als T4. Sie werden von zwei Genen kodiert: Das THR β -Gen auf Chromosom 3 kodiert drei Rezeptoren (β 1, β 2, β 3), die alle Triiodthyronin binden, und wird vor allem in Niere und Schilddrüse transkribiert. Das THR α -Gen auf Chromosom 17 kodiert THR α 1, sowie zwei Splicevarianten (α 2 und α 3), wobei nur THR α 1 T3 binden kann. Dieses Gen wird vor allem in Gehirn, Herz und Knochen abgelesen.²⁷

Nach Ligand-Rezeptor-Bindung bildet der Komplex Dimere: THR α -Rezeptoren bilden ausschließlich Heterodimere, wohingegen THR β -Rezeptoren auch

Homodimere bilden.²⁸ Der bevorzugte Dimerisationspartner ist dabei der Retinoid-X-Rezeptor (RXR),²⁹ der nicht nur Thyroidhormonrezeptoren als Bindungspartner zur Verfügung steht. In diesem Sinne kommt es zur Konkurrenz um RXR, vor allem mit PPAR γ .³⁰

Isoformabhängig unterscheidet sich das transkribierte Genprodukt, was an Knock-out-Mäusen verdeutlicht werden kann: Bei Fehlen des α 1-Gens kommt es zu Herzkreislaufstörungen,³¹ bei Verlust des β -Gens hingegen zu auditorischen und ophthalmologischen Fehlbildungen.³² Ob die Genexpression durch eine unterschiedliche Affinität des Rezeptors zum Promotor,³³ durch die Menge des Rezeptors³⁴, oder durch den Dimerisationspartner²⁸ beeinflusst wird, ist bislang ungeklärt.

Doch Thyroidhormonrezeptoren wirken nicht nur als ligadenabhängige Transkriptionsfaktoren an der DNA: Durch Aktivierung des PI3K-Signalweges durch Phosphorylierung von Akt/PKB können die Rezeptoren außerdem fernab einer direkten DNA-Bindung die Genexpression beeinflussen,³⁵ und etwa die Transkription des hypoxieinduzierten Faktors (HIF1 α) induzieren,³⁶ der eine zentrale Rolle in Tumorprogression und –mortalität innehat.³⁷ Andererseits binden Schilddrüsenhormone auch direkt an das Transmembranprotein av β 3 und induzieren so Zellproliferation und Angiogenese.³⁸ Weiters beeinflussen Thyroidhormone Schritte der posttranslationalen Modifizierung wie Splicing³⁹ und mRNA-Stabilisation.⁴⁰

Schilddrüsenhormone spielen für viele Organsysteme, wie etwa das Herzkreislaufsystem, eine wichtige Rolle: Eine Hyperthyreose führt zu Tachykardie, Palpitationen und Vorhofflimmern, eine Erniedrigung der Schilddrüsenhormone begünstigt hingegen Atherosklerose und die koronare Herzerkrankung via Hypercholesterinämie und Bluthochdruck.⁴¹ Außerdem beeinträchtigt eine mütterliche Schilddrüsenunterfunktion maßgeblich die neurologische Entwicklung des Feten, eine Überfunktion der Schilddrüse führt dagegen zu Osteoporose.⁴²

Die verschiedenen Wege der Signaltransduktion lassen erahnen, dass Schilddrüsenhormone auch die Kanzerogenese beeinflussen. Ihr Stellenwert wurde bisher vor allem für das Mammakarzinom, aber auch für viele andere Malignome untersucht. Eine Hyperthyreose erhöht die Inzidenz von Kolon-, Mamma-, Prostata-

und Bronchialkarzinom und stimuliert das Tumorwachstum und die Metastasierung. Eine Hypothyreose korreliert hingegen beim Mammakarzinom mit einem Auftreten erst im höheren Alter und der selteneren Diagnose in fortgeschrittenen Stadien.⁴³

Auch für das Ovar wurde bei Schilddrüsenüberfunktion ein erhöhtes Karzinomrisiko postuliert.⁴⁴ Im Ovar werden Schilddrüsenhormonrezeptoren von Oozyten, Granulosazellen und Cumuluszellen, als auch vom Oberflächenepithel exprimiert.^{45,46} Über diese Rezeptoren nehmen Schilddrüsenhormone Einfluss auf die ovariellen Hormonkaskaden und führen bei Hypothyreose zum Ausbleiben der Ovulation.⁴⁷

Die einzige bisher durchgeführte immunhistochemische Studie bezüglich Hormonrezeptoren im Ovar stammt von Rae⁴⁶ und beschreibt ein kleines Kollektiv von 12 Patientinnen, die aus nichtmalignen Gründen operiert wurden. Sowohl THR β als auch THR α würden in den Zellkernen des ovariellen Oberflächenepithels stark exprimiert, THR β zudem im Stroma. Untersuchungen zur Expression und Rolle im Ovarialkarzinom sind ausstehend.

1.2.2. Retinoid-X-Rezeptor (RXR)

Das fettlösliche Vitamin A „Retinol“ spielt eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung, für Wachstum, Zelldifferenzierung und Sehleistung. Es kann nicht de-novo synthetisiert werden und muss deshalb mit der Nahrung zugeführt werden. 50% des Bedarfs an Vitamin A wird durch Tierprodukte in Form von Retinol oder Retinylestern zugeführt, weitere 50% durch verschiedene Gemüsesorten, die Carotenoide enthalten.⁴⁸ Von diesen 600 Carotenoiden sind nur 10% als Provitamin A wirksam, wobei β -Caroten das potenteste ist.⁴⁹ Es sind sechs biologisch aktive Retinol-Isoformen bekannt: all-trans, 11-cis, 13-cis, 9,13-di-cis, 9-cis und 11,13-di-cis.⁵⁰ Natürlich vorkommende und synthetisch hergestellte Substanzen mit einer ähnlichen Funktion oder ähnlichem chemischen Aufbau werden als Retinoide bezeichnet.⁴⁸

Es existieren verschiedene Retinoidrezeptoren, wie RXR $\alpha/\beta/\gamma$ und RAR $\alpha/\beta/\gamma$.⁵¹ Im Gegensatz zum RXR bindet RAR zusätzlich zu 9-cis Retinsäure die all-trans Isoform.⁵² Für RXR wird jüngst 9-cis Retinsäure aufgrund ihrer fraglichen biologischen Funktion als Ligand in Frage gestellt.⁵³

Retinoidrezeptoren bilden bevorzugt RAR-RXR Heterodimere und induzieren in dieser Form bei Bindung an retinoidresponsive Elemente der DNA die Transkription mindestens 27 unterschiedlicher Gene.⁵⁴ RXR ist aber nicht nur der Heterodimerisationspartner von RAR, sondern bildet auch Komplexe mit Rezeptoren für Vitamin D, Schilddrüsenhormone und Fettsäuren.

Im Heterodimer wirkt RXR als Suppressor um einer gleichzeitigen und gegensinnigen Gentranskription durch die Kernrezeptoren regulierend entgegen zu wirken.²⁰ Doch dem Rezeptor sind auch spezifischere Funktionen zuzuschreiben: Beim Fehlen von RXR α kommt es zu Hyperplasie von Prostata- und Hautgewebe.^{55,56} Der ligandenaktivierte RXR α führt außerdem durch Homodimerbildung zu einer Mehrexpression von p21, das für die Kontrolle des Zellzyklus zuständig ist und durch Induktion eines Zellzyklusarrests eine tumorprotektive Funktion erfüllt. RAR konkurriert aber um die Homodimerisation und verhindert so den p21 induzierten Zellzyklusarrest.⁵⁷

Neben ihrer Wirkung als Ligand DNA-gebundener Rezeptoren beeinflussen Retinoide außerdem rezeptorgebunden oder gar alleine unterschiedliche Signalwege. RAR α bindet etwa im Zytoplasma mRNA für den Glutamat Rezeptor 1 und verhindert ihre Translation. Bei zusätzlicher Bindung von Retinsäure an RAR α wird die mRNA wiederum aus ihrer Suppression entlassen.⁵⁸ Retinoide interagieren zudem mit NF- κ B und können darüber Einfluss auf die Kanzerogenese nehmen.⁵⁹

Retinoide unterstützen die Stammzellendifferenzierung und vermindern die Zellproliferation. Sie sind Therapiebestandteil bei der Behandlung von Psoriasis und Akne, sowie in der Therapie und Chemoprävention verschiedener Malignome, wie auch dem Hautkrebs und seinen Risikoerkrankungen, wie der Xeroderma pigmentosum.⁶⁰

Für die Tumorthherapie wird gegenwärtig vor allem der Stellenwert von RAR α -bindenden Retinoiden erforscht. Sie wirken etwa indem sie den Todesrezeptor TRAIL von Tumorzellen binden und darüber deren Apoptose induzieren.⁶¹ Den größten Stellenwert haben sie in der Therapie der akuten Promyelozytenleukämie (APL), bei der es zu einer Translokation des Gens für RAR α in die Nähe eines APL-assoziierten Locus kommt.⁶²

Auch bei Haut-, Bronchial-, Mamma- und Oralkarzinomen werden Retinoide inzwischen eingesetzt.^{63,64} Es existieren präklinische Studien, wonach 9-cis Retinsäure chemoprotektiv gegen das Mamma- und Prostatakarzinom wirkt.⁵⁰ Beim Neuroblastom zeigte sich in einer Phase III Studie ein reduziertes Rezidivrisiko unter einer Hochdosis Pulstherapie mit 13-cis Retinsäure nach Abschluss der Chemotherapie.⁶⁵

Doch auch Retinoide, die sich gegen RXR richten, zeigen, wenn auch begrenzt, Erfolge. Bei der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms profitieren etwa 20% der Patientinnen.⁶⁶

Sogar im Ovarialkarzinom hemmen Vitamin-A-Säure Derivate das Wachstum von Tumorzellen.⁶⁷⁻⁷¹ Sie wirken proapoptotisch und unterdrücken BRCA-Gene.⁷² Das synthetische Retinoid 4-HPR (*Fenretinid*) wirkt spezifisch gegen RAR γ ⁷³ und erhöht die Wirkung von Cisplatin.^{74,75}

Die vermehrte Expression von RXR α sensibilisiert Tumorzellen für die proliferationshemmende Wirkung von Retinoiden.⁵⁷ Durch Kombination von Fenretinid mit oralen Kontrazeptiva wird die Expression von RXR α und RXR γ erhöht.⁷⁶ Über einen Sensibilisierungsmechanismus für Apoptose kommt auch RXR γ eine karzinomprotektive Wirkung zu.⁷⁷

Der positive Effekt von Fenretinid auf die Inzidenz von Ovarialkarzinomen konnte inzwischen sogar in vivo bestätigt werden: Zufällig zeigte sich im Follow-Up von Brustkrebspatientinnen, die mit dem Retinsäurederivat behandelt wurden, eine signifikant erniedrigte Inzidenz von Ovarialkarzinomen solange das Präparat eingenommen wurde. Nach Behandlungsende schien der protektive Effekt jedoch wieder zu erlöschen.⁷⁸ Im Gegensatz zu synthetischen Retinoiden erwies sich das natürlich vorkommende β -Carotin nur mäßig protektiv.⁷⁹⁻⁸¹

1.2.3. Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor (PPAR)

Auch PPARs sind liandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, die Heterodimere mit RXR bilden. Es existieren mehrere Rezeptorisoformen (α , β [δ] und γ), deren Liganden nicht Hormone, sondern Fettsäuren und ihre Derivate, wie Eicosanoide und Prostaglandine sind.⁸²

Ihre Wirkung entfalten sie über die Transkriptionsinduktion von Genen für Homöostase, Lipidmetabolismus und Adipozytendifferenzierung bis hin zur

Makrophagenaktivierung zur Immunantwort.⁸²⁻⁸⁴ Therapeutisch werden Fibrate und Glitazone als PPAR-Liganden bei Diabetes Mellitus II und Dyslipidämie, sowie dem PCO-Syndrom eingesetzt.^{82,85,86}

Besonders stark sind die Rezeptoren im Fettgewebe und in Reproduktionsorganen exprimiert,⁸⁴ wobei Intensität und Funktion nach Isoform und Gewebeart variieren.⁸⁷ Während PPAR α und γ den Lipid- und Glucosestoffwechsel regulieren und ihre Agonisten gegen Hyperlipidämie und Diabetes Mellitus Typ II eingesetzt werden, wirkt PPAR β zusätzlich antiinflammatorisch und seine Liganden therapeutisch bei metabolischem Syndrom und kardiovaskulären Erkrankungen.⁸⁸

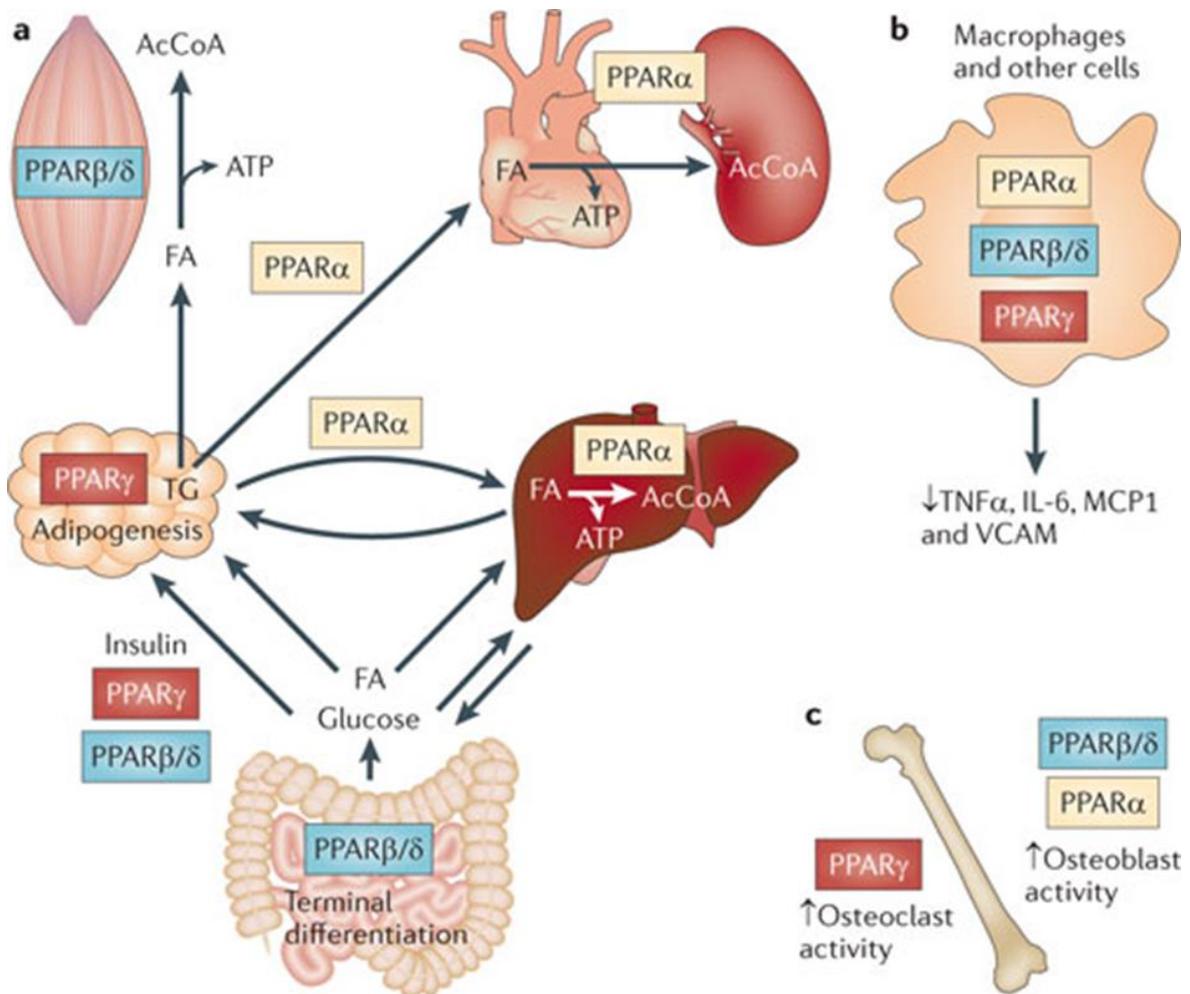


Abbildung 3: Funktion und Vorkommen der PPAR unterscheidet sich nach Isoform⁸⁹

Einen Stellenwert scheint PPAR auch in der Karzinogenese zu haben, indem er Zelldifferenzierung, Apoptose und Proliferation beeinflusst.^{89,90} Am ausführlichsten erforscht ist dabei die Rolle von PPAR γ . Eine tumorprotektive Wirkung wird vor allem für das Kolon-, Mamma-, Prostata- und Lungenkarzinom (rezensiert in ^{89,91}) postuliert. Für das Kolonkarzinom konnte ein Zusammenhang zwischen der PPAR γ -Mehrexpression und längerem Überleben gezeigt werden ⁹² und bei Leukämie und Lymphom stellte sich durch PPAR γ -Liganden eine Zelldifferenzierung und ein Sistieren des Zellwachstums ein.^{85,93} Für das Mammakarzinom konnte sogar gezeigt werden, dass PPAR γ die Transkription des Tumorsuppressors BRCA1 induziert.⁹⁴

Auch im Ovar sind alle 3 Isoformen des PPAR exprimiert,^{86,95} wobei PPAR δ etwa im endometrioiden Ovarialkarzinom deutlich stärker exprimiert ist.⁹⁶ PPAR γ ist im malignen Gewebe im Gegensatz zum gesunden Ovarialgewebe, benignen und Borderlinetumoren hochreguliert.⁹⁷ Bedauerlicherweise ist die Studienlage zum Stellenwert des PPAR γ im Ovarialkarzinom nicht konklusiv. In Übereinstimmung mit anderen Tumoren wird in einigen Publikationen von einer tumorprotektiven Wirkung des PPAR γ berichtet: Neben der Inhibition des Tumorwachstums durch den Rezeptoragonisten Ciglitazone⁹⁸ konnte außerdem ein Überlebensnachteil von Mäusen mit heterozygotem Verlust von PPAR γ (+/-) gegenüber dem gesunden Wildtyp (+/+) gezeigt werden.⁸³ Dem gegenüber wird in einer Studie eine erhöhte Rezeptorexpression mit schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie und kürzerem Überleben assoziiert.⁹⁹

1.2.4. Vitamin D Rezeptor (VitDR)

Vitamin D (damit ist meist Vitamin D2 und D3 gemeint) kann in der Haut durch UVB-Exposition produziert werden oder dem Körper aus Nahrung, wie Fisch (vor allem Lachs, Sardinen, Makrelen) und Milchprodukten, zugeführt werden. In Niere und Leber wird es anschließend zum biologisch aktiven 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D3 aktiviert,¹⁰⁰ welches an den Vitamin D Rezeptor bindet. Der Komplex dimerisiert anschließend mit RXR, transloziert in den Kern und bindet an Vitamin D responsive Elemente der DNA in Promotorregionen von Genen, etwa für epitheliale Kalziumkanäle.^{101,102} Insgesamt kann VDR an 2776 Stellen der DNA binden und die Transkription 229 unterschiedlicher Gene beeinflussen.¹⁰³ Im Darm führt dies zur

Absorption von Kalzium und Phosphat, im Knochen werden die Osteoklasten zur Mobilisierung von Kalzium und Phosphat aktiviert¹⁰⁰ und in der Niere kommt es zur Rückresorption von Kalzium. Zusätzlich wird die Expression des Kalziumbindenden Proteins Kalbindin induziert.¹⁰² Bei Abfall des Kalziumspiegels greift das parathyroide Hormon (PTH) regulatorisch ein, indem es die Kalziumrückresorption im proximalen und distalen Tubulus der Niere erhöht und jene von Phosphat erniedrigt. Am Knochen wirkt PTH synergistisch mit Vitamin D.¹⁰⁰

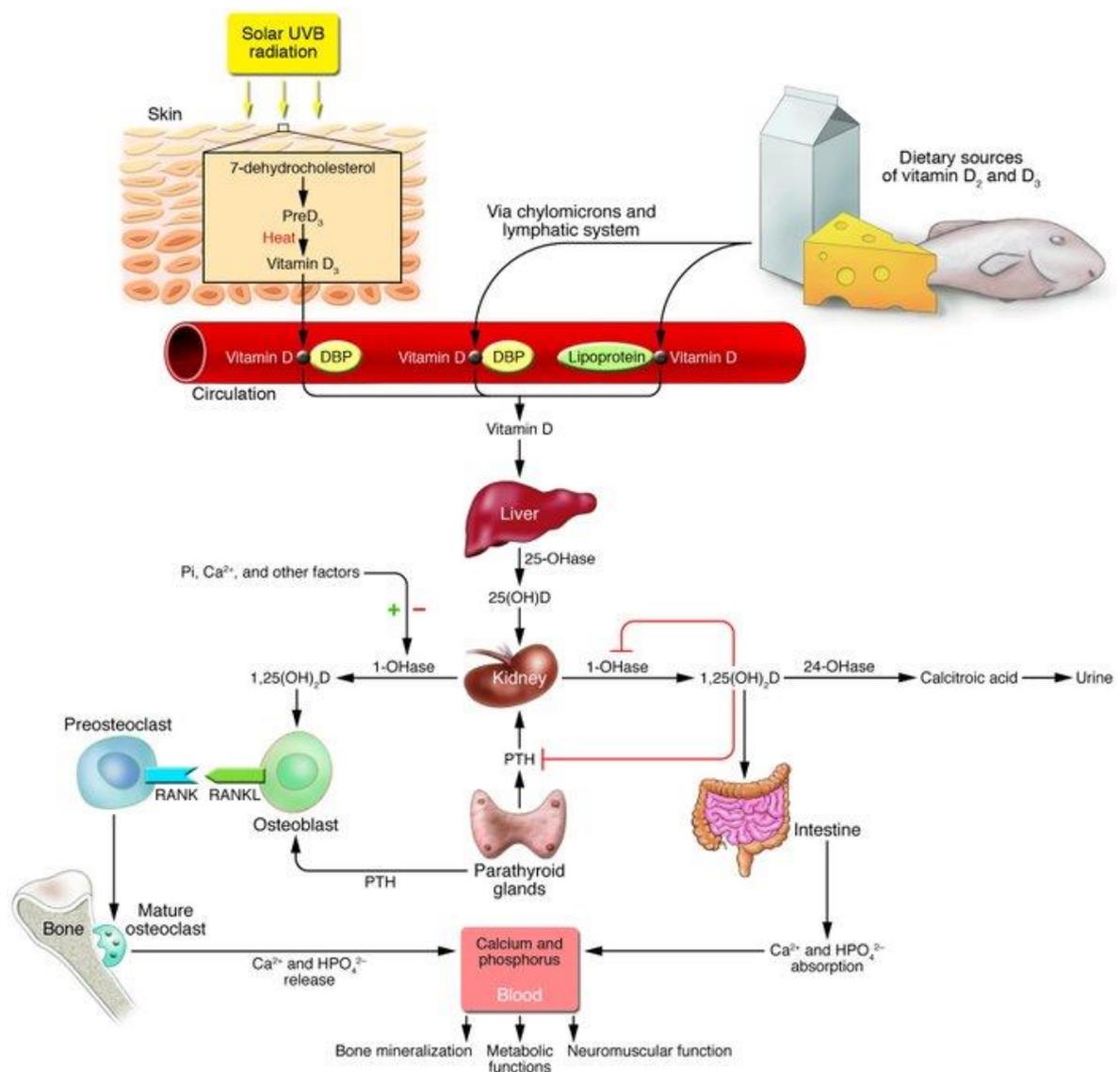


Abbildung 4: Stoffwechsel und Funktion von Vitamin D¹⁰⁰

Der Vitamin D Rezeptor konnte inzwischen in mindestens 30 verschiedenen Geweben wie Knochen, Niere, Blut, Mamma, Prostata, Darm, aktivierten B und T Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen werden. Außer im Kalziumhaushalt

und Knochenstoffwechsel spielt das Hormon zudem eine Rolle bei Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Immunantwort.¹⁰⁴ Die VitDR-Loci liegen zumeist in der Nähe autoimmun- oder karzinomassoziierter Gene.¹⁰³ Vitamin D wirkt antiproliferativ, antiangiogenetisch, antiinflammatorisch und induziert Zelldifferenzierung und Apoptose, indem es einen Zellzyklusarrest, sowie verschiedene Signalwege (wie den hedgehog, IGF1F-3 und TGF- β Signalweg) induziert. Zusätzlich wirkt Vitamin D DNA-unabhängig, was Gegenstand aktueller Forschungen ist.¹⁰⁵

Eine protektive Wirkung von Sonnenlicht ist gegenüber klassischen Vitamin D Mangelkrankungen, wie Rachitis, Osteoporose und Osteomalazie beschrieben, aber auch gegenüber insgesamt 16 Karzinomen und vielen anderen chronischen Erkrankungen, wie Psoriasis und Diabetes Mellitus.¹⁰⁶

Vitamin D soll vor allem bei einem Blutspiegel von über 40ng/ml vor dem Kolon-, Rektum und Mammakarzinom schützen. Eine Sensitivität gegenüber Vitamin D zeigt sich außerdem bei Karzinomen der Blase, des Gehirns, des Ösophagus, der Gallenblase, der Niere, der Lunge, des Pankreas, der Prostata, des Magens und sogar des Ovars. Ein erhöhter Vitamin D Spiegel im Blut korreliert mit generell besserem Tumorüberleben.¹⁰⁷

Im Rahmen der Karginogenese des Mammakarzinoms wird die Transkription des VitDR-Gens unterdrückt.¹⁰⁸ In Übereinstimmung damit beschreiben andere Studien eine Korrelation zwischen Rezeptorstatus und längerem rezidivfreien Überleben und Survival.¹⁰⁹

Für das Ovarialkarzinom existieren wenige immunhistochemische Publikationen innerhalb kleiner Kollektive^{110–113}, von denen nur Silvagno¹¹³ einen möglichen Zusammenhang mit klinischen Parametern erforschte. Seine Ergebnisse und auch die Daten aus Literaturstudien deuten überraschenderweise auf eine untergeordnete Rolle des VitDR-Rezeptors in der Kanzerogenese und Prognose des Ovarialkarzinoms hin.^{114,115}

2. Fragestellung

Ziel dieser Forschungsarbeit ist die Expression verschiedener nukleärer Rezeptoren im Ovarialkarzinom zu analysieren: Zu Thyroidrezeptoren existiert bisher erst eine Abhandlung innerhalb eines kleinen Kollektivs.⁴⁶ Auch die im Ovarialkarzinom vorkommenden Retinoidrezeptoren sind bislang lückenhaft erforscht.⁷¹ Hier wird ausschließlich die Expression des RXR α analysiert, zum einen weil er durch seine Rolle als Heterodimerisationspartner mit vielen anderen Rezeptoren interagiert,¹¹⁶ zum anderen weil er als Prognosefaktor im Mammakarzinom gilt.¹¹⁷

Von den PPAR-Rezeptoren ist Isotyp- γ am ausgiebigsten erforscht, allerdings ist sein Stellenwert in der Kanzerogenese weiterhin unklar.^{83,98,99} Auch zur Expression des Vitamin D Rezeptors existieren mehrere Studien.^{110,113}

Dank des uns zu Verfügung stehenden großen Patientenkollektivs erhoffen wir uns repräsentative Ergebnisse und Antworten auf über die Existenz der Kernrezeptoren hinausgehende Fragestellungen.

Aufgrund von Hinweisen auf eine zusätzliche zytoplasmatische Expression der nukleären Rezeptoren,^{46,118,119} wird ihr Vorkommen in Kern und Zytoplasma analysiert. Außerdem wird die Kernexpression mit morphologischen Kriterien, wie histopathologischem Subtyp, Grading und Staging verglichen. Nicht zuletzt sollen die vorliegenden Daten Erkenntnisse über den Einfluss nukleärer Rezeptoren auf Gesamtüberleben bzw. rezidivfreies Überleben ermöglichen.

3. Patienten und Methoden

3.1. Patientenkollektiv

Es wurden Gewebeproben von 156 Patientinnen analysiert, die zwischen 1990 und 2002 an der Frauenklinik Maistraße aufgrund eines Ovarialtumors operiert wurden. Die Begutachtung der Gewebeproben erfolgte durch das Pathologische Institut der LMU München.

Im vorliegenden Kollektiv gehören 110 Ovarialkarzinome dem serösen Subtyp, 21 Tumoren dem endometrioiden Subtyp, sowie jeweils 12 Biopsien dem muzinösen und klarzelligem Subtyp an. Ein 13. muzinöser Fall ist den aktuellen Färbungen nicht mehr zugänglich, bleibt aber als Korrelationsfall vorhanden.

Patientinnen mit Ovarialkarzinom		156	
Alter bei Diagnosestellung		58 (18-88)	
Histologie (%)	serös	70,5	
	endometrioid	13,5	
	muzinös	8,3	
	klarzellig	7,7	
Tumorgrading (%)	gut differenziert (G1)	24,4	
	mäßig differenziert (G2)	34	
	schlecht differenziert (G3)	34	
Tumorstadium (FIGO) (%)	I	22,4	
	II	6,4	
	III	66	
	IV	1,9	
Rezeptorexpression (%) 1. Spalte: Nukleär 2. Spalte: Zytoplasmatisch	THR α 2 positiv	96	8
	THR α 1 positiv	81	34
	THR α 1/2 positiv	70	37
	THR β 1 positiv	36	77
	THR β positiv	63	41
	RXR α positiv	77	16
	PPAR γ positiv	18	82
	VitDR positiv	84	88

Tabelle 2: Patientenkollektiv. vgl. ^{120,121}

38 Karzinome konnten einem gut differenzierten G1 Tumor zugeordnet werden, je 53 einem G2 bzw. G3 Tumor. Für 12 Tumore liegt kein Grading vor. Im Hinblick auf das Staging befanden sich 35 Patientinnen im Stadium I der FIGO-Klassifikation, 10 im FIGO Stadium II, 103 im FIGO Stadium III, sowie 3 im FIGO Stadium IV. 5 Patientinnen wurden keinem Stadium zugeordnet.

104 Patientinnen verstarben im Laufe des Follow-Ups. Seröse Ovarialkarzinome zeigen mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 6 Jahren (+/- 0,6) die schlechteste Prognose, gefolgt von den klarzelligen (7,9 +/- 2,3 Jahre) und endometrioiden (8,1 +/- 1,5 Jahre) Subtypen. Mit durchschnittlich 11,7 Jahren (+/- 2,2) überleben Patientinnen mit muzinösen Ovarialkarzinomen am längsten, das Überleben des Gesamtkollektiv beträgt 7,2 Jahre (+/-0,6).

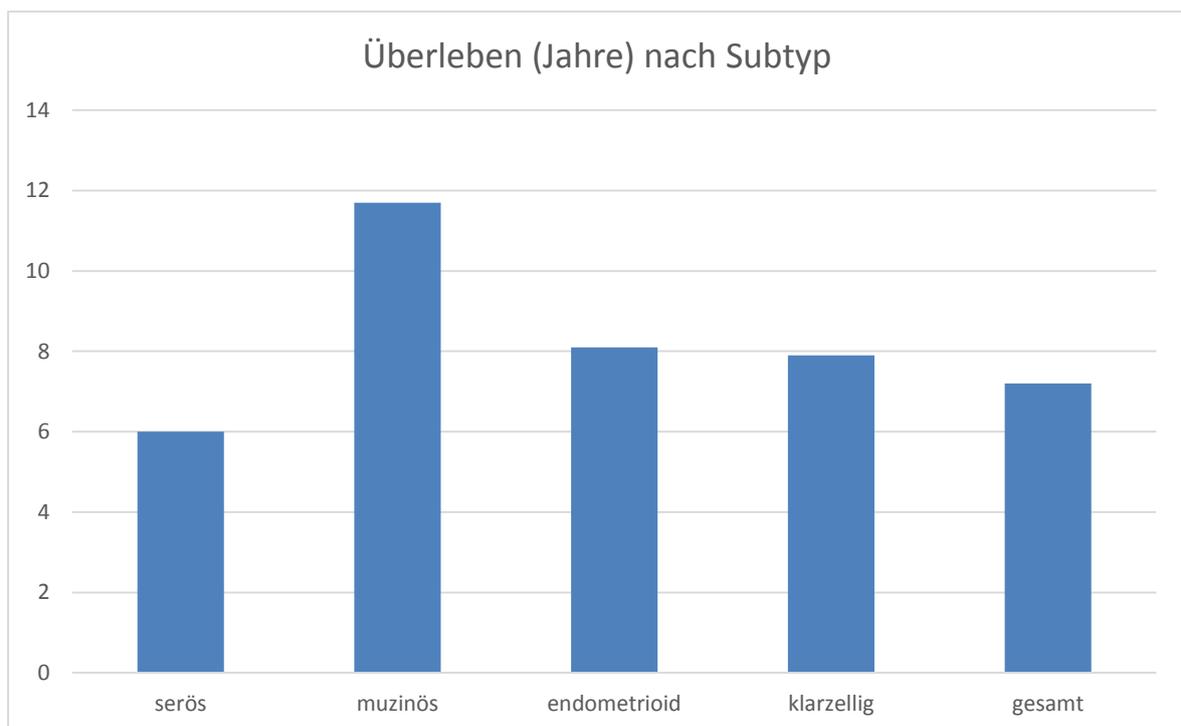


Abbildung 5: Überleben nach Subtyp

Das längste Überleben mit tödlichem Ausgang betrug 16,6 Jahre bei einer Patientin mit muzinösem Ovarialkarzinom, das längste Überleben ohne Tod oder Rezidiv im Laufe des Follow-Up beträgt 19,2 Jahre bei einer Patientin mit klarzelligem Ovarialkarzinom- bei beiden Patientinnen wurde ein G1 Tumor in Stadium I

diagnostiziert. Das kürzeste Überleben betrug 2 Monate bei einer Patientin mit einem serösen G2 Tumor im Stadium III.

28 Patientinnen erlitten ein Rezidiv. Die 20 betroffenen Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom lebten nach einem Rezidiv durchschnittlich weitere 1,6 Jahre und verstarben insgesamt 4,1 Jahre nach Diagnosestellung und somit 1,9 Jahre früher als entsprechende Patientinnen ohne Rezidiv. Nach einem Rezidiv des endometrioiden Ovarialkarzinoms verstarben die 5 betroffenen Patientinnen nach durchschnittlich 3,7 Jahren und damit 7,3 Jahre nach Diagnosestellung. Von einem Rezidiv des klarzelligen Ovarialkarzinoms waren zwei Patientinnen betroffen, von einem Rezidiv des muzinösen Ovarialkarzinoms eine Patientin.

3.2. Immunhistochemie

3.2.1. Allgemeines zu Antikörpern

Antikörper werden von B-Lymphozyten und Plasmazellen gebildet, bestehen aus zwei H(heavy)- und zwei L(light)- Ketten und lassen sich in 2 Fab (antigenbindend) Fragmente und 1 Fc (konstant) Fragment unterteilen. Zur Diagnostik werden meist Antikörper des IgG Subtyps verwendet, seltener Antikörper des IgM Subtyps, weshalb die meisten Detektionssysteme ausschließlich IgG beinhalten.

3.2.2. Verwendete Antikörper

RXR α (*Perseus Proteomics, Klon K8508, Detektionssystem: Vecastatin Elite Mouse-IgG-Kit*): Monoklonaler IgG2a Antikörper aus der Mausmilz, vermehrt in Mausaszites, gereinigt, als Lympholisat verkauft, Aufbewahrung als Lympholisat/ nach Rekonstitution bei –20 Grad oder 4 Grad

VitDR (*Serotec, Klon 2F4, Detektionssystem: Vecastatin Elite Mouse-IgG-Kit*): Monoklonaler IgG2a Antikörper aus der Mausmilz, affinitätschromatographisch gereinigt, flüssig verkauft, Aufbewahrung bei –20 Grad

PPAR γ (*Abcam, Detektionssystem: Vecastatin Elite Rabbit-IgG-Kit*): Polyklonaler IgG Antikörper aus Kaninchen, affinitätschromatographisch gereinigt, flüssig verkauft, Aufbewahrung als Aliquot bei –20 Grad, bei 4 Grad 1-2 Wochen haltbar

THR α 1/2 (*Abcam, Detektionssystem: Vecastatin Elite Rabbit-IgG-Kit*): Polyklonaler IgG Antikörper aus Kaninchen, affinitätschromatographisch gereinigt, flüssig verkauft, Aufbewahrung bei 4 Grad

THR α 1 (*Abcam, Detektionssystem ZytoChem Plus HRP Polymer System Mouse/Rabbit*): Polyklonaler IgG Antikörper aus Kaninchen, affinitätschromatographisch gereinigt, flüssig verkauft, Aufbewahrung bei -20 Grad

THR α 2 (*Serotec, Klon 1330, Detektionssystem: ZytoChem Plus HRP Polymer System Mouse/Rabbit*): Monoklonaler IgG1 Antikörper aus der Maus, vermehrt in Mausaszites, affinitätschromatographisch gereinigt, flüssig verkauft, Aufbewahrung bei 4 Grad oder -20 Grad

THR β 1 (*Zyted, Detektionssystem: ZytoChem Plus HRP Polymer System Mouse/Rabbit*): Polyklonaler IgG Antikörper aus Kaninchen, affinitätschromatographisch gereinigt, flüssig verkauft, Aufbewahrung bei -20 Grad

THR β (*Upstate cell signalling solutions, Detektionssystem: ZytoChem Plus HRP Polymer System Mouse/Rabbit*): Polyklonaler IgG Antikörper aus Kaninchen, affinitätschromatographisch gereinigt, flüssig verkauft, Aufbewahrung bei 4 Grad

3.2.3. Detektionssysteme

Antigen-Antikörperbindungen werden sichtbar gemacht, indem am Ort der Bindung eine enzymatisch herbeigeführte Farbreaktion stattfindet. Zur Verstärkung des Farbsignals sind oft mehrere Brückenantikörper zwischengeschaltet. Zur Detektion der Antikörper wurden die ABC Methode, sowie die Polymer Methode angewandt.

ABC Methode (Avidin-Biotin-Complex)

Die ABC Methode wurde für die Antikörper gegen RXR α (mouse), VitDR (mouse), PPAR γ (rabbit) und THR α 1/2 (rabbit) angewandt.

Ein Primärantikörper bindet an das Antigen, an den Primärantikörper wiederum bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper. Dieser Brückenantikörper wird auch als Multi-Link-Antikörper bezeichnet, da in der Lösung Antikörper verschiedener Tiere, zum Beispiel Kaninchen *und* Maus, enthalten sind, mit dem Vorteil, dass die Gefahr den zum Primärantikörper nicht kompatiblen Sekundärantikörper zu benutzen, gesenkt wird.

Über das gekoppelte Biotin bindet an den Sekundärantikörper Avidin, ein Glykoproteintetramer (68kDa), das ursprünglich aus Hühnereiweiß gewonnen wurde, inzwischen aber unter dem Namen Streptavidin gentechnisch reiner aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* hergestellt wird. Als Tetramer hat Avidin vier

Bindungsstellen für das wasserlösliche Vitamin H Biotin. Im ABC Reagenz ist Avidin, Biotin und Peroxidase enthalten. An bis zu drei von vier Bindungsstellen des Avidin ist Biotin gebunden, eine dieser drei Bindungen kann auf den biotinylierten Antikörper entfallen, zwei oder drei Bindungen werden mit dem ebenfalls exogen zugegebenen biotinylierten Enzym Peroxidase eingegangen, die vierte Bindungsstelle bleibt frei.

Die ABC Methode ist sehr spezifisch, allerdings kann endogenes Biotin unspezifische zytoplasmatische Hintergrundfärbungen verursachen. Endogen kommt Biotin als prosthetische Gruppe am Zitratzyklusenzym Pyruvat-Carboxylase vor. Besonders intensiv färben sich Gewebe mit hoher Stoffwechsellleistung und vielen Mitochondrien, wie Leber und Niere, an.¹²² Endogene Biotinreaktionen können mittels Blockiermedien reduziert werden, erfolgsversprechender ist mitunter die Anwendung einer anderen Methode, etwa der HRP Methode (siehe unten). Für die vorliegenden Färbungen wurde kein Biotinblock angewandt, bei Hintergrundreaktionen wurde auf die HRP-Polymer Methode ausgewichen.

Ablauf:

1. 3 Minuten Power Block
2. 1-24 Stunden Primärantikörper
3. 30 Minuten biotinylierter Brückenantikörper
4. 30 Minuten ABC (=Avidin mit biotinylierter Peroxidase)

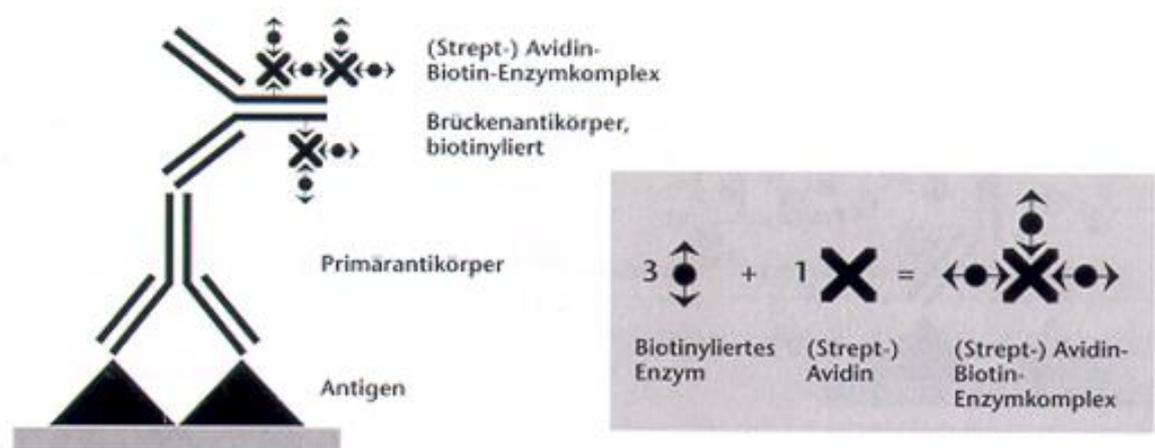


Abbildung 6: ABC-Methode ¹²³

HRP-Polymer Methode (Horse-Raddish-Peroxidase)

Die HRP-Polymer Methode wurde für die Antikörper gegen $THR\alpha1$, $THR\alpha2$, $THR\beta$ und $THR\beta1$ angewandt.

Das Besondere an der HRP-Polymer Methode ist, dass sie Biotin-frei abläuft. An ein Enzym-Polymer sind Sekundärantikörper und das Enzym HRP kovalent gebunden.

Nach der üblichen Vorbehandlung (siehe unten) und der Inkubation mit einem Blockiermedium (mitgelieferte Blocking Solution oder Power Block) zur Unterdrückung unspezifischer hydrophober Bindungen von Primär- und Sekundärantikörpern aufgrund von elektrostatischen Ladungen, erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper. Anschließend wird das Post Block Reagenz, bestehend aus Rabbit-anti-Mouse-Antikörpern, aufgetragen. Stammt der Primärantikörper vom Kaninchen, kann auf das Post Block Reagenz verzichtet werden. Schließlich wird das Polymer mit den daran gekoppelten anti-Rabbit-Fab Fragmenten und Peroxidasen zugegeben.

Ablauf:

1. 5 Minuten Blocking Solution (oder alternativ 3 Minuten Power Block bei $THR\beta$)
2. 1 Stunde Primärantikörper
3. 20 Minuten Post Block Reagenz (Sekundärantikörper)
4. 30 Minuten HRP-Polymer

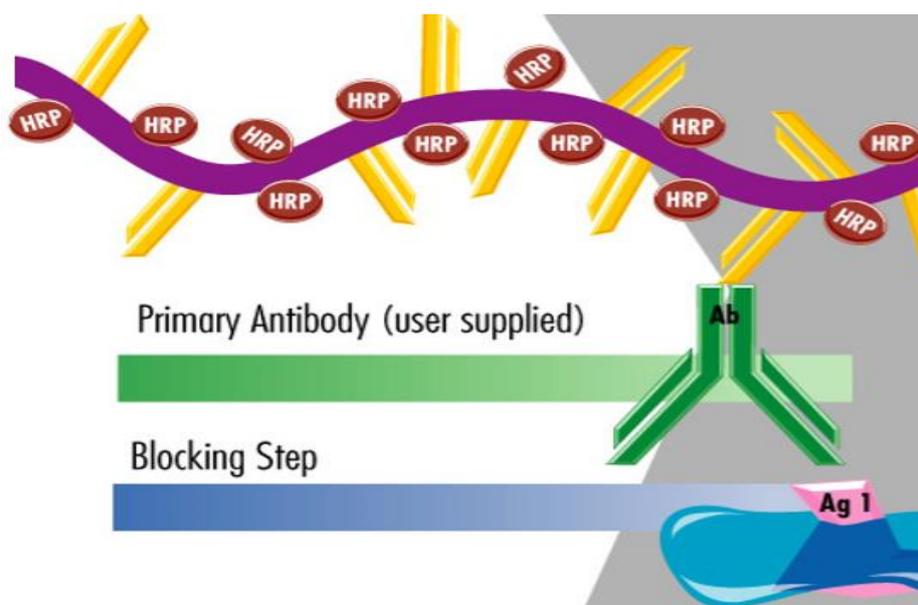


Abbildung 7: HRP-Polymer-Methode ¹²⁴

3.2.4. Spezielles Vorgehen in der Immunhistochemie

Vorbereitung der Gewebeprobe

1. Formalin: Das ovarielle Gewebe wird den Patientinnen entnommen und sofort in 4%igem Formalin fixiert.

2. Einbettung in Paraffin

3. Objektträger: Mittels Mikrotom werden 2-3 μ m-dünne Schnitte angefertigt.

4. Xylol: Die vorbereiteten Schnittpräparate werden mindestens 20 Minuten in Xylol entparaffiniert.

5. Wasserstoffperoxid: Um eine ungewünschte Hintergrundreaktion zu verhindern wird die Reaktion vorab durch übermäßige Zugabe des Katalysators Wasserstoffperoxid gestartet, was die endogenen Peroxidasen verbraucht.

6. Absteigende Alkoholreihe: Anschließend werden die Schnittpräparate in einer absteigenden Alkoholreihe aus 100%igem, 70%igem und 50%igem Alkohol sowie destilliertem Wasser rehydriert.

7. Hitzeinduzierte Antigendemaskierung: Zur Auflösung der durch die Formalinfixierung entstandenen Aldehydvernetzungen werden die Schnittpräparate sieben Minuten im Dampfdruckkochtopf in Natrium-Citratpuffer (pH 6,0) gekocht. Hiernach sind die Antigenstrukturen freigelegt und einer Antigen-Antikörperbindung und damit einer Färbung zugänglich.

8. Blockiermedium: Da Antikörper auch unspezifisch durch elektrostatische Ladungen an Membranen und Fettgewebe binden können und so eine störende Hintergrundfärbung entstehen würde, werden die Schnittpräparate mit einem Blockiermedium inkubiert.

9. Primärantikörper: Die Präparate wurden mit einer Ausnahme eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Antikörpern inkubiert. Einzig der PPAR γ benötigt für die Antigen-Antikörperbindung 16 Stunden und vier Grad Celsius.

10. Sekundärantikörper: Nach Bindung der Primärantikörper werden die Sekundärantikörper im Überschuss zugegeben.

11. Detektionskit: Nun werden die Schnittpräparate mit den Komplexen, sei es ABC Reagenz oder HRP Polymer, inkubiert. Um die Enzymreaktion der im Komplex enthaltenen Meerrettichperoxidase zu starten, ist die abschließende Zugabe eines Chromogens nötig.

12. DAB: 3,3 Diaminobenzidin (DAB) wird als Substrat der Peroxidase unter Zugabe des Katalysators Wasserstoffperoxid und eines Puffers zu einem braunen Farbprodukt umgesetzt.

12. Gegenfärbung: Die Gegenfärbung erfolgt mit einer sauren Lösung (pH 4,5) aus Hämalaun nach Mayer.

13. Aufsteigende Alkoholreihe: Damit die Schnitte anschließend mit dem hydrophoben Eindeckmedium „Eukitt“ bedeckt werden können, müssen die gefärbten Präparate zuvor zur Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe aus 70%, 96% und absolutem Alkohol gezogen und anschließend zur Aufhellung in Xylol gewaschen werden.

14. Eindecken: Nach erfolgter Entwässerung werden die Schnittpräparate luftdicht mit dem hydrophoben Klebstoff „Eukitt“ unter einem Deckgläschen eingeschlossen.

Positivkontrolle

Folgende Positivkontrollen wurden für die einzelnen Antikörper verwendet:

RXR α : Plazenta 44 (1. Trimenon)

VitDR: Plazenta 4 (reife Plazenta)

PPAR γ : Plazenta 4 (reife Plazenta)

THR α 1/2: Struma

THR α 1: Colon

THR α 2 MaCa 3 (Mammakarzinom)

THR β : Plazenta 44 (1. Trimenon)

THR β 1: MaCa 151/94 (Mammakarzinom)

3.3. Mikroskopische Auswertung mit dem IRS-Score

Die mikroskopische Auswertung basiert auf dem Immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele¹²⁵, wonach die Intensität der Färbung und die Anzahl gefärbter Zellen miteinander multipliziert wird. Die Färbeintensität wird mit 0-3 Punkten gemäß keiner, geringer, mäßiger und starker Anfärbung beschrieben. Sind 1-10% der Zellen gefärbt, wird 1 Punkt vergeben, bei 10-50% gefärbten Zellen 2 Punkte, bei 50-80% 3 Punkte und bei über 80% 4 Punkte.

Bei einem IRS von 0-1 ist die Färbung als negativ zu werten, ab einem IRS von 2 liegt eine positive Färbung vor.¹²⁶ Bei 2-4 Punkten spricht man von einer

mittelgradigen Expression, ab 6 Punkten von einer starken Expression der Kernrezeptoren.

Die Auswertung erfolgte mit einem Leitz Mikroskop (Wetzlar, Germany). Zur Fotodokumentation diente eine CCD Farbkamera (JVC, Victor Company of Japan, Japan).

3.4. Statistische Analyse mit SPSS

Die gewonnen Daten wurden mit der SPSS Version 20 analysiert.

Die Subtypen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert, Grading und Staging mit dem Mann-Whitney-U-Test. Beide Tests sind nichtparametrische Tests, im Falle des Kruskal-Wallis-Tests für eine unabhängige Stichprobe/Variable, im Falle des Mann-Whitney-U-Tests für 2 unabhängige Stichproben. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman.

Mittels Kaplan-Meier Überlebenskurven wurde analysiert, ob die Rezeptorexpression einen Einfluss auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben hat. Die Überlebensdaten wurden mittels COX-Regression geprüft.

Werte unter 0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet, Werte unter 0.01 als statistisch hochsignifikant.

3.5. Index ausgewählter verwendeter Materialien

Kochpuffer zur Hitzeinduzierten Antigendemaskierung:

0,1M Zitronensäure (Merck Nr 244)

0,1M Na-Zitrat (Merck Nr 6448)

Verdünnungsmedien:

Dako-Verdünnungsmedium (Nr. S3022) für Verdünnung des THR β 1 und PPAR γ
PowerBlock (BioGenex Nr.HK0851008, 10fach Konzentrat)

Antikörper:

RXR α : Perseus Proteomics, Klon K8508, Konzentration 1mg/ml, Bestellnummer PPMX K8508-10

VitaminD: Serotec, Klon 2F4, Konzentration: 0,5mg/ml, Bestellnummer MCA3543Z

PPAR γ : Abcam, Konzentration: 0,2mg/ml, Bestellnummer: ab27649-100

THR α 1/2: Abcam, Konzentration 0,2mg/ml, Bestellnummer: ab15543

THR α 1: Abcam, Konzentration 1mg/ml, Bestellnummer: ab53729

THR α 2: Serotec, Klon 1330, Konzentration: 0,5mg/ml, Bestellnummer: MCA2842

THR β : Zytomed, Konzentration: 0,2mg/ml, Bestellnummer: 520-4074

THR β 1: Upstate cell signalling solutions, Konzentration 250 μ g/250 μ l, Bestellnummer 06-539

Detektionssysteme:

Vecastatin Elite Rabbit-IgG-Kit (Linaris Nr PK-6101)

Vecastatin Elite Mouse-IgG-Kit (Linaris Nr PK-6102)

ZytoChem Plus HRP Polymer System Mouse/Rabbit (Zytomed Nr POLHRP-100)

Chromogen-Substrat-Lösung:

Liquid DAB + Substrate Chromogen System (Dako Nr K3468)

4. Ergebnisse

4.1. THR α 2

Von 154 untersuchten Ovarialkarzinomen wird THR α 2 von 146 Tumoren intranukleär exprimiert, davon in 38 mittelgradig und in 108 Tumoren hoch. In nur 12 untersuchten Ovarialkarzinomen kommt der Rezeptor zytoplasmatisch vor, davon in 9 Tumoren mittelgradig, sowie in 3 Karzinomen hoch exprimiert.

THR α 2 ist in G1-Tumoren im Vergleich zu G2 Tumoren intranukleär signifikant stärker exprimiert ($p=0.05$). Bei gesonderter Betrachtung des serösen Subtyps zeigt sich intrazellulär sogar eine hochsignifikante THR α 2-Überexpression in G1-Tumoren ($p=0.00$) sowohl im Vergleich zu G2 als auch zu G3 Tumoren.

THR α 2-Expression im Zytoplasma verkürzt das Überleben ($p=0.00$). Dieser Zusammenhang erweist sich auch in der multivariaten Analyse als hochsignifikant ($p=0.00$). Das Mortalitätsrisiko ist demnach bei zytoplasmatischer THR α 2-Expression bis zu 5,38-fach erhöht.

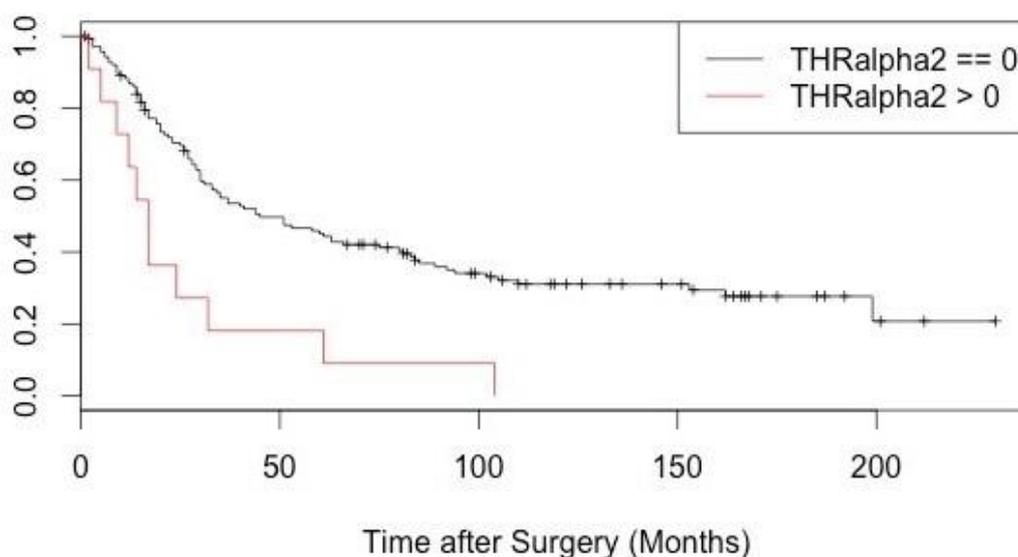


Abbildung 8: THR α 2-Expression im Zytoplasma verkürzt das Überleben ($p=0.00$)

Bei gesonderter Betrachtung seröser Ovarialkarzinome zeigt sich außerdem, dass Patientinnen mit einer THRA2-Expression im Zellkern über IRS 4 signifikant länger überleben ($p=0.01$) als Patientinnen mit einer geringeren Rezeptorexpression.

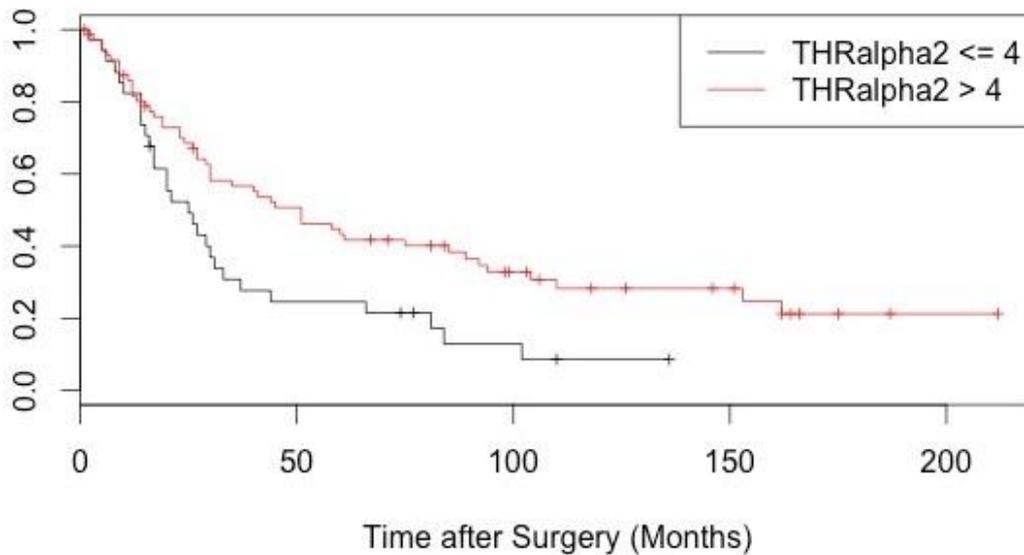


Abbildung 9: THRA2-Expression im Zellkern seröser Ovarialkarzinome verlängert das Überleben ($p=0.01$)

Eine zytoplasmatische Expression von THRA2 bewirkt wie im Gesamtkollektiv auch im serösen Ovarialkarzinoms eine Verkürzung des Überlebens ($p=0.00$).

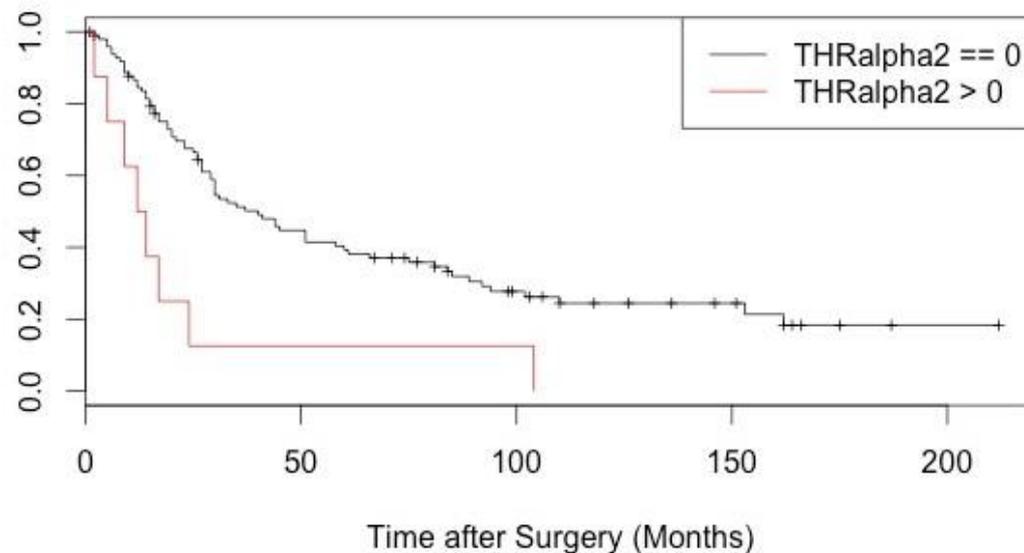


Abbildung 10: THRA2-Expression im Zytoplasma des serösen Ovarialkarzinoms verkürzt das Überleben ($P=0.00$)

Die THRA2-Expression korreliert mit folgenden Hormonrezeptoren:

	FSH	ER α	PRA	GPER	GlycC15	GlycQ13	TA-MUC 1	THRA1/2	THRA1	VDR	RXR α
THRA2	0.19	2.5	0.22	0.25	0.21	0.27	-0.27	0.35	0.21	0.20	0.20
p=	0.02	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01

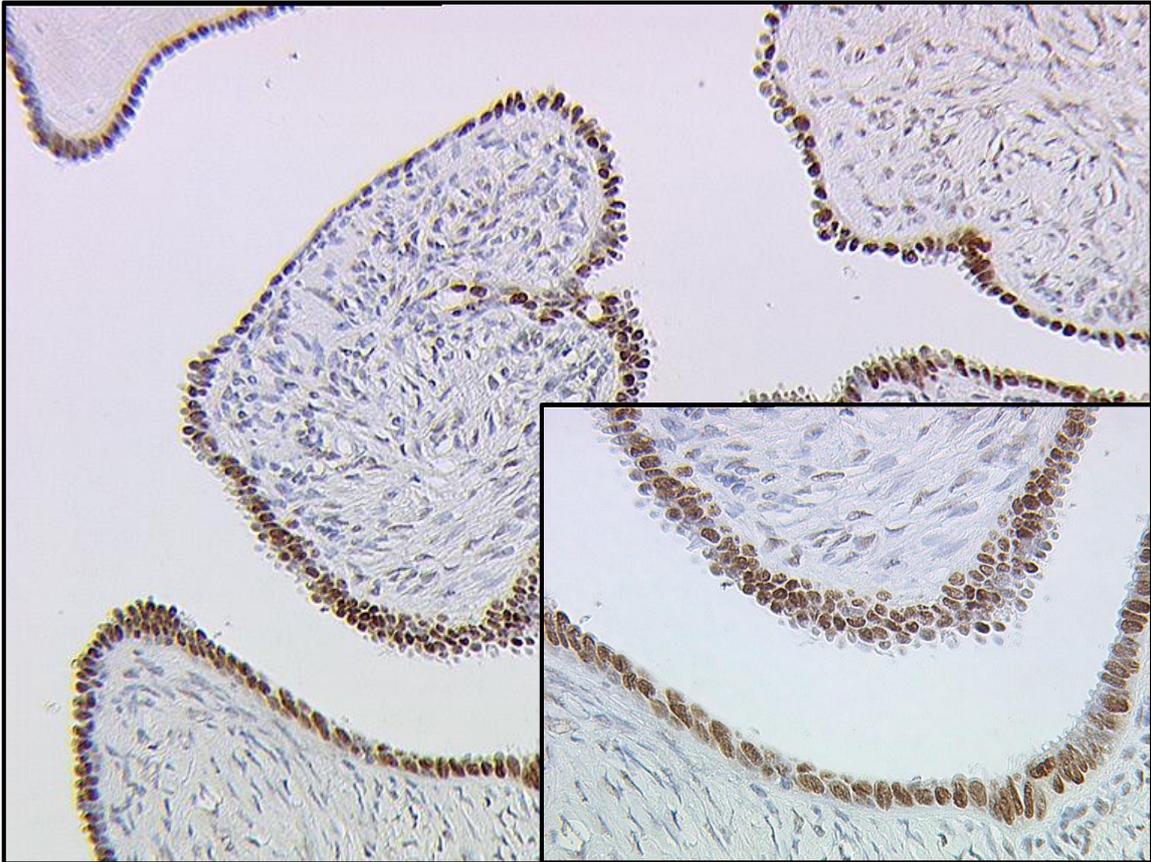


Abbildung 11: THRa2-Expression im serösen Ovarialkarzinom (OvCaS42)

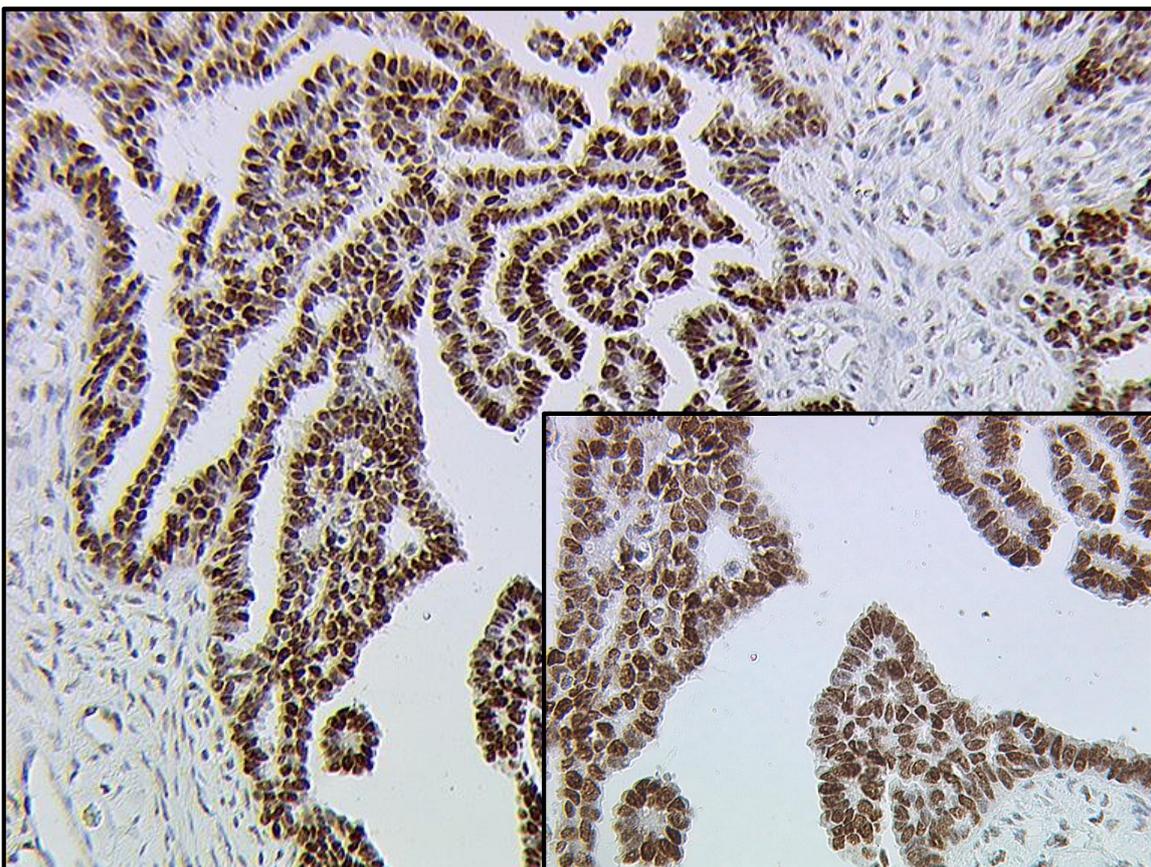


Abbildung 12: THRa2-Expression im serösen Ovarialkarzinom (OvCaS72)

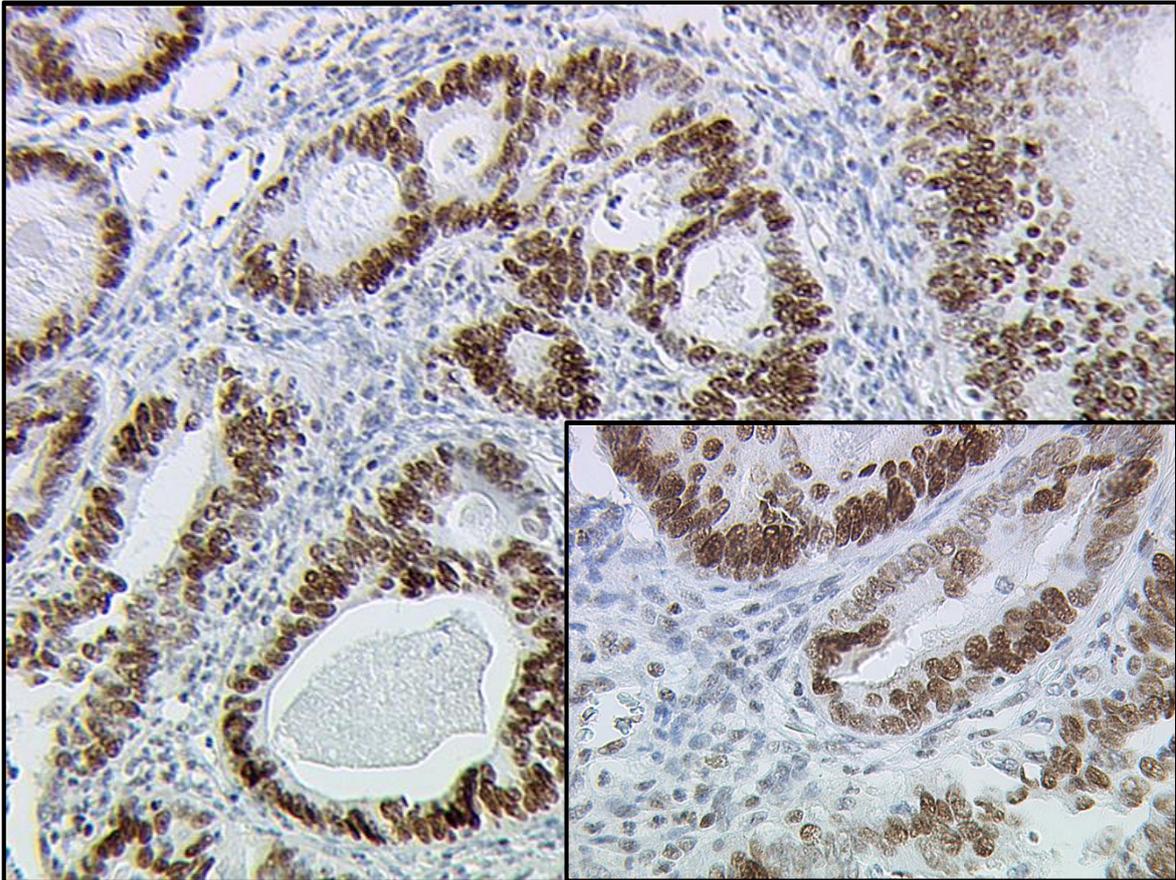


Abbildung 13: THR α 2-Expression im muzinösen Ovarialkarzinom (OvCaM13)

4.2. THR α 1

Von 152 untersuchten Ovarialkarzinomen wird THR α 1 von 123 Tumoren intranukleär exprimiert, davon in 111 mittelgradig und in 12 Tumoren hoch. In 52 untersuchten Ovarialkarzinomen kommt der Rezeptor zytoplasmatisch vor, davon in 51 Tumoren mittelgradig, sowie in einem Karzinom hoch exprimiert.

Die THR α 1-Expression korreliert mit folgenden Hormonrezeptoren:

	VU4H8	THR α 2	THR β	VDR	RXR α
THR α 1	-0.17	2.1	0.40	0.18	0.42
p=	0.05	0.01	0.00	0.03	0.00

4.3. THR α 1/2

Von 154 untersuchten Ovarialkarzinomen wird THR α 1/2 von 107 Tumoren intranukleär exprimiert, davon in 88 mittelgradig und in 19 Tumoren hoch. In 57 untersuchten Ovarialkarzinomen kommt der Rezeptor zytoplasmatisch vor, davon in 43 Tumoren mittelgradig, sowie in 14 Karzinomen hoch exprimiert.

THR α 1/2 wird von muzinösen Ovarialkarzinomen nicht exprimiert (IRS-Mittelwert 1.0), während der Rezeptor im klarzelligen (IRS-Mittelwert 3,33), serösen (IRS-Mittelwert 2,81) und endometrioiden (IRS-Mittelwert 2,43) Ovarialkarzinom mäßig stark exprimiert ist. Dieser subtypspezifischer Expressionsunterschied erweist sich als statistisch hoch signifikant ($p=0.01$).

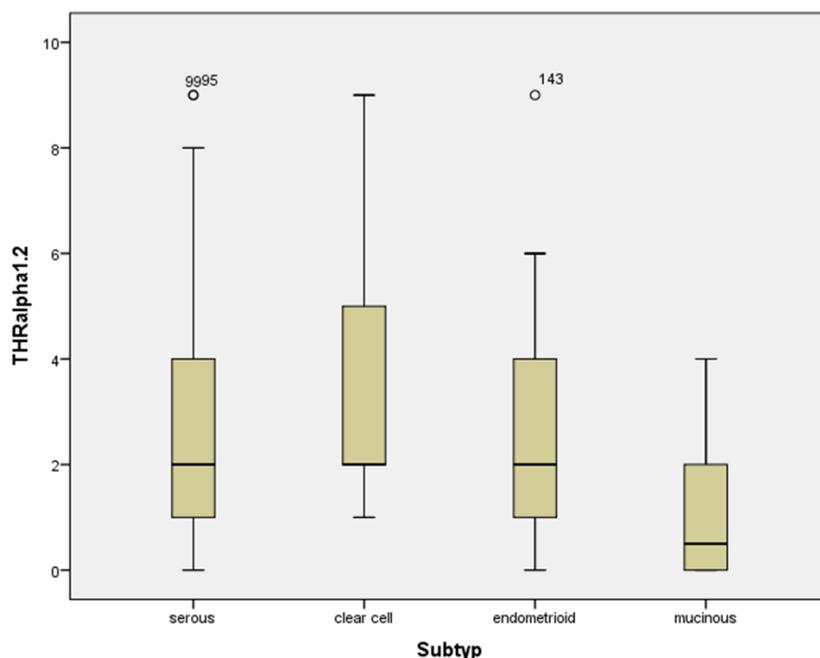


Abbildung 14: THR α 1/2 wird von muzinösen Ovarialkarzinomen nicht exprimiert ($p=0.01$)

THR α 1/2 wird im Stadium I der FIGO-Klassifikation tendenziell stärker exprimiert als im Stadium II. Für das Gesamtkollektiv beträgt der p-Wert hier 0.09, für seröse Ovarialkarzinome 0.06.

Die THR α 1/2-Expression korreliert mit folgenden Hormonrezeptoren:

	FSH	HCG	ER β	PRA	Gal1_Tu	GPER	GlycQ13	TA-MUC1	THR α 2	THR β 1	VDR	PPAR γ
THR α 1/2	0.18	-0.25	0.21	0.17	-0.19	0.22	0.24	0.28	0.35	0.16	0.19	0.17
p=	0.03	0.00	0.01	0.04	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.05	0.02	0.04

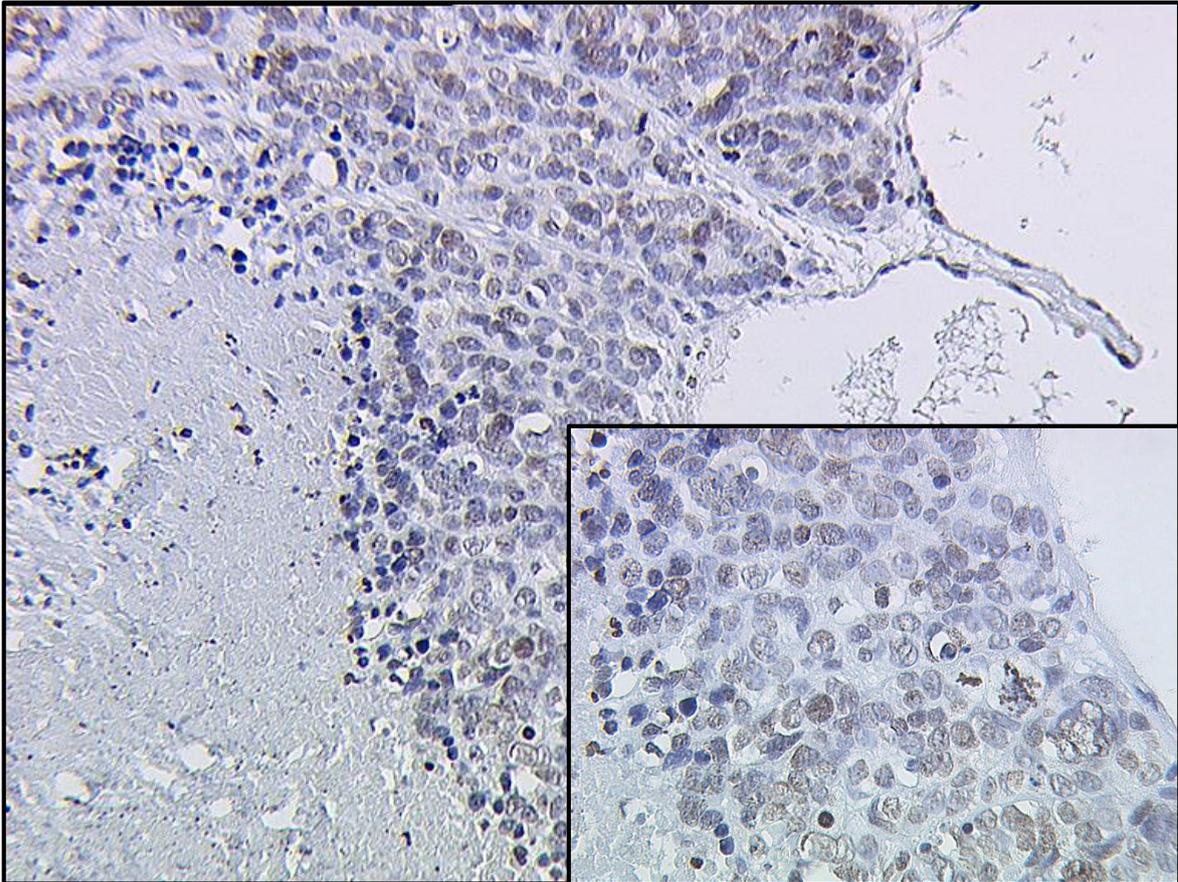


Abbildung 15: THRα1/2-Expression im serösen Ovarialkarzinom (OvCaS37)

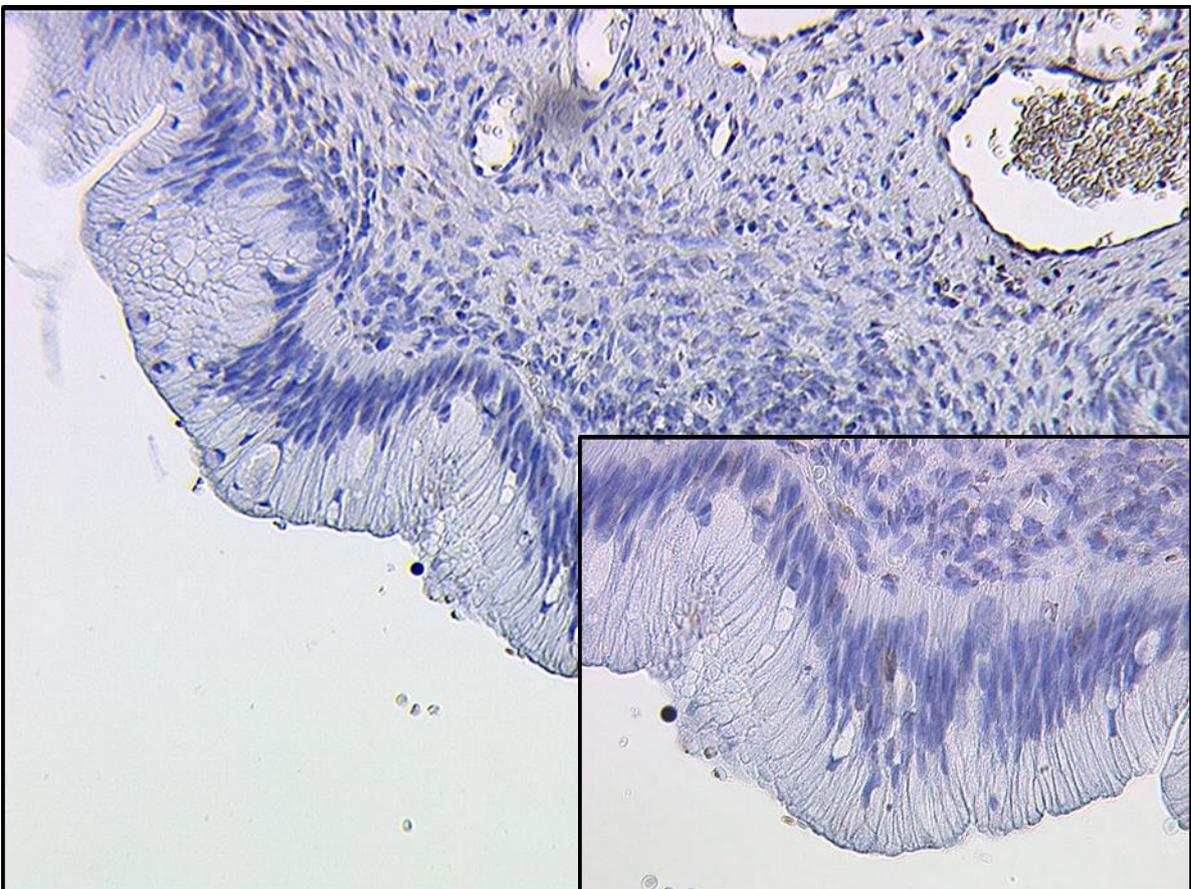


Abbildung 16: THRα1/2-Expression im muzinösen Ovarialkarzinom (OvCaM10)

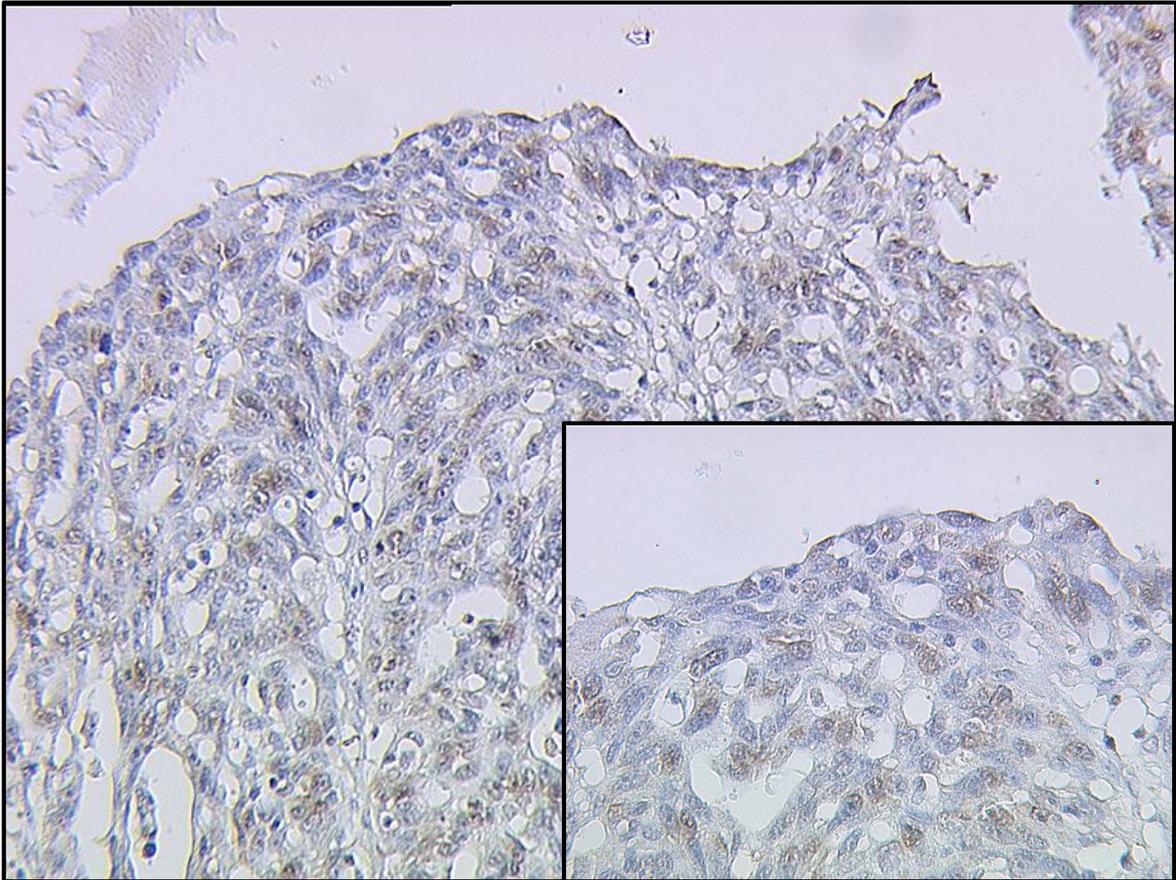


Abbildung 17: THRa1/2-Expression im endometrioiden Ovarialkarzinom (OvCaE9)

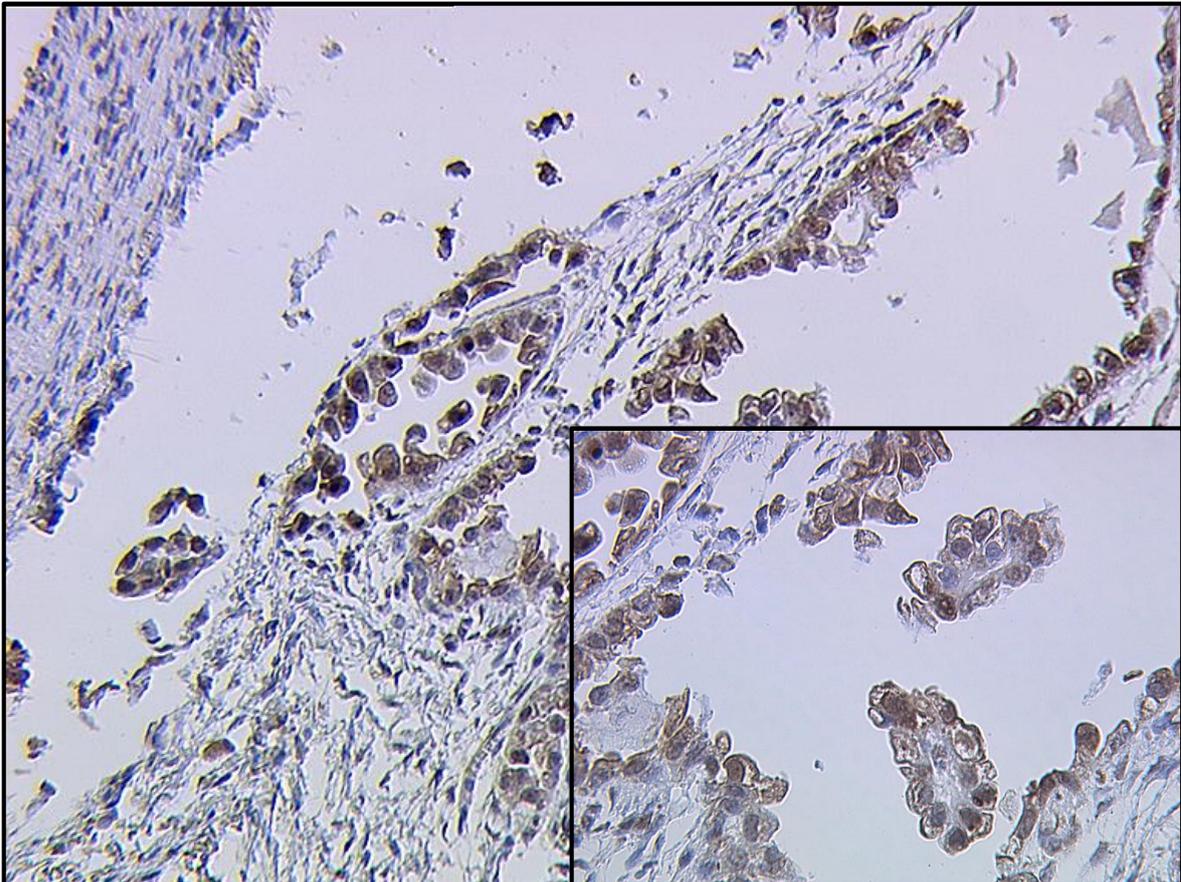


Abbildung 18: THRa1/2-Expression im klarzelligen Ovarialkarzinom (OvCaK5)

4.4. THR β

Von 152 untersuchten Ovarialkarzinomen wird THR β von 96 Tumoren intranukleär exprimiert, davon in 61 mittelgradig und in 35 Tumoren hoch. In 62 untersuchten Ovarialkarzinomen kommt der Rezeptor zytoplasmatisch vor, davon in 47 Tumoren mittelgradig, sowie in 15 Karzinomen hoch exprimiert.

THR β ist im Stadium III der FIGO-Klassifikation im Gesamtkollektiv signifikant stärker exprimiert ($p=0.04$) als im Stadium II.

Wird THR β nicht im Zytoplasma exprimiert, verlängert dies das Überleben ($p=0.03$). Dieser Zusammenhang erweist sich auch in der multivariaten Analyse als signifikant ($p=0.02$). Patientinnen, deren Tumoren THR β im Zytoplasma exprimierten, verstarben im Laufe des Follow-Ups um 2,66-fach häufiger als Patienten ohne einer Expression von THR β .

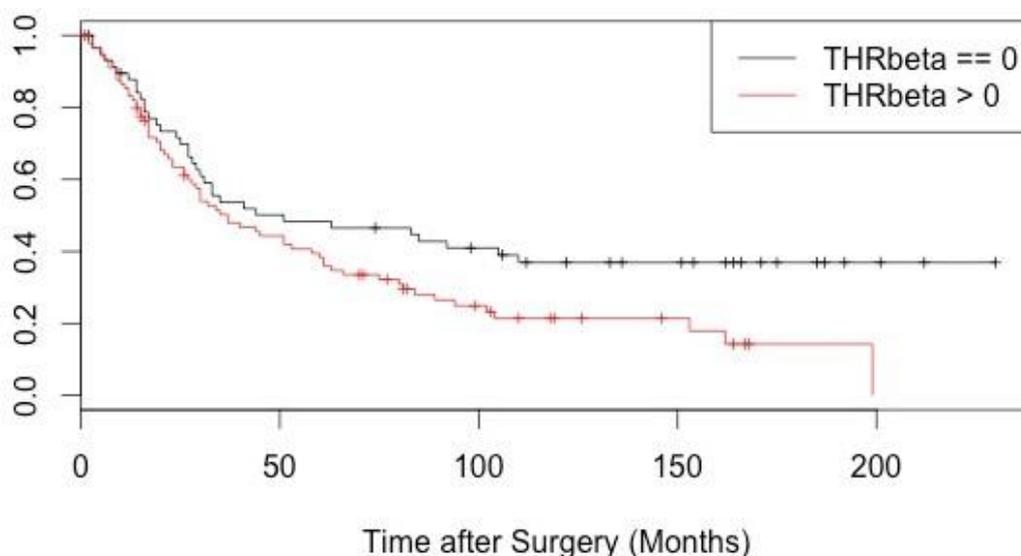


Abbildung 19: THR β -Expression im Zytoplasma verkürzt das Überleben ($p=0.03$)

Die THR β -Expression korreliert mit folgenden Hormonrezeptoren:

	ER β	PRA	Gal3	Gal1_Tu	TF1	Muc_115D8	VU3C6	THR α 1	THR β 1	RXR α
THR β	0.26	0.17	0.20	0.41	0.20	0.30	0.30	0.39	-0.16	0.35
$p=$	0.00	0.04	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00

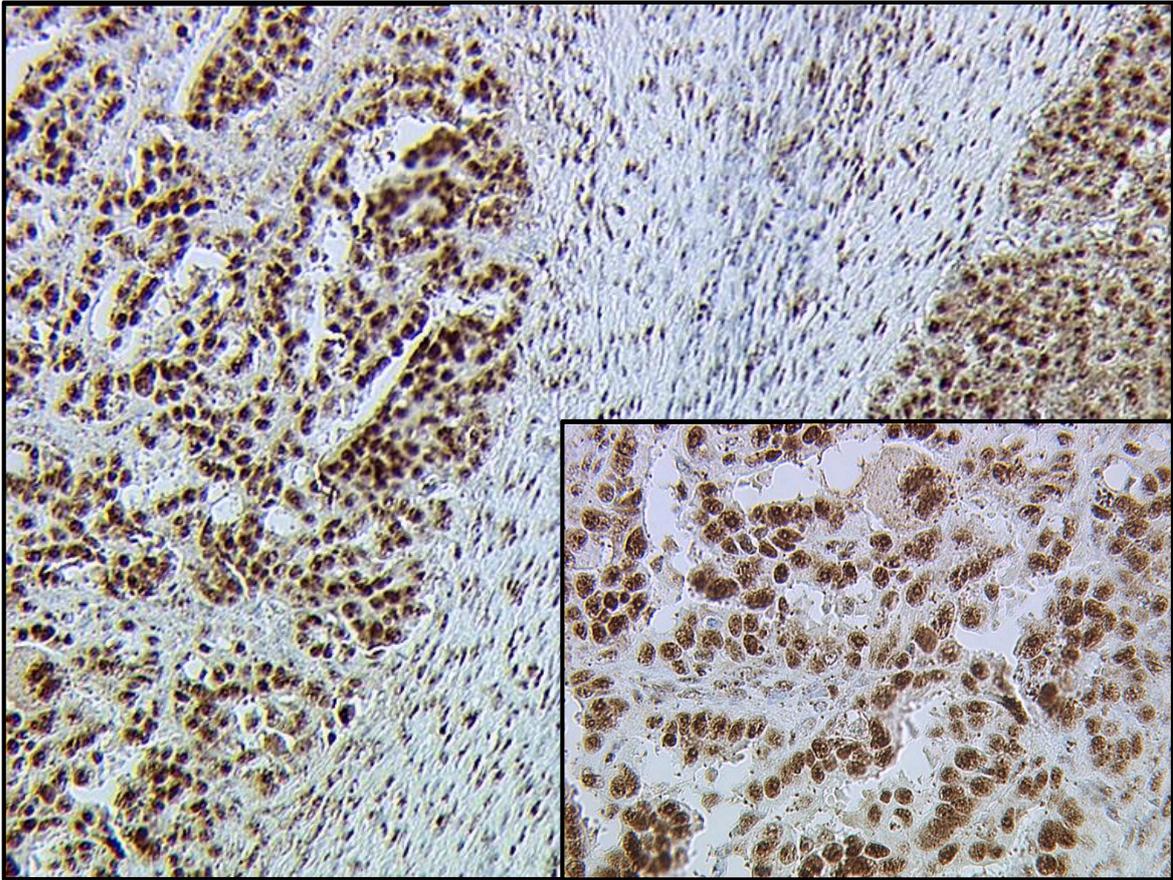


Abbildung 20: THRβ-Expression im serösen Ovarialkarzinom (OvCaS65)

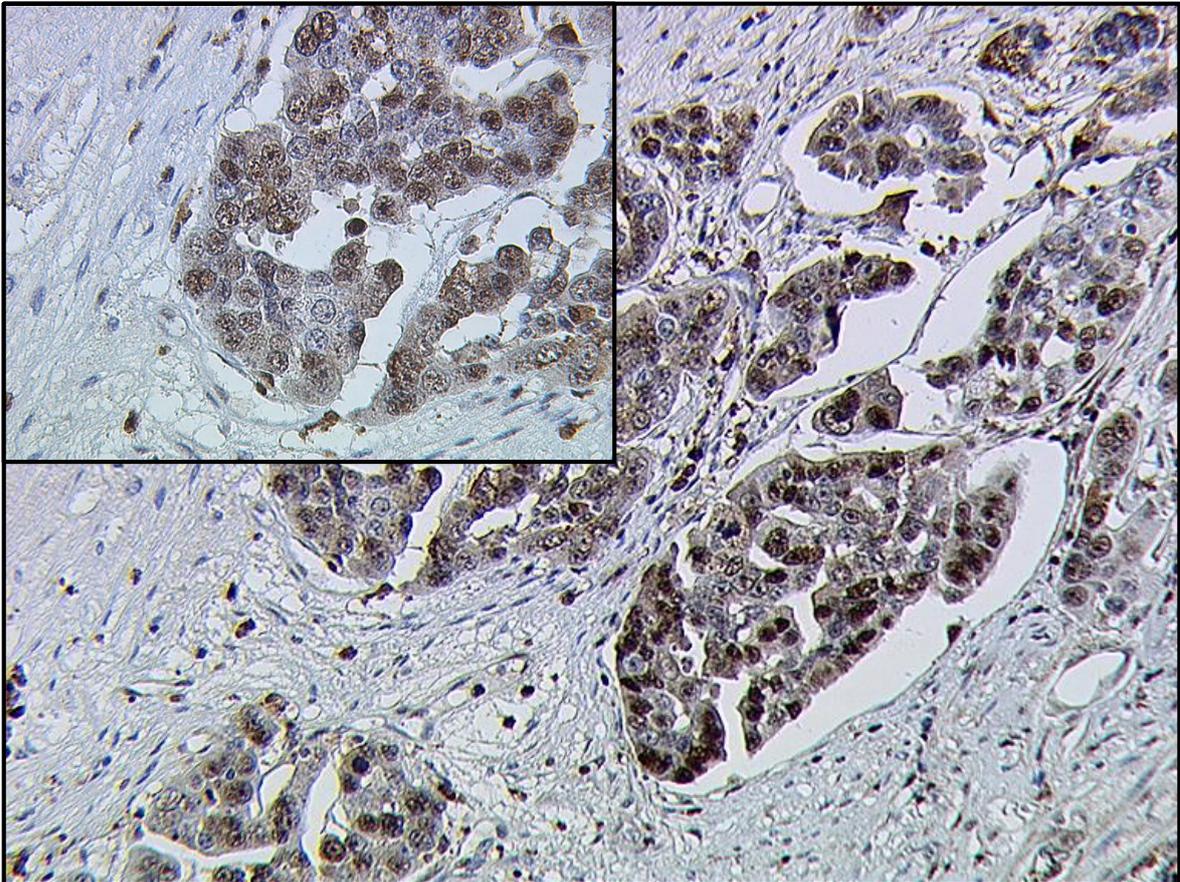


Abbildung 21: THRβ-Expression im endometrioiden Ovarialkarzinom (OvCaE20)

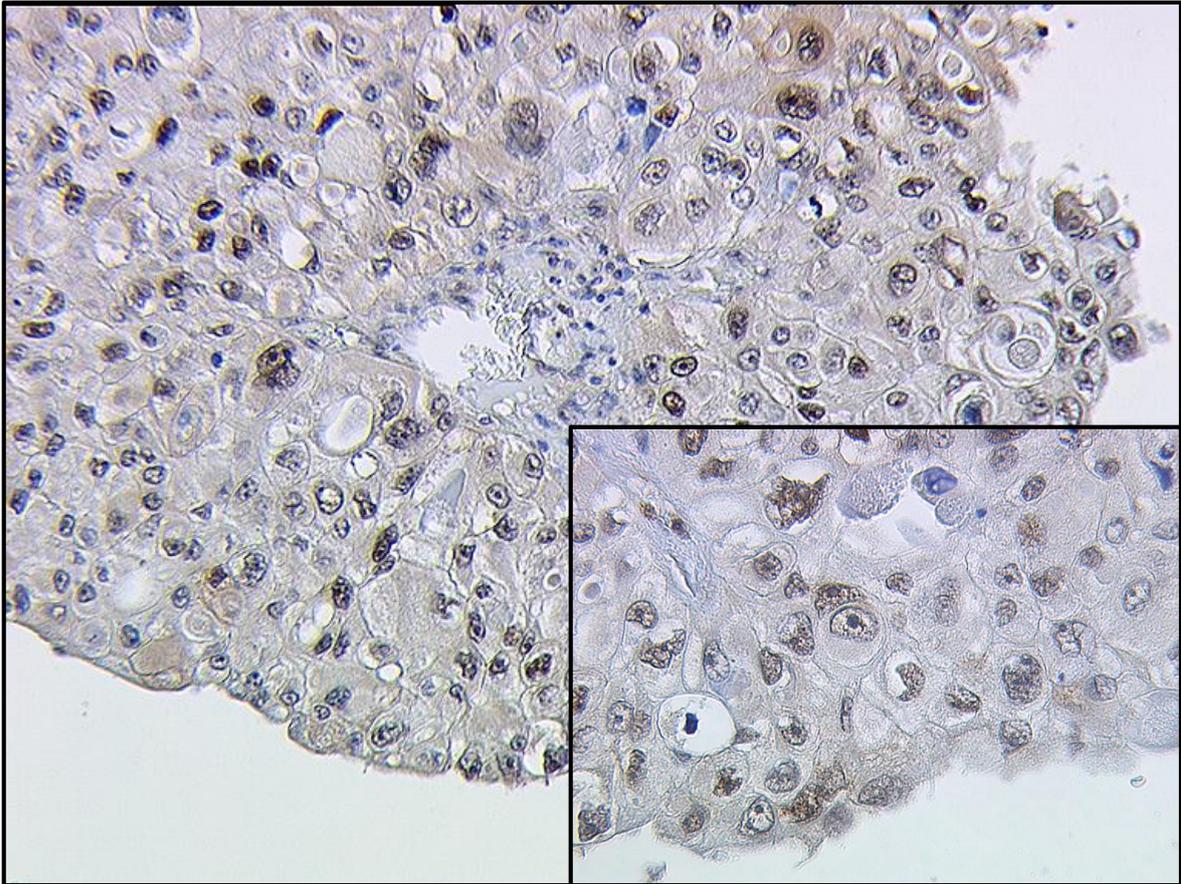


Abbildung 22: THR β -Expression im klarzelligen Ovarialkarzinom (OvCaK11)

4.5. THR β 1

Von 151 untersuchten Ovarialkarzinomen wird THR β 1 von 54 Tumoren intranukleär und dabei ausschließlich mittelgradig exprimiert. In 116 untersuchten Ovarialkarzinomen kommt der Rezeptor zytoplasmatisch vor, davon in 115 Tumoren mittelgradig und nur in einem Karzinom hoch exprimiert.

Nur klarzellige Ovarialkarzinome exprimieren THR β 1 (IRS-Mittelwert 2,08), während die übrigen Subtypen mit IRS-Mittelwerten von 0,88 (serös), 1,29 (endometrioid) und 1,25 (muzinös) hormonrezeptornegativ sind. Dieser subtypspezifische Unterschied bezüglich der nukleären Rezeptorexpression erweist sich statistisch als hochsignifikant ($p=0.00$).

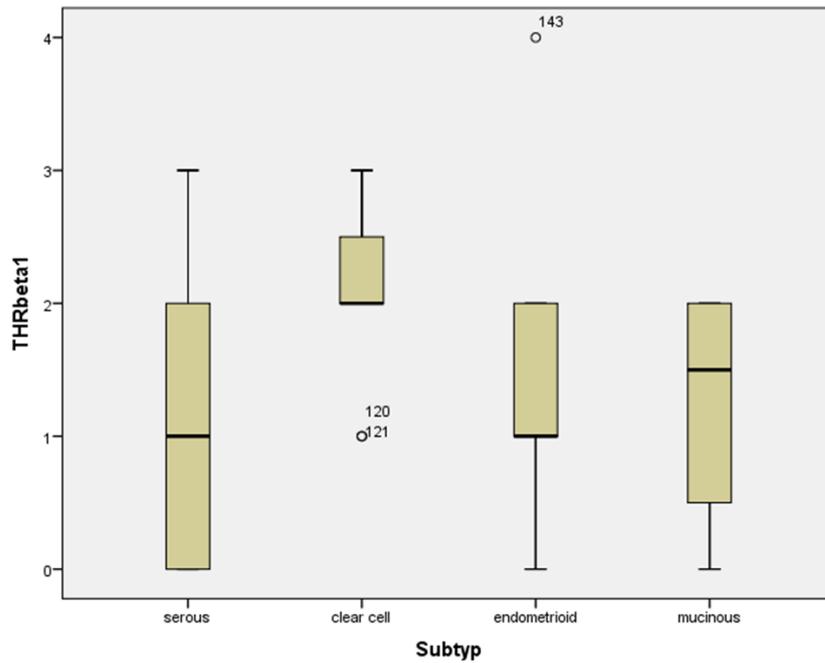


Abbildung 23: Klarzellige Ovarialkarzinome sind als einziger Subtyp *THRβ1* positiv ($p=0.00$)

G1-Tumoren exprimieren *THRβ1* deutlich stärker ($p=0.00$) als weniger differenzierte Gewebe. Dieser Sachverhalt trifft sowohl für das Gesamtkollektiv als auch bei gesonderter Betrachtung des serösen Subtyps zu.

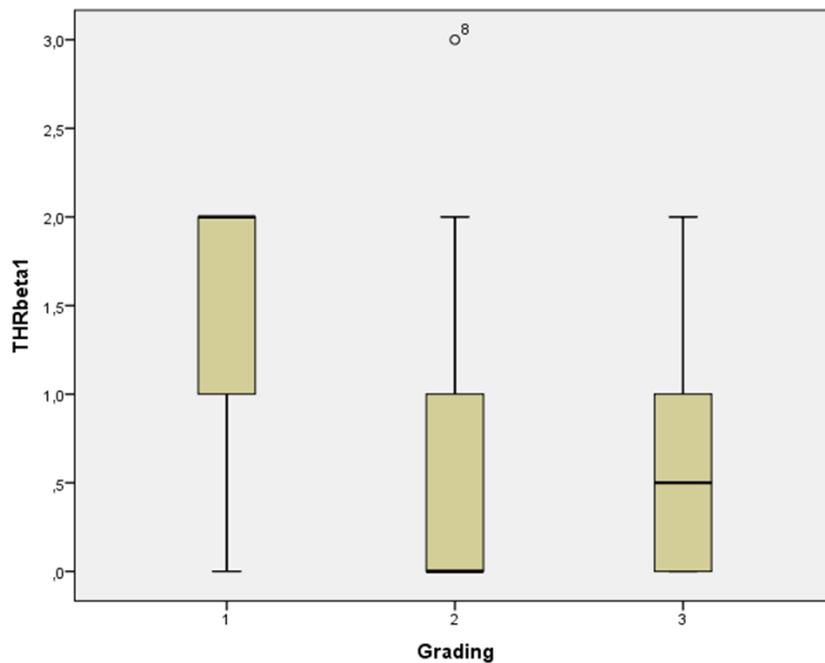


Abbildung 24: Signifikante Überexpression von *THRβ1* in G1-Tumoren des Gesamtkollektivs ($p=0.00$)

Außerdem exprimieren Tumore im Stadium I der FIGO-Klassifikation den THR β 1 deutlich stärker als Tumore im Stadium III ($p=0.02$).

Wird THR β 1 nicht im Zytoplasma exprimiert, verlängert dies das Überleben des Ovarialkarzinoms ($p=0.00$).

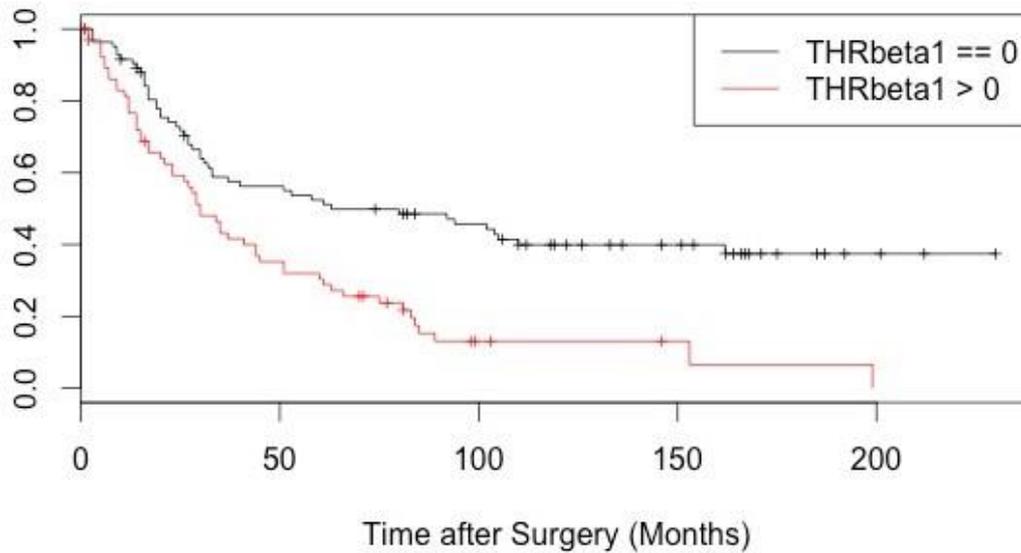


Abbildung 25: THR β 1-Expression im Zytoplasma verkürzt das Überleben ($p=0.00$)

Die THR β 1-Expression korreliert mit folgenden Hormonrezeptoren:

	Gal1_Tu	Gal1_Stroma	THR α 1/2	THR β
THR β 1	-0.27	-0.29	0.16	-0.16
p=	0.00	0.00	0.05	0.05

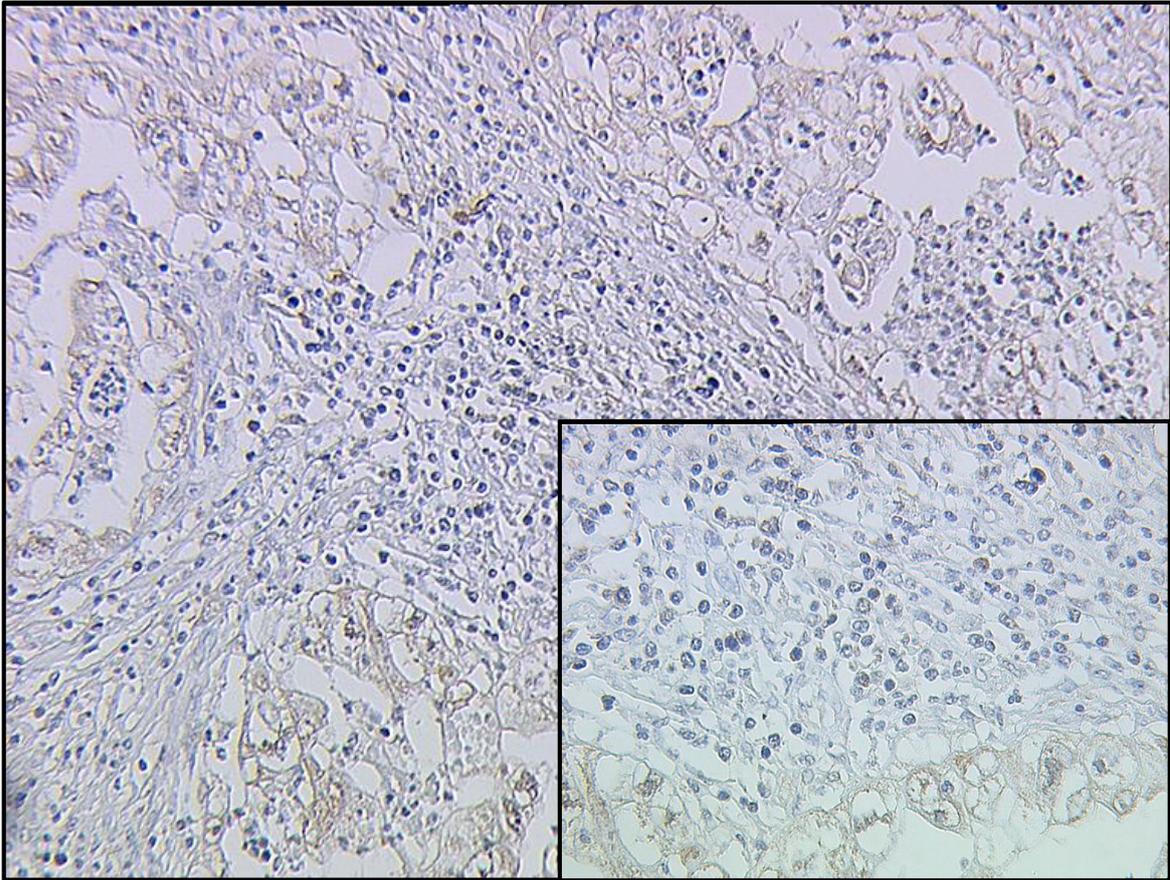


Abbildung 26: THR β 1-Expression im serösen Ovarialkarzinom (OvCa8)

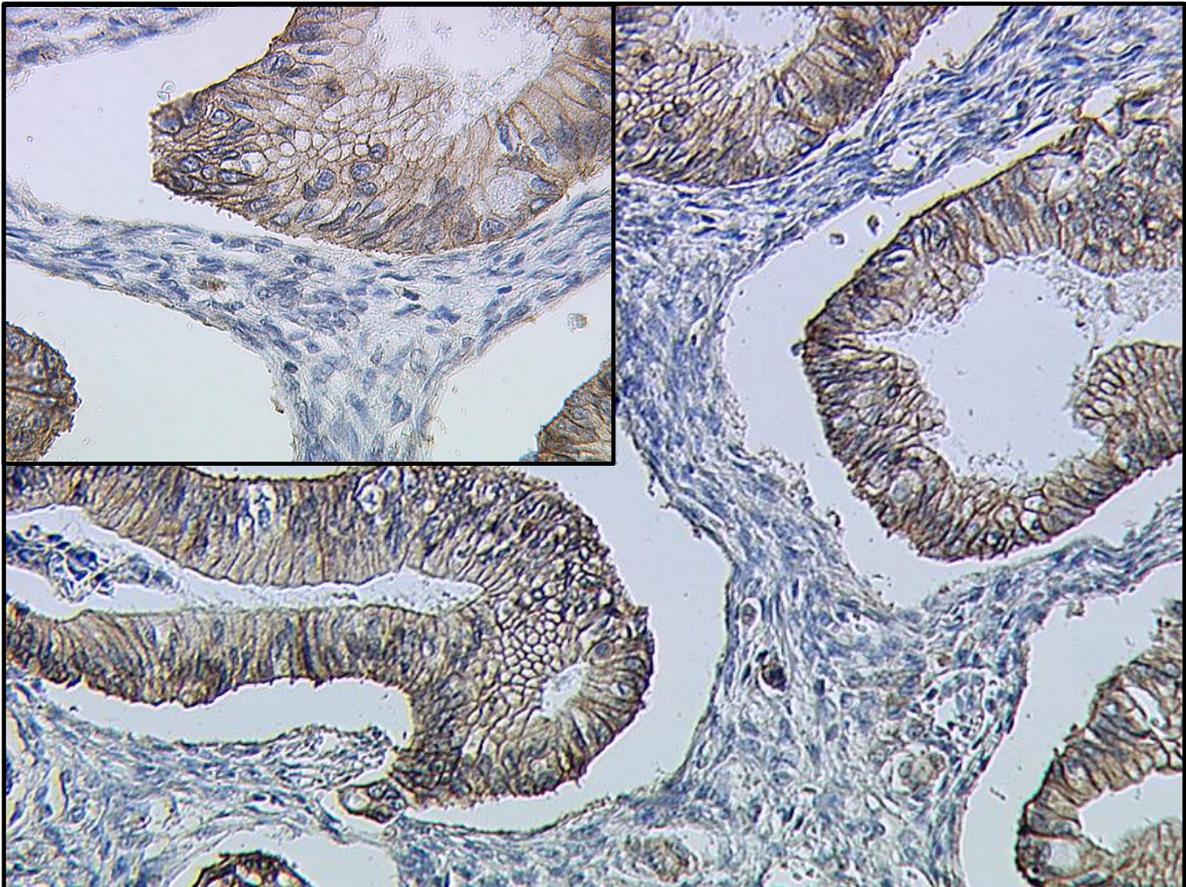


Abbildung 27: THR β 1-Expression im muzinösen Ovarialkarzinom (OvCaM11)

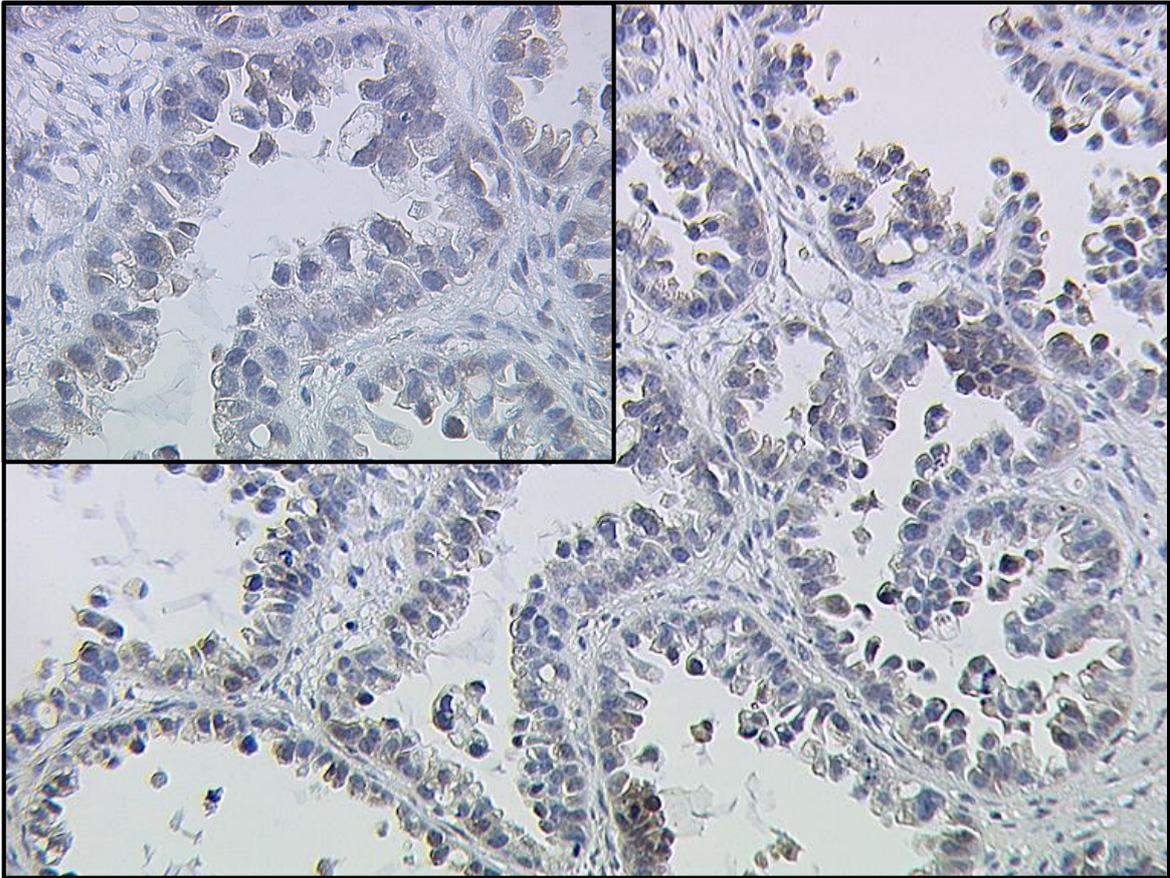


Abbildung 28: THRB1-Expression im endometrioiden Ovarialkarzinom (OvCaE21)

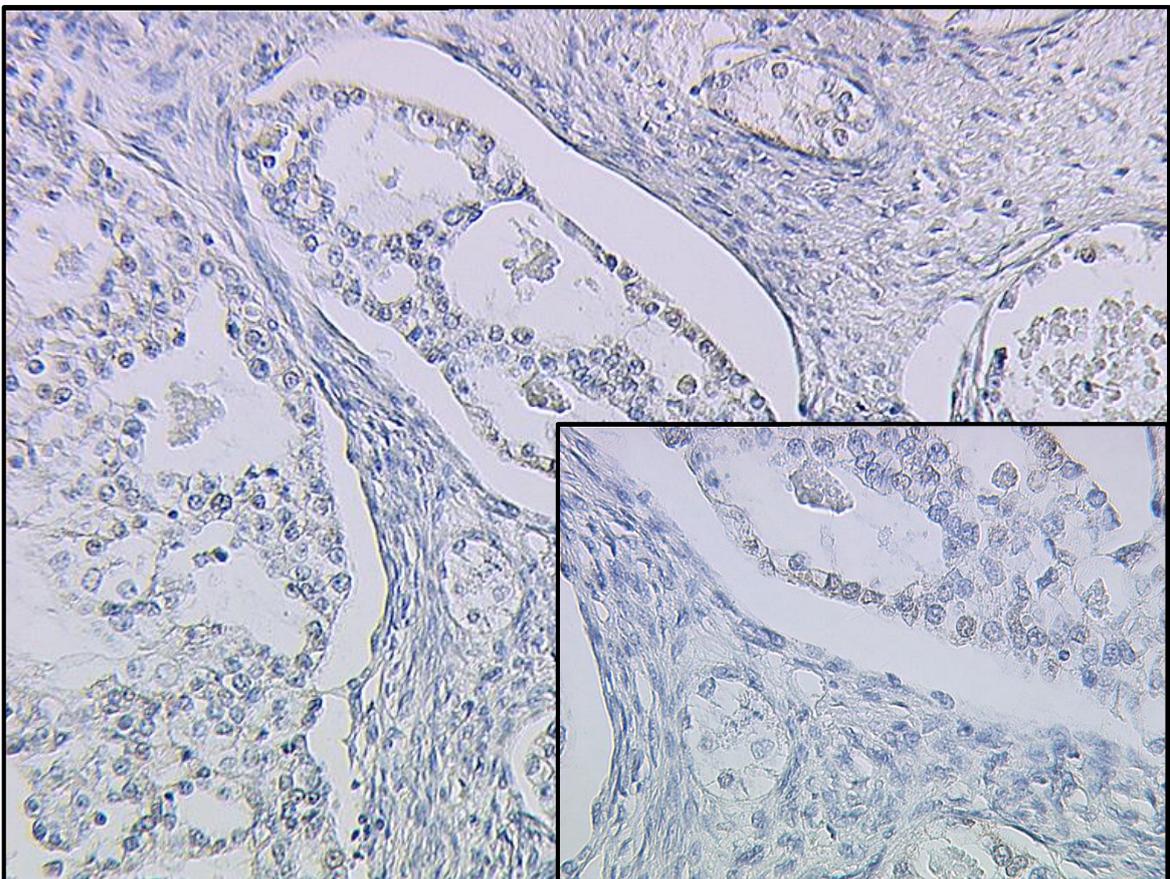


Abbildung 29: THRB1-Expression im klarzelligen Ovarialkarzinom (OvCaK2)

4.6. RXR α

Von 151 untersuchten Ovarialkarzinomen wird RXR α von 116 Tumoren intranukleär exprimiert, davon in 100 mittelgradig und in 16 Tumoren hoch. In 24 untersuchten Ovarialkarzinomen kommt der Rezeptor zytoplasmatisch vor und wird dabei ausschließlich mittelgradig exprimiert.

Die RXR α -Expression korreliert mit der Expression folgender Hormonrezeptoren:

	ER β	PRA	Her2	Gal3	GPER	THR α 2	THR α 1	THR β
RXR α	0.22	0.18	0.22	0.17	0.21	0.20	0.47	0.35
p=	0.01	0.03	0.01	0.04	0.01	0.01	0.00	0.00

4.7. PPAR γ

Von 152 untersuchten Ovarialkarzinomen wird PPAR γ von 27 Tumoren intranukleär exprimiert, davon in 26 mittelgradig und in nur einem Tumor hoch. In 125 untersuchten Ovarialkarzinomen kommt der Rezeptor zytoplasmatisch vor, davon in 124 Tumoren mittelgradig und nur in einem Karzinom hoch exprimiert.

Die PPAR γ -Expression korreliert mit der Expression folgender Hormonrezeptoren:

	THR α 1/2	Gal1_Tu
PPAR γ	0.17	-0.18
p=	0.04	0.02

4.8. VitDR

Von 153 untersuchten Ovarialkarzinomen wird VitDR von 129 Tumoren intranukleär exprimiert, davon in 111 mittelgradig und in 18 Tumoren hoch. In 135 untersuchten Ovarialkarzinomen kommt der Rezeptor zytoplasmatisch vor, davon in 130 Tumoren mittelgradig, sowie in 5 Karzinomen hoch exprimiert.

Seröse G1-Tumoren exprimieren VitDR deutlich stärker intrazellulär als G2-Tumoren (p=0.04).

Wird der VitDR nur schwach im Zytoplasma exprimiert, verlängert dies gegenüber den VitDR hoch exprimierenden Ovarialkarzinomen das Überleben (p=0.00). Dieser Zusammenhang erweist sich auch in der multivariaten Analyse als signifikant (p=0.05). Patientinnen, deren Tumoren VitDR im Zytoplasma exprimierten, verstarben im Laufe des Follow-Ups um bis zu 4,09-fach häufiger als Patientinnen ohne einer Expression des VitDR.

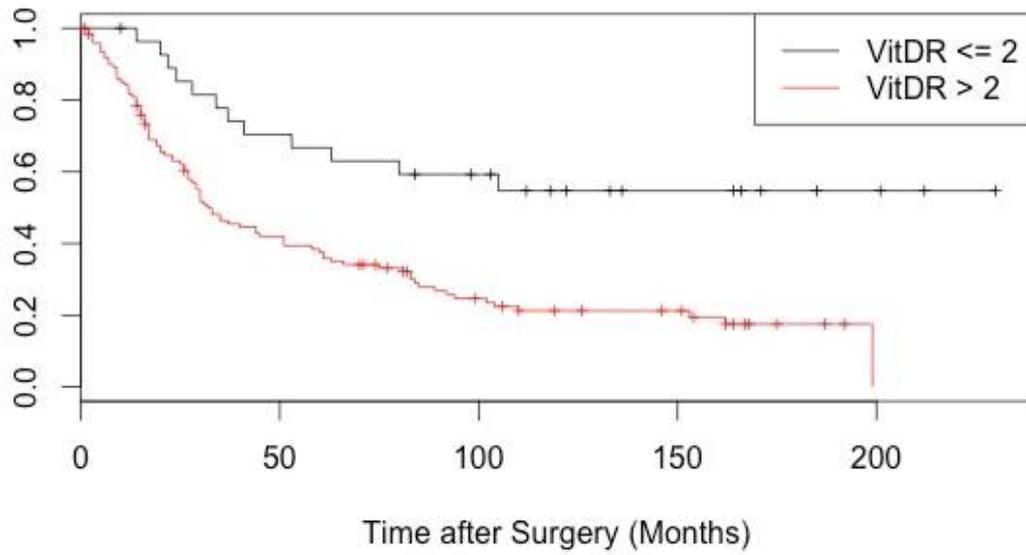


Abbildung 30: VitDR-Expression im Zytoplasma verkürzt das Überleben ($p=0.00$)

Die VitDR-Expression korreliert mit der Expression folgender Hormonrezeptoren:

	TA-MUC1	THR α 2	THR α 1/2	THR α 1
VitDR	0.20	0.20	0.19	0.18
p=	0.02	0.02	0.02	0.03

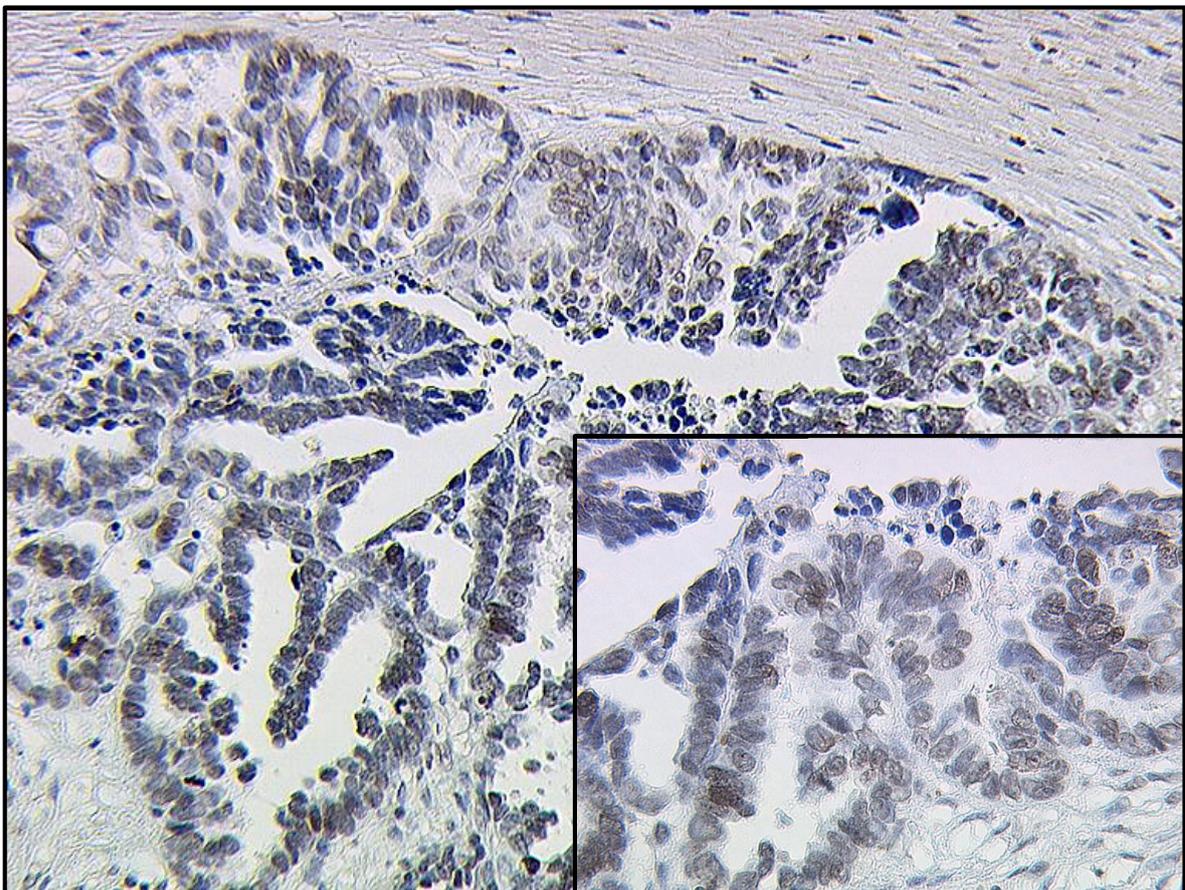


Abbildung 31: VitDR-Expression im serösen Ovarialkarzinom (OvCaS49)

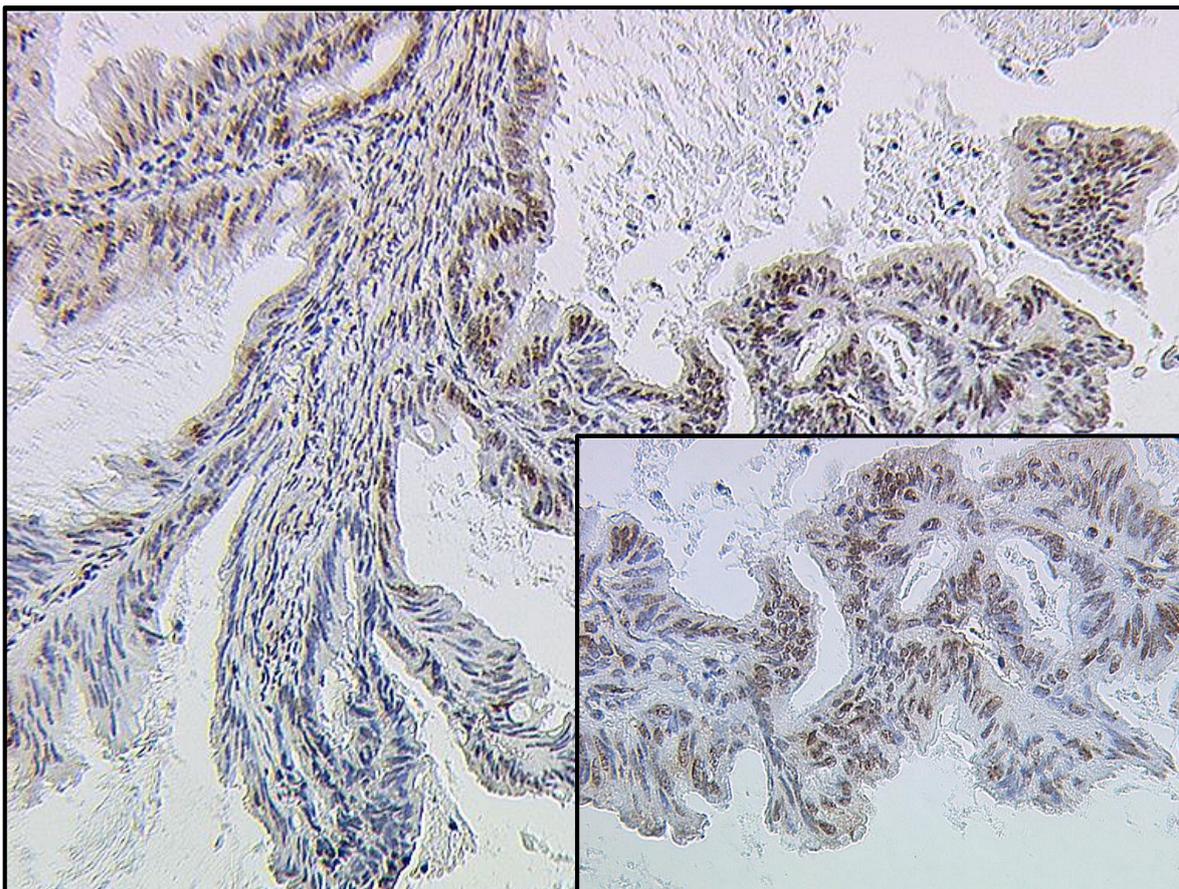


Abbildung 32: VitDR-Expression im muzinösen Ovariakarzinom (OvCaM10)

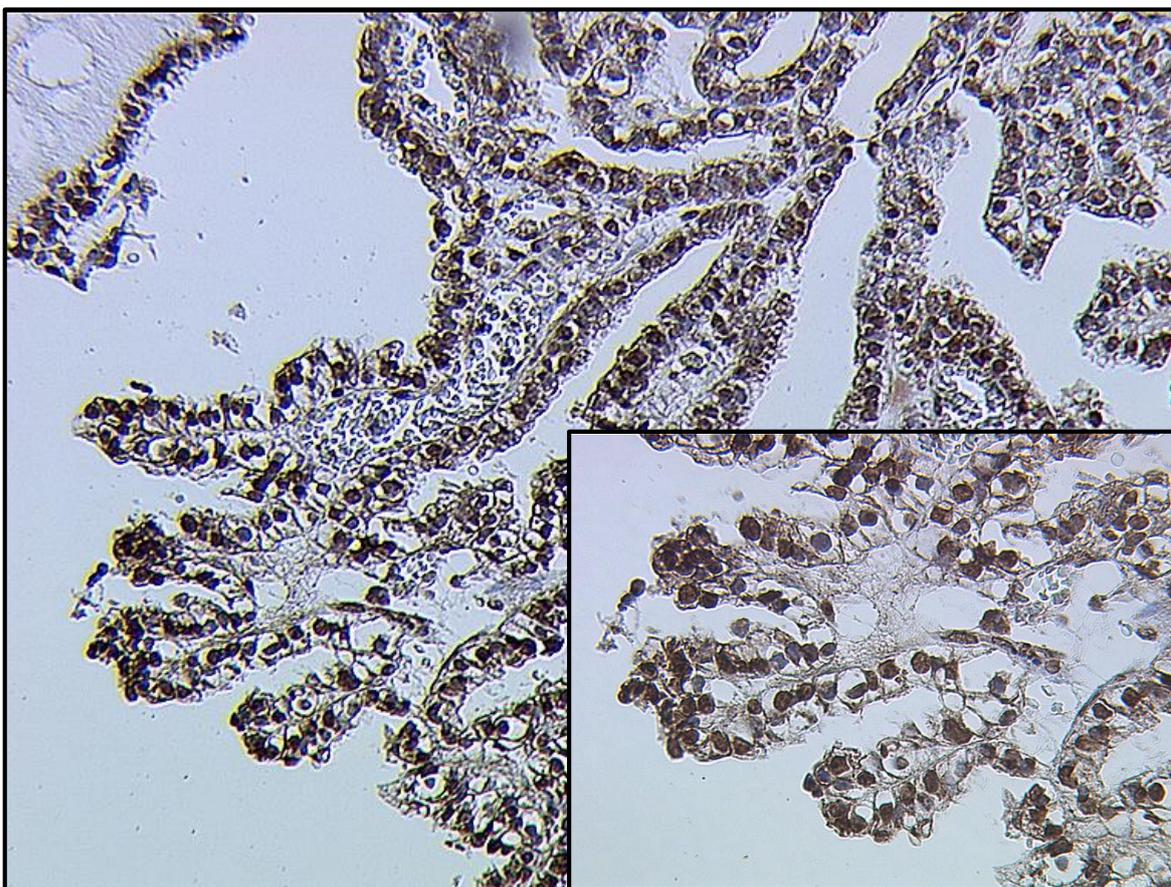


Abbildung 33: VitDR-Expression im klarzelligen Ovariakarzinom (OvCaK7)

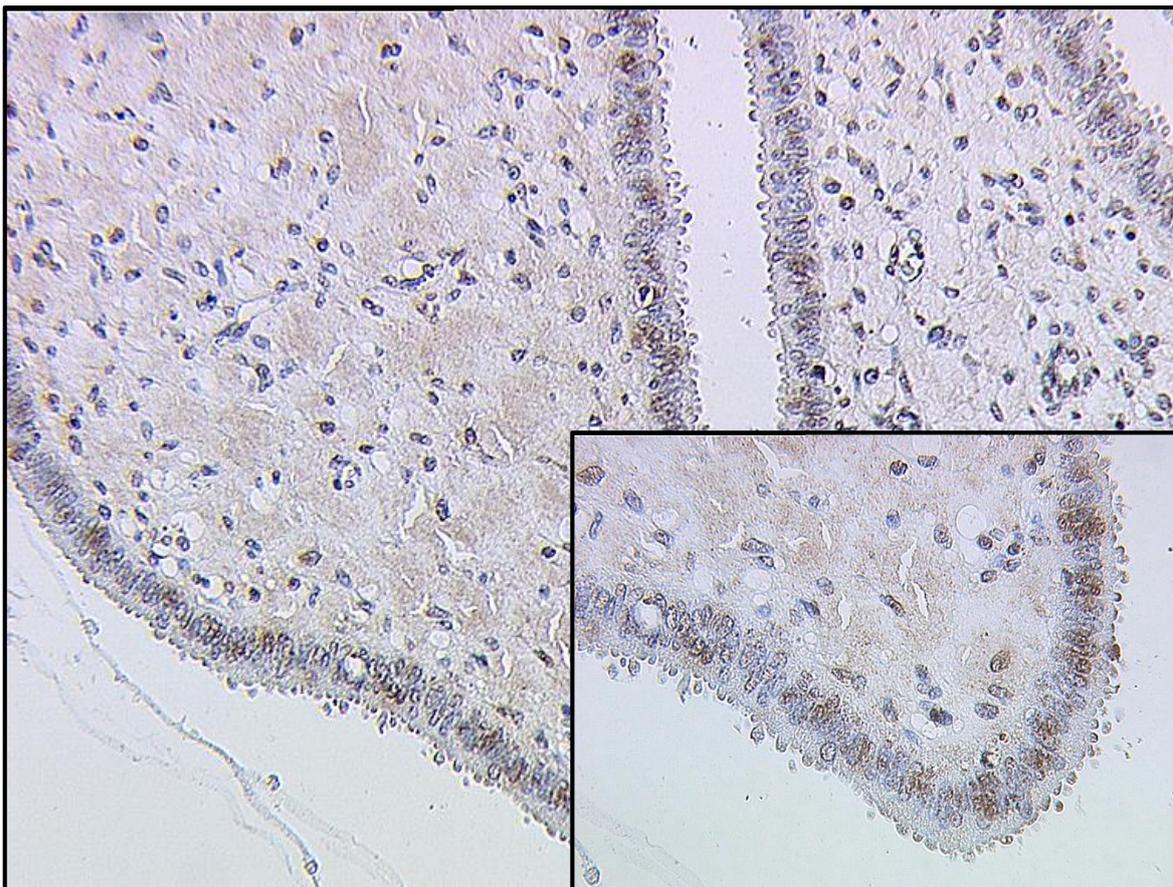


Abbildung 34: VitDR-Expression im endometrioiden Ovarialkarzinom (OvCaE3)

5. Diskussion

Das Ovarialkarzinom ist die fünfthäufigste Krebserkrankung bei Frauen. Trotz radikaler chirurgischer Interventionen und nachfolgender Chemotherapie beträgt das Fünfjahresüberleben nur 42%.² Die anhaltend schlechte Prognose macht die Suche nach Zielmolekülen im Sinne einer „targeted therapy“ zur Erweiterung des Behandlungsspektrums nötig.

In dieser Arbeit wurde die Expression acht verschiedener Rezeptoren der Kernrezeptorsuperfamilie untersucht: THR α 2, THR α 1, THR α 1/2, THR β , THR β 1, RXR α , PPAR γ und VitDR. Das untersuchte Kollektiv bestand aus sämtlichen Patientinnen, die an unserer Klinik zwischen 1990 und 2002 aufgrund eines Ovarialkarzinoms operiert wurden. Die Proben wurden nach den gängigen Methoden der Immunhistochemie bearbeitet^{127,128}, die Färbungen mittels IRS-Score bewertet¹²⁵ und mit SPSS ausgewertet. Folgende Ergebnisse wurden erhoben:

„Nukleäre“ Rezeptoren kommen auch im Zytoplasma vor

Wir konnten zeigen, dass alle von uns untersuchten Rezeptoren im Ovarialkarzinom vorkommen. In unterschiedlichem Ausmaß konnten die Rezeptoren außerdem im Zytoplasma nachgewiesen werden, was auf einen nicht ausschließlich nukleären Sitz der Proteine hinweist. Die Expression im Kern bzw. Zytoplasma scheint größtenteils invers zu korrelieren, das heißt eine hohe Expression des Rezeptors im Kern führt zu einer niedrigeren Expression im Zytoplasma und umgekehrt. Eine Ausnahme stellt der VitDR dar, welcher in Kern und Zytoplasma gleichermaßen hoch exprimiert ist.

	nukleär		zytoplasmatisch	
	Prozent	Anzahl (n)	Prozent	Anzahl (n)
THR α 2	96%	146(154)	8%	12(154)
VitDR	84%	129(153)	88%	135(153)
THR α 1	81%	123(152)	34%	52(152)
RXR α	77%	116(151)	16%	24(151)
THR α 1/2	70%	107(154)	37%	57(154)
THR β	63%	96(152)	41%	62(152)
THR β 1	36%	54(151)	77%	116(151)
PPAR γ	18%	27(152)	82%	125(152)

Tabelle 3: Vergleich der Rezeptorexpression in Kern und Plasma

Unserer Expressionsanalyse zufolge sind VitDR, PPAR γ und THR β 1 die Rezeptoren mit der häufigsten zytoplasmatischen (Ko-)Existenz. Für alle drei Rezeptoren bestehen dazu Vorpublikationen.

Es wird spekuliert, dass die Translokation von THR β 1 vom Zytoplasma in den Kern durch Bindung von Schilddrüsenhormonen an das Plasmamembranprotein Integrin α v β 3 initiiert werden könnte.¹²⁹ Beim PPAR γ soll dies eher durch einen Entzündungsprozess geschehen, der zuerst den Rezeptor aktiviert und dann seine Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern initiiert.^{97,118}

Doch die Inflammation bewirkt nicht nur eine Rezeptortranslokation, sondern begünstigt (möglicherweise auch als Folge) die Tumorprogression.

Inflammation begünstigt Tumorprogression

Zum einen sezernieren Tumorzellen selbst Zytokine, die den Rezeptor direkt aktivieren (beschrieben für PPAR γ).⁹⁷ Zum anderen kann der Rezeptor in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor oder durch Induktion von Signalwegen die Transkription verschiedener Entzündungsmediatoren veranlassen. Induziert durch Triiodthyronin kommt es etwa zur Transkription von COX2, MMP9 und 11 β HSD1.⁴⁶ 11 β HSD1 wird zudem durch ovulationsassoziierte Zytokine hochreguliert und veranlasst die Produktion von Steroidhormonen.¹⁰

Die Transkription von COX2 wird auch durch Bindung von NF- κ B an die DNA induziert¹³⁰ und beeinflusst die Tumorprogression nachweislich im Zervix-, Mamma- und Kolonkarzinom.^{131–133} Auch im Ovarialkarzinom, und dort vor allem in metastasierten und invasiven Tumoren, ist COX2 erhöht.¹³⁴ Für einen onkogenen Effekt von COX2 spricht außerdem, dass seine Expression bei Tumorprogression zunimmt.^{118,119} Die COX2-Expression korreliert außerdem mit jener von VEGF, was über eine inflammatorisch induzierte Vaskularisierungssteigerung einen pathogenetischen Aspekt der ovariellen Karzinogenese darstellen könnte.¹³⁵

Durch den Einsatz von COX2-Inhibitoren wie Celecoxib werden Tumorzellen für Chemotherapeutika sensibilisiert,¹³⁶ die NF- κ B bedingte Chemoresistenzentwicklung verhindert,^{131,137} und ihre Apoptose induziert.¹³⁸ Die Kombination mit NF- κ B-Inhibitoren kann diesen Effekt sogar potenzieren.¹³⁹

Reziprok zum Anstieg von COX2 fällt die Kernexpression von PPAR γ .^{118,119} Eventuell könnte PPAR γ über eine Wechselwirkung mit NF- κ B die Suppression von COX2 bewirken. Durch Zerstörung des Rezeptors würde dann diese Beziehung umgekehrt.¹¹⁹ PPAR β geht sogar schon früher in der malignen Transformation verloren und kommt im Karzinom praktisch nicht mehr vor.¹⁴⁰

Ob die Zerstörung der Rezeptoren durch die Entzündungsreaktion oder aber durch die Entdifferenzierung der Zelle aufgrund der Tumorprogression verursacht wird, ist bisher ungeklärt.

Intranukleärer Rezeptorverlust bei Tumorprogression

Auch in der vorliegenden Forschungsarbeit zeigte sich im Zuge der Entdifferenzierung des Gewebes ein intranukleärer Expressionsverlust mehrerer Rezeptoren: Mit Verschlechterung des Gradings kommt es intranukleär zum Verlust von THR α 2 in serösen Ovarialkarzinomen und tendenziell im Gesamtkollektiv. Auch die intranukleäre Expression von THR β 1 in klarzelligen Tumoren und von VitDR in serösen Karzinomen sinkt signifikant mit der Verschlechterung des Gradings. In fortgeschrittenen FIGO-Tumorstadien verlieren die Karzinome außerdem ihre intranukleären THR β 1 Rezeptoren, sowie seröse Tumoren tendenziell ihre THR α 1/2 Rezeptoren. Als Überlebensfaktor in serösen Ovarialkarzinomen erwies sich die Persistenz einer intranukleären THR α 2-Expression (siehe unten).

Die zytoplasmatische Expression von THR α 2, THR β und VitDR hingegen erhöht die Mortalität.

	R. coef.	S. error	p-value		lower .95	upper .95
THR α 2 Zytoplasma	1.0372	0.3297	0.00166	**	1.479	5.384
THR β Zytoplasma	0.5347	0.2270	0.01847	*	1.094	2.663
VitDR Zytoplasma	0.7111	0.3555	0.04545	*	1.015	4.087

Tabelle 4: In multivariaten Analysen zeigt sich eine erhöhte Mortalität für die zytoplasmatische Expression von THR α 2, THR β und VitDR

Der Verlust von THR β 1 im Zellkern beim Mammakarzinom ist vorbeschrieben. Durch eine Hypermethylierung der CpG-Promotorregionen könnte die Transkription des Gens unterdrückt werden.¹⁴¹ Auch beim Schilddrüsenkarzinom wurde gegenüber gesundem Gewebe eine Abnahme von mRNA für die β -Thyroidrezeptoren (2 mehr als 1) beobachtet, was auf eine Unterdrückung auf Genniveau zurückgeführt wird.¹⁴² Eine weitere Publikation bestätigt dies, fügt aber hinzu, dass die Proteinlevel von THR α 1 und THR β 1 im Karzinom gegenüber

gesundem Schilddrüsengewebe ansteigen würden.¹⁴³ Beim Kolonkarzinom¹⁴⁴ und bei Hypophysentumoren¹⁴⁵ wird die maligne Transformation ebenfalls von einem Verlust an THR β begleitet¹⁴⁴ und auch beim Nierenzellkarzinom gehen THR β 1-Proteine verloren. Auch bei letzterem ist die dazugehörige mRNA aber erhöht, was eine posttranskriptionelle Modifikation denkbar macht.¹⁴⁶

Zum THR α 2 existieren leider weniger Publikationen. Beim Nasopharynxkarzinom scheint der Rezeptor gegenüber gesunden Epithelien erhöht zu sein.¹⁴⁷ Wie sich die Rezeptorexpression bei Fortschreiten des Karzinoms verändert, wurde bisher leider nicht untersucht.

Für VitDR ist im Bronchialkarzinom bereits eine fehlende zytoplasmatische Expression und abnehmende nukleäre Expression verglichen mit gesundem Lungengewebe beschrieben.¹⁴⁸ Dort korreliert die Rezeptorüberexpression auch mit längerem Überleben.¹⁴⁹ Und auch im Ösophaguskarzinom kommt es bei Dedifferenzierung zum Rückgang der VitDR-Expression.¹⁵⁰

Bezüglich des Ovarialkarzinoms zeigten Vorpublikationen keine Korrelationen zwischen einer VitDR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern.¹¹³ Wir konnten hingegen zeigen, dass seröse G1-Tumore den VitDR intranukleär signifikant stärker exprimieren als G2-Tumore. Diese Rezeptorüberexpression korreliert im Ovarialkarzinom allerdings anders als im Bronchialkarzinom nicht mit prognostischen Faktoren.

THR α 2 als Überlebensfaktor im serösen Ovarialkarzinom

Mit dem Expressionsverlust von THR α 2 sinkt konsekutiv die Überlebenszeit bei Erkrankung am serösen Ovarialkarzinom. Dem Rezeptor kommt demnach eine protektive Funktion in serösen Ovarialtumoren zu. Dieser Effekt wurde auch beim Mammakarzinom beobachtet.¹⁵¹

Der Expressionsverlust der Thyroidhormonrezeptoren bei Tumorprogression und die Auswirkungen auf das Überleben könnten durch eine Schilddrüsenstörung getriggert sein. Der Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf die Krebsentstehung hat sich für mehrere Malignome gezeigt und auch bezüglich des Ovarialkarzinoms erhöht eine Hyperthyreose das Erkrankungsrisiko.⁴⁴ Wie oben beschrieben, induziert Triiodthyronin die Transkription von COX2, MMP9 und 11 β HSD1 und

unterhält so eine Entzündung. Wie es dadurch zur Zerstörung der Rezeptoren kommt, ist bisher ungeklärt. Zusätzlich erhöht T3 aber auch den karzinomassoziierten Östrogenrezeptor ER α ⁴⁶ und verhindert außerdem im Zusammenspiel mit FSH die Apoptose von Granulosazellen kleiner Follikel.^{152,153}

Schon vor der hier vorliegenden Analyse der Thyroidhormon-, Vitamin D-, RXR α - und PPAR γ -Rezeptoren konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Jeschke Korrelationen diverser anderer Hormonrezeptoren mit dem Überleben beim Ovarialkarzinom zeigen und publizieren: So verbessern neben dem THR α 2 auch Rezeptoren für Östrogen (ER α)¹⁵⁴, Progesteron (PR β)¹⁵⁵ und LH das Outcome im Ovarialkarzinom, wohingegen jene für FSH die Prognose verschlechtern.¹²⁰ Mit FSH/LH treten außerdem mehrere Proteine in Interaktion: So wirkt die Expression von Her2 nur in FSH-negativem Tumorgewebe verkürzend auf das Überleben¹⁵⁶ und GPER hemmt das Tumorstadium nur in LH/FSH-negativen Ovarialkarzinomen.¹⁵⁷ Die Expression von hCG scheint keinen Einfluss auf das Überleben zu nehmen, korreliert aber mit jener des LH-Rezeptors.¹²¹

Das Vorkommen der Antigene Mucin-1 und TA-MUC1 determiniert ebenfalls kürzeres Überleben.^{158,159} Interessanterweise sinkt die Serumkonzentration des an sich tumorspezifischeren TA-MUC1 beim Ovarialkarzinom jedoch gegenüber benignen Tumoren ab.¹⁶⁰

Auch Glycodelin A verschlechtert die Prognose, eventuell indem es supprimierend auf die Aktivierung von Lymphozyten wirkt oder die Verbindungen von (Tumor-) Zellen löst.^{161–163} Seine Korrelation mit TA-MUC1 ist naheliegend, die mit Rezeptoren für FSH, LH und hCG weniger.¹⁶²

Eine lange Reihe weiterer immunhistochemischer Rezeptoranalysen wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Jeschke durchgeführt und bisher nicht publiziert. Die unten stehende Tabelle beschreibt zusammenfassend die Korrelationen zwischen den in der vorliegenden Arbeit analysierten Thyroidhormon-, Vitamin D-, RXR α - und PPAR γ -Rezeptoren mit sämtlichen durch die Arbeitsgruppe bis Juni 2012 erhobenen und zum Teil nicht publizierten Rezeptoren.

THRa2	THRa1	THRa1/2	THRβ	THRβ1	RXRα	PPARγ	VitDR
FSH	VU4H8	FSH	ERβ	Gal1_Tu	ERβ	-Gal1_Tu	PankoMab
ERα	THRa2	HCG	PRA	Gal1_Stroma	PRA	THRa1/2	THRa2
PRA	THRβ	ERβ	Gal3	THRa1/2	Her2		THRa1
GPÉR	RxR	PRA	Gal1_Tu	THRβ	Gal3		THRa1/2
GlycC15	VDR	Gal1_Tu	TF1		GPÉR		
GlycQ13		GPÉR	Muc_115D8		THRa2		
-TA-MUC1		GlycQ13	VU3C6		THRa1		
THRa1/2		PankoMab	THRa1		THRβ		
THRa1		THRa2	THRβ1				
VDR		THRβ1	RxR				
RxRα		PPARγ					
		VDR					

Tabelle 5: Rezeptorkorrelationen beim Ovarialkarzinom

THRβ Erhöhung im FIGO Stadium III

THRβ ist im Stadium III (im Vergleich zu Stadium II) der FIGO-Klassifikation deutlich überexprimiert. Einen Einfluss auf das Gesamtüberleben oder das rezidivfreie Überleben nimmt der Rezeptor aber nicht.

THRβ wird in Vorpublikationen sowohl eine tumorsuppressive als auch onkogene Funktion zugeschrieben. Der Rezeptor reduziert in vitro das Wachstum von Zellen des Mammakarzinoms, indem er eine Apoptose der Tumorzellen induziert und den JAK-STAT Signalweg schwächt.¹⁶⁴ Im follikulären Schilddrüsenkarzinom wirkt THRβ in vitro ebenfalls als Tumorsuppressor, indem er auch dort einen Signalweg (AKT-mTOR-p70 S6K) schwächt und VEGF reduziert.¹⁶⁵

Andererseits wird von einem ursächlichen Einfluss von mutierten THRβ Rezeptoren auf die Kanzerogenese von Schilddrüsen- und Hypophysentumoren berichtet. Der mutierte Rezeptor beeinflusst die Bindung nicht mutierter Thyroidrezeptoren und Koregulatoren an die DNA, reduziert PPARγ (der im Schilddrüsenkarzinom eine Rolle als Tumorsuppressor hat) und veranlasst eine Dauerstimulation von Tumorpromotoren wie Zyklin D1.¹⁶⁶

Auch in TSH-produzierenden Tumoren ist der Rezeptor mutiert und eventuell für den Ausfall der negativen Rückkopplung verantwortlich.¹⁶⁷

VDR geht bei Entdifferenzierung verloren

Der Vitamin D Rezeptor wird als der einzige von uns untersuchte Rezeptor gleich häufig in Kern und Zytoplasma exprimiert. Das Vorliegen im Zytoplasma ist vorbeschrieben.¹¹³

Ähnlich der Thyroidhormonrezeptoren $\alpha 2$ und $\beta 1$ ist der VDR in serösen G1-Tumoren intranukleär überexprimiert, erlischt aber mit zunehmender Entdifferenzierung. Aussagen über gradingabhängige Expressionsveränderungen wurden bisher nicht gemacht, jedoch sei der VDR im Ovarialkarzinom gegenüber gesundem Gewebe und benignen Veränderungen in Zahl und Intensität erhöht.^{110,113} Wie bei den Schilddrüsenhormonrezeptoren (und beschrieben für PPAR γ) könnte eine Inflammationsreaktion die auf G1-Tumore beschränkte Mehrexpression von VDR beeinflussen.¹¹³

Vitamin D könnte im frühen Tumorgeschehen vorübergehend eine proliferationshemmende Funktion übernehmen, die sich im Ovarialkarzinom allerdings nicht auf das Gesamtüberleben und rezidivfreie Überleben auswirkt. Literaturstudien fassen den Einfluss von VDR auf Inzidenz und Mortalität des Ovarialkarzinoms als nicht signifikant zusammen.^{114,115} Es existieren allerdings auch widersprüchliche Publikationen, die etwa von einem proliferationshemmenden Effekt von 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D3 auf Tumorzellen in Zellkulturen berichten.^{168,169}

RXR α spielt eine untergeordnete Rolle im Ovarialkarzinom

Trotz vielfältiger Erkenntnisse über den Wirkmechanismus von Retinoiden in Karzinomen sind Expressionsanalysen ihrer Rezeptoren im Ovarialkarzinom lückenhaft. In unseren Untersuchungen zeigte sich, dass RXR α im Ovarialkarzinom überwiegend im Kern vorkommt und nur selten im Zytoplasma. Korrelationen mit morphologischen Kriterien und der Prognose konnten nicht erhoben werden.

Der fehlende Einfluss von RXR α auf Morphologie und Prognose wurde auch von Kaiser⁷¹ beobachtet, außerdem fiel eine vermehrte Expression von RAR α und RXR β in fortgeschrittenen Stadien nach der FIGO-Klassifikation auf. Die Überexpression von RAR α verschlechterte sogar die Prognose im Sinne eines kürzeren Überlebens. Katsetos¹⁷⁰ beobachtete wiederum keinen Zusammenhang zwischen FIGO-Stadium und Rezeptorexpression, beschrieb aber eine Expressionsabnahme von RAR α in G3-Tumoren gegenüber G2-Karzinomen.

Aufgrund seiner Rolle als Dimerisationspartner für weitere nukleäre Rezeptoren bestehen für RXR vielfältige Wechselwirkungen. In unserer Analyse zeigte sich eine

Korrelation zwischen RXR α und ER β . Eine Korrelation zwischen RAR α und dem Östrogenrezeptor ist vorbeschrieben.¹⁷⁰ Beide Ergebnisse lassen eine Wechselwirkung zwischen Retinoiden und Östrogen vermuten, zumal bezüglich des Mammakarzinoms ähnliche Erkenntnisse erzielt wurden.⁶⁴

RXR-selektive Agonisten wirken nicht an allen RXR-Heterodimeren. Während RAR-RXR und THR-RXR Heterodimere nur von RAR-spezifischen Retinoiden bzw. Thyroidhormonen aktiviert werden, entfalten am RXR-PPAR γ Heterodimer sowohl RXR-spezifische Retinoide als auch PPAR γ -Agonisten ihre Wirkung.¹⁷¹ Bestätigt wurde dieser Effekt bereits im Mammakarzinom, wo RXR-Agonisten den antiproliferativen und apoptotischen Effekt von PPAR-Liganden potenzieren.^{172–174} Im Tierversuch wirken sie an Diabetes Mellitus Typ II Mäusen ebenfalls synergistisch mit PPAR γ -Liganden im Sinne einer Insulinsensibilisierung.¹⁷⁵

Résumé

Die bei nahezu allen Malignomen angewandte Chemotherapie richtet sich unspezifisch gegen schnell proliferierende Zellen, was mit vielen Nebenwirkungen, wie etwa auch der Induktion von Zweitmalignomen, verbunden ist. Ein selektives Vorgehen gegen Tumorzellen im Sinne einer „targeted therapy“ ist daher anzustreben. Nukleäre Rezeptoren sind aufgrund ihrer Funktion als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren mit Wirkung auf unterschiedliche Zellprozesse ein erfolgsversprechendes Zielmolekül. Beim Mammakarzinom gibt es bereits Erfolge mit Tamoxifen gegen den Östrogenrezeptor und nicht nur bei der Promyelozytenleukämie wirken Retinoide lebensverlängernd.

Auch fernab der Krebserkrankungen sind Agonisten und Antagonisten der Kernrezeptoren aus den Therapieprogrammen nicht mehr wegzudenken. So sind Dexamethason gegen den Glukokortikoidrezeptor bei inflammatorischen Erkrankungen und Glitazone als PPAR γ -Agonisten bei Diabetes Mellitus Typ II inzwischen unentbehrliche Bestandteile der entsprechenden Behandlungspläne.²⁰

Der Bonus der vorliegenden Studie ist ihr großes Kollektiv von 156 am Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen. Limitiert wird ihre Aussagekraft durch das retrospektive Studiendesign und den fehlenden Vergleich mit gesundem Gewebe,

benignen Veränderungen und Borderlinetumoren. Die mikroskopische Auswertung mittels IRS-Score ist zudem überaus subjektiv.

In Hinblick auf die prognostische Aussagekraft dieser Studie wurden in der statistischen Analyse nicht alle Parameter berücksichtigt, die die Kanzerogenese des Ovarialkarzinoms mitbeeinflussen: So korreliert eine hohe Expression von $\text{THR}\alpha 2$ zwar mit einem längeren Überleben, inwiefern ein Zusammenhang mit weiteren pathogenetischen Einflussfaktoren wie Mutationen im BRCA-Gen und Schwangerschaften besteht, bleibt in der Analyse allerdings unberücksichtigt. Neben der Korrelation der Rezeptorexpression mit Grading und Staging wäre außerdem ein Vergleich mit epidemiologischen Fragen, wie dem Alter bei Erstmanifestation interessant.

Um Aufschluss über Wechselwirkungen zwischen Entzündungsparametern und nukleären Rezeptoren zu erlangen, sollte die Expression von COX2 im Vergleich vor allem zur $\text{THR}\alpha 2$ Expression untersucht werden. Eine Bestimmung der Rezeptorexpression in gesundem und maligne verändertem Ovarialgewebe mit simultaner Messung von Schilddrüsenhormonen und Entzündungsparametern könnte für die Pathogenese des Ovarialkarzinoms aufschlussreiche Ergebnisse bringen.

Die Rezeptorexpression sollte außerdem auf molekularer Ebene weiter erforscht werden. Die mRNA der Rezeptoren sollte isoliert, mittels Northern Blot analysiert und anschließend quantifiziert werden. Im Vergleich dazu sollten die Proteine mittels Western Blot extrahiert und quantifiziert werden.

Ein weiteres Forschungsfeld ist die Behandlung von Zelllinien des Ovarialkarzinoms mit Schilddrüsenhormonen (vor allem T3), Thyreostatika, Retinoiden, Glitazone und Vitamin D. Als Erweiterung könnten diese Stoffe mit RXR-selektiven Pharmaka kombiniert werden: aufgrund seiner Eigenschaft als Heterodimerisationspartner könnte das Hinzufügen von RXR das Wachstum der Zellkultur beeinflussen.

Abkürzungsverzeichnis

ABC Methode	Avidin-Biotin-Complex
AK	Antikörper
BRAF	v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (<i>Onkogen</i>)
BRCA	BReast CAncer (<i>ein Tumormarker und –suppressor</i>)
CA 125	Cancer Antigen 125
COX2	CycloOXygenase 2
DAB	3,3 DiAminoBenzidin
DNA	DexoxyriboNucleic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Estrogen Receptor
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FSH	Follicle Stimulating Hormone
G	Grading
GPOR	G-Protein coupled Estrogen Receptor
HE4	Human Epidymidis Protein 4
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HRE	Hormone Responsive Element
HDAC	Histon DeACetylase
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
4-HPR	N-(4-HydroxyPhenyl) Retinamide
HRP	Horse-Raddish-Peroxidase
HSD11B1	HydroxySteroid (11-Beta) Dehydrogenase 1
HSP 90	Hitzeschockprotein
HCG	Humanes ChorionGonadotropin
IRS	ImmunReaktiver Score
Ig	Immunglobulin
JAK-STAT	JANusKinase (JAK), Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT-Proteine)
kDa	kiloDalton
KRAS	Kirsten RAt Sarcoma viral oncogene homolog (<i>Onkogen</i>)
LH	Luteinisierendes Hormon
MaCa	Mamma Carcinom
MLH1	MutL Homolog (<i>DNA-Reparaturprotein</i>)
MMP9	Matrix MetalloPeptidase 9
mRNA	Messenger RiboNucleic Acid
MSH2	MutS Homolog (<i>DNA-Reparaturprotein</i>)
NF-κB	Nuclear Factor Kappa light-chain-enhancer of activated B cells
NLS	Nuclear Localization Sequence
OvCa	Ovarialkarzinom

p 53	Protein 53 (<i>Tumorsuppressor</i>)
PARP	Poly ADP Ribose Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCO-Syndrom	Polycystic ovary syndrome
PDGFR	Plateled Derived Growth Factor Receptor
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIK3CA	Phospholinositide-3-Kinase, Catalytic, Alpha polypeptid
PKA	ProteinKinase A (<i>Teil eines Signalweges</i>)
PKB	ProteinKinase B, <i>Synonym Akt (Protoonkogen)</i>
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PRA	Progesterone Receptor A
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog (<i>Tumorsuppressor</i>)
R	
RAR	Retinoic Acid Receptor
RXR	Retinoid X Receptor
RNA	RiboNucleic Acid
T3	
T4	Thyroxin
TA-MUC1	Tumor Assoziiertes Mucin 1
THR	Thyroid Hormone Receptor (auch TR)
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
VitDR	
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Ligand eines Signaltransduktionsweges (<i>Wg[wingless]-Gen und Int-Gen=Wnt</i>)

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ALTERSSPEZIFISCHE INZIDENZ DES OVARIALKARZINOMS JE 100 000. DEUTSCHLAND 2009-2010. (Robert-Koch-Institut. <i>Krebs in Deutschland 2009/2010 2013;9:84–7.</i>) ²	7
ABBILDUNG 2: MOLEKULARE AUFBAU VON KERNREZEPTOREN (Mangelsdorf, D. J., Carl Thummel, Miguel Beato, Peter Herrlich, Günther Schittq Kazuhiko Umesono, Bruce Blumberg, Philippe Kastner, Manuel Mark, Pierre Chambon and Ronald M. Evan. <i>The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. Cell 1995;83:835–9.</i>) ²⁴	10
ABBILDUNG 3: FUNKTION UND VORKOMMEN DER PPAR UNTERSCHIEDET SICH NACH ISOFORM (Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ. <i>The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. Nat Rev Cancer 2012.</i>) ⁸⁹	16
ABBILDUNG 4: STOFFWECHSEL UND FUNKTION VON VITAMIN D (Holick MF. <i>Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. J. Clin. Invest. 2006;116:2062–72. eng.</i>) ¹⁰⁰	18
ABBILDUNG 5: ÜBERLEBEN NACH SUBTYP	22
ABBILDUNG 6: ABC-METHODE (Kuhn C. <i>Seminar Immunhistochemie. 2010.</i>) ¹²³	25
ABBILDUNG 7: HRP-POLYMER-METHODE (Zycomed. <i>ZytoChem Plus Polymer Detektionssystem – ein Quantensprung in puncto Sensitivität, 2007: 1.</i>) ¹²⁴	26
ABBILDUNG 8: THRA2-EXPRESSION IM ZYTOPLASMA VERKÜRZT DAS ÜBERLEBEN (P=0.00)	31
ABBILDUNG 9: THRA2-EXPRESSION IM ZELLKERN SERÖSER OVARIALKARZINOME VERLÄNGERT DAS ÜBERLEBEN (P=0.01)	32
ABBILDUNG 10: THRA2-EXPRESSION IM ZYTOPLASMA DES SERÖSEN OVARIALKARZINOMS VERKÜRZT DAS ÜBERLEBEN (P=0.00)	32
ABBILDUNG 11: THRA2-EXPRESSION IM SERÖSEN OVARIALKARZINOM (OVCAS42)	33
ABBILDUNG 12: THRA2-EXPRESSION IM SERÖSEN OVARIALKARZINOM (OVCAS72)	33
ABBILDUNG 13: THRA2-EXPRESSION IM MUZINÖSEN OVARIALKARZINOM (OVCAM13)	34
ABBILDUNG 14: THRA1/2 WIRD VON MUZINÖSEN OVARIALKARZINOMEN NICHT EXPRIERT (P=0.01)	35
ABBILDUNG 15: THRA1/2-EXPRESSION IM SERÖSEN OVARIALKARZINOM (OVCAS37)	36
ABBILDUNG 16: THRA1/2-EXPRESSION IM MUZINÖSEN OVARIALKARZINOM (OVCAM10)	36
ABBILDUNG 17: THRA1/2-EXPRESSION IM ENDOMETRIOIDEN OVARIALKARZINOM (OVCAE9)	37
ABBILDUNG 18: THRA1/2-EXPRESSION IM KLARZELLIGEN OVARIALKARZINOM (OVCAK5)	37
ABBILDUNG 19: THRb-EXPRESSION IM ZYTOPLASMA VERKÜRZT DAS ÜBERLEBEN (P=0.03)	38
ABBILDUNG 20: THRb-EXPRESSION IM SERÖSEN OVARIALKARZINOM (OVCAS65)	39
ABBILDUNG 21: THRb-EXPRESSION IM ENDOMETRIOIDEN OVARIALKARZINOM (OVCAE20)	39
ABBILDUNG 22: THRb-EXPRESSION IM KLARZELLIGEN OVARIALKARZINOM (OVCAK11)	40
ABBILDUNG 23: KLARZELLIGE OVARIALKARZINOME SIND ALS EINZIGER SUBTYP THRb1 POSITIV (P=0.00)	41
ABBILDUNG 24: SIGNIFIKANTE ÜBEREXPRESSION VON THRb1 IN G1-TUMOREN DES GESAMTKOLLEKTIVS (P=0.00)	41
ABBILDUNG 25: THRb1-EXPRESSION IM ZYTOPLASMA VERKÜRZT DAS ÜBERLEBEN (P=0.00)	42
ABBILDUNG 26: THRb1-EXPRESSION IM SERÖSEN OVARIALKARZINOM (OVCA8)	43
ABBILDUNG 27: THRb1-EXPRESSION IM MUZINÖSEN OVARIALKARZINOM (OVCAM11)	43
ABBILDUNG 28: THRb1-EXPRESSION IM ENDOMETRIOIDEN OVARIALKARZINOM (OVCAE21)	44
ABBILDUNG 29: THRb1-EXPRESSION IM KLARZELLIGEN OVARIALKARZINOM (OVCAK2)	44
ABBILDUNG 30: VitDR-EXPRESSION IM ZYTOPLASMA VERKÜRZT DAS ÜBERLEBEN (P=0.00)	46
ABBILDUNG 31: VitDR-EXPRESSION IM SERÖSEN OVARIALKARZINOM (OVCAS49)	46
ABBILDUNG 32: VitDR-EXPRESSION IM MUZINÖSEN OVARIALKARZINOM (OVCAM10)	47
ABBILDUNG 33: VitDR-EXPRESSION IM KLARZELLIGEN OVARIALKARZINOM (OVCAK7)	47
ABBILDUNG 34: VitDR-EXPRESSION IM ENDOMETRIOIDEN OVARIALKARZINOM (OVCAE3)	48

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: EINTEILUNG DES OVARIALKARZINOMS NACH HISTOPATHOLOGISCHEM SUBTYP (Cannistra, S. A., M.D. <i>Cancer of the Ovary. N Engl J Med 2004;351:2519–29.</i>) ¹	8
TABELLE 2: PATIENTENKOLLEKTIV. (vgl. Lenhard M, Lennerová T, Ditsch N, et al. <i>Opposed roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors in ovarian cancer survival. Histopathology 2011;58:990–4.</i> und Lenhard M, Tsvilina A, Schumacher L, et al. <i>Human chorionic gonadotropin and its relation to grade, stage and patient survival in ovarian cancer. BMC Cancer 2012;12:2.</i>) ^{120,121}	21
TABELLE 3: VERGLEICH DER REZEPTOREXPRESSSION IN KERN UND PLASMA	49
TABELLE 4: IN MULTIVARIATEN ANALYSEN ZEIGT SICH EINE ERHÖHTE MORTALITÄT FÜR DIE ZYTOPLASMATISCHE EXPRESSION VON THRA2, THRb UND VitDR	51
TABELLE 5: REZEPTORKORRELATIONEN BEIM OVARIALKARZINOM	54

References

1. Cannistra, S. A., M.D. Cancer of the Ovary. *N Engl J Med* 2004;351:2519–29.
2. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2009/2010 2013;9:84–7.
3. Herbst AL. The epidemiology of ovarian carcinoma and the current status of tumor markers to detect disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994;170:1099-105; discussion 1105-7. eng.
4. Kreienberg R. Management des Ovarialkarzinoms, Interdisziplinäres Vorgehen. Heidelberg: Springer, 2009. 1 online resource (xv, 414. (Onkologie aktuell). ISBN: 3540688579.
5. Eisinger F, Stoppa-Lyonnet D, Longy M, et al. Germ line mutation at BRCA1 affects the histoprognostic grade in hereditary breast cancer. *Cancer Res.* 1996;56:471–4. eng.
6. Jacquemier J, Eisinger F, Birnbaum D, Sobol H. Histoprognostic grade in BRCA1-associated breast cancer. *The Lancet* 1995;345:1503.
7. Ben David Y, Chetrit A, Hirsh-Yechezkel G, et al. Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors. *J Clin Oncol* 2002;20:463–6. eng.
8. Porter D, Dixon M, Smyth E, Steel C. Breast cancer survival in BRCA1 carriers. *The Lancet* 1993;341:184–5.
9. Risch HA. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998;90:1774–86. eng.
10. Rae MT, Hillier SG. Steroid signalling in the ovarian surface epithelium. *Trends Endocrinol. Metab.* 2005;16:327–33. eng.
11. Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999;91:1459–67. eng.
12. Gates MA, Rosner BA, Hecht JL, Tworoger SS. Risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic subtype. *Am. J. Epidemiol.* 2010;171:45–53.
13. Risch HA, Marrett LD, Jain M, Howe GR. Differences in risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic type. Results of a case-control study. *Am. J. Epidemiol.* 1996;144:363–72. eng.
14. Auersperg N., Wong A., Choi K.C., Kang S. K., Leung P. C. K. Ovarian surface epithelium- biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews* 2001;22:255–88.
15. Staebler A, Diebold J. Molekularpathologie der epithelialen Ovarialneoplasien. Von der Phänotyp-Genotyp-Korrelation zu neuen Ansatzpunkten in Diagnostik und Therapie [Molecular pathology of epithelial ovarian neoplasias: from the phenotype-genotype correlation to new targets in diagnostics and therapy]. *Pathologie* 2007;28:180–6. ger.
16. Despierre E, Yesilyurt BT, Lambrechts S, et al. Epithelial ovarian cancer: rationale for changing the one-fits-all standard treatment regimen to subtype-specific treatment. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2014;24:468–77. eng.
17. Jelovac D, Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin* 2011;61:183–203. eng.
18. Freydanck MK, Laubender RP, Rack B, Schuhmacher L, Jeschke U, Scholz C. Two-marker combinations for preoperative discrimination of benign and malignant ovarian masses. *Anticancer Res.* 2012;32:2003–8. eng.

19. Rassow J. Biochemie. 2nd ed. Stuttgart: Thieme, 2008. S. (Duale Reihe). ISBN: 3131253525.
20. Gronemeyer H, Gustafsson J, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:950–64. eng.
21. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 2002;295:2465–8. eng.
22. Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* 1997;11:657–66. eng.
23. Jin L, Li Y. Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:1218–26. eng.
24. Mangelsdorf, D. J., Carl Thummel, Miguel Beato, Peter Herrlich, Gintner Schiitq Kazuhiko Umesono, Bruce Blumberg, Philippe Kastner, Manuel Mark, Pierre Chambon and Ronald M. Evan. The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell* 1995;83:835–9.
25. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 2002;108:465–74. eng.
26. Mebis L, van den Berghe, G. The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in critical illness. *Neth J Med* 2009;67:332–40. eng.
27. Cheng S, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr. Rev.* 2010;31:139–70. eng.
28. Darling DS, Carter RL, Yen PM, Welborn JM, Chin WW, Umeda PK. Different dimerization activities of alpha and beta thyroid hormone receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* 1993;268:10221–7. eng.
29. Zhang J, Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* 2000;62:439–66. eng.
30. Araki O, Ying H, Furuya F, Zhu X, Cheng S. Thyroid hormone receptor beta mutants: Dominant negative regulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102:16251–6. eng.
31. Wikström L, Johansson C, Saltó C, et al. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J.* 1998;17:455–61. eng.
32. Jones I, Ng L, Liu H, Forrest D. An intron control region differentially regulates expression of thyroid hormone receptor beta2 in the cochlea, pituitary, and cone photoreceptors. *Mol. Endocrinol.* 2007;21:1108–19. eng.
33. Chiamolera MI, Sidhaye AR, Matsumoto S, et al. Fundamentally distinct roles of thyroid hormone receptor isoforms in a thyrotroph cell line are due to differential DNA binding. *Mol. Endocrinol.* 2012;26:926–39. eng.
34. Yen PM, Feng X, Flamant F, et al. Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO Rep.* 2003;4:581–7. eng.
35. Cao X, Kambe F, Moeller LC, Refetoff S, Seo H. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol. Endocrinol.* 2005;19:102–12. eng.
36. Moeller LC, Dumitrescu AM, Refetoff S. Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes. *Mol. Endocrinol.* 2005;19:2955–63. eng.
37. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010;29:625–34. eng.

38. Davis PJ, Davis FB, Mousa SA, Luidens MK, Lin H. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011;51:99–115. eng.
39. Aniello F, Couchie D, Bridoux AM, Gripois D, Nunez J. Splicing of juvenile and adult tau mRNA variants is regulated by thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991;88:4035–9. eng.
40. Puymirat J, Etongue-Mayer P, Dussault JH. Thyroid hormones stabilize acetylcholinesterase mRNA in neuro-2A cells that overexpress the beta 1 thyroid receptor. *J. Biol. Chem.* 1995;270:30651–6. eng.
41. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 2001;344:501–9. eng.
42. Boelaert K, Franklyn JA. Thyroid hormone in health and disease. *J. Endocrinol.* 2005;187:1–15. eng.
43. Moeller LC, Führer D. Thyroid hormone, thyroid hormone receptors, and cancer: a clinical perspective. *Endocr. Relat. Cancer* 2013;20:R19-29. eng.
44. Ness RB, Grisso JA, Cottreau C, et al. Factors related to inflammation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer. *Epidemiology* 2000;11:111–7. eng.
45. Zhang SS, Carrillo AJ, Darling DS. Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.* 1997;3:555–62. eng.
46. Rae MT, Gubbay O, Kostogiannou A, Price D, Critchley, H. O. D., Hillier SG. Thyroid Hormone Signaling in Human Ovarian Surface Epithelial Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007;92:322–7.
47. Krassas GE. Thyroid disease and female reproduction. *Fertil. Steril.* 2000;74:1063–70. eng.
48. Collins MD, Mao GE. Teratology of retinoids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999;39:399–430. eng.
49. Silveira ER, Moreno FS. Natural retinoids and β -carotene: from food to their actions on gene expression. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1998;9:446–56.
50. Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010;67:1423–45. eng.
51. Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, et al. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 1997;124:313–26. eng.
52. Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, et al. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992;68:397–406. eng.
53. Wolf G. Is 9-Cis-Retinoic Acid the Endogenous Ligand for the Retinoic Acid-X Receptor? *Nutrition Reviews* 2006;64:532–8.
54. Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* 2006;66:606–30. eng.
55. Huang J, Powell WC, Khodavirdi AC, et al. Prostatic intraepithelial neoplasia in mice with conditional disruption of the retinoid X receptor alpha allele in the prostate epithelium. *Cancer Res.* 2002;62:4812–9. eng.
56. Li M, Chiba H, Warot X, et al. RXR-alpha ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alterations. *Development* 2001;128:675–88. eng.
57. Tanaka T, De Luca, Luigi M. Therapeutic potential of "retinoids" in cancer prevention and treatment. *Cancer Res.* 2009;69:4945–7. eng.

58. Poon MM, Chen L. Retinoic acid-gated sequence-specific translational control by RAR α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105:20303–8. eng.
59. Austenaa, Liv M I, Carlsen H, Ertesvag A, Alexander G, Blomhoff HK, Blomhoff R. Vitamin A status significantly alters nuclear factor-kappaB activity assessed by in vivo imaging. *FASEB J.* 2004;18:1255–7. eng.
60. Orfanos CE, Zouboulis CC, Almond-Roesler B, Geilen CC. Current use and future potential role of retinoids in dermatology. *Drugs* 1997;53:358–88. eng.
61. Altucci L, Rossin A, Raffelsberger W, Reitmair A, Chomienne C, Gronemeyer H. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat. Med.* 2001;7:680–6. eng.
62. Thé H de, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 1990;347:558–61. eng.
63. Clarke N, Germain P, Altucci L, Gronemeyer H. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med* 2004;6:1–23. eng.
64. Tang X, Gudas LJ. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol* 2011;6:345–64. eng.
65. Reynolds CP. Differentiating agents in pediatric malignancies: retinoids in neuroblastoma. *Curr Oncol Rep* 2000;2:511–8. eng.
66. Esteva FJ, Glaspy J, Baidas S, et al. Multicenter phase II study of oral bexarotene for patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003;21:999–1006. eng.
67. Harant H, Korschineck I, Krupitza G, Fazeny B, Dittrich C, Grunt TW. Retinoic acid receptors in retinoid responsive ovarian cancer cell lines detected by polymerase chain reaction following reverse transcription. *Br. J. Cancer* 1993;68:530–6. eng.
68. Wu S, Zhang ZP, Zhang D, Soprano DR, Soprano KJ. Reduction of both RAR and RXR levels is required to maximally alter sensitivity of CA-OV3 ovarian tumor cells to growth suppression by all-trans-retinoic acid. *Exp. Cell Res.* 1997;237:118–26. eng.
69. Wu S, Zhang D, Donigan A, Dawson MI, Soprano DR, Soprano KJ. Effects of conformationally restricted synthetic retinoids on ovarian tumor cell growth. *J. Cell. Biochem.* 1998;68:378–88. eng.
70. Zhang D, Holmes WF, Wu S, Soprano DR, Soprano KJ. Retinoids and ovarian cancer. *J Cell Physiol* 2000;185:1–20. eng.
71. Kaiser PC, Körner M, Kappeler A, Aebi S. Retinoid receptors in ovarian cancer: expression and prognosis. *Ann. Oncol.* 2005;16:1477–87. eng.
72. Brewer M, Kirkpatrick ND, Wharton JT, et al. 4-HPR modulates gene expression in ovarian cells. *Int. J. Cancer* 2006;119:1005–13.
73. Um SJ, Lee SY, Kim EJ, et al. Antiproliferative mechanism of retinoid derivatives in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 2001;174:127–34. eng.
74. Formelli F, Cleris L. Synthetic retinoid fenretinide is effective against a human ovarian carcinoma xenograft and potentiates cisplatin activity. *Cancer Res.* 1993;53:5374–6. eng.
75. Pisano C, Vesci L, Foderà R, et al. Antitumor activity of the combination of synthetic retinoid ST1926 and cisplatin in ovarian carcinoma models. *Ann. Oncol.* 2007;18:1500–5. eng.
76. Brewer M, Ranger-Moore J, Satterfield W, et al. Combination of 4-HPR and oral contraceptive in monkey model of chemoprevention of ovarian cancer. *Front. Biosci.* 2007;12:2260–8. eng.

77. Kalra RS, Bapat SA. Expression proteomics predicts loss of RXR- γ during progression of epithelial ovarian cancer. *PLoS ONE* 2013;8:PRÜFEN. eng.
78. Palo G de, Mariani L, Camerini T, et al. Effect of fenretinide on ovarian carcinoma occurrence. *Gynecol Oncol* 2002;86:24–7. eng.
79. Bertone ER, Hankinson SE, Newcomb PA, et al. A population-based case-control study of carotenoid and vitamin A intake and ovarian cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2001;12:83–90. eng.
80. Cramer DW, Kuper H, Harlow BL, Titus-Ernstoff L. Carotenoids, antioxidants and ovarian cancer risk in pre- and postmenopausal women. *Int J Cancer* 2001;94:128–34. eng.
81. Huncharek M, Klassen H, Kupelnick B. Dietary beta-carotene intake and the risk of epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of 3,782 subjects from five observational studies. *In Vivo* 2001;15:339–43. eng.
82. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409–35. eng.
83. Nicol C, Yoon M, Ward JM, et al. PPAR γ influences susceptibility to DMBA-induced mammary, ovarian and skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004;25:1747–55.
84. Hutter S, Knabl J, Andergassen U, Jeschke U. The Role of PPARs in Placental Immunology: A Systematic Review of the Literature. *PPAR Res* 2013;2013:8 pages. (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/970276>).
85. Asou H, Verbeek W, Williamson E, et al. Growth inhibition of myeloid leukemia cells by troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma, and retinoids. *Int. J. Oncol.* 1999;15:1027–31. eng.
86. Komar CM. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function – implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3.
87. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7355–9. eng.
88. Monsalve FA, Pyarasani RD, Delgado-Lopez F, Moore-Carrasco R. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:549627. eng.
89. Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2012.
90. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. Present concepts and future outlook: function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression, and therapy of cancer. *J Cell Physiol* 2007;(212):1–12.
91. Koeffler HP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin. Cancer Res.* 2003;9:1–9. eng.
92. Ogino S, Shima K, Baba Y, et al. Colorectal cancer expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG, PPAR γ) is associated with good prognosis. *Gastroenterology* 2009;136:1242–50. eng.
93. Konopleva M, Elstner E, McQueen TJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. *Mol. Cancer Ther.* 2004;3:1249–62. eng.

94. Pignatelli M, Cocca C, Santos A, Perez-Castillo A. Enhancement of BRCA1 gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the MCF-7 breast cancer cell line. *Oncogene* 2003;22:5446–50. eng.
95. Lambe KG, Tugwood JD. A human peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma is activated by inducers of adipogenesis, including thiazolidinedione drugs. *Eur J Biochem* 1996;239:1–7. eng.
96. Zhai Y, Wu R, Schwartz DR, et al. Role of β -Catenin/T-Cell Factor-Regulated Genes in Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas. *The American Journal of Pathology* 2002;160:1229–38.
97. Zhang GY, Ahmed N, Riley C, et al. Enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2004;92:113–9.
98. Vignati, S., Veronica Albertini, Andrea Rinaldi, Ivo Kwee, Cristina Riva, Rita Oldrini, Francesco Bertoni, Giuseppina M Carbone and Carlo Catapano. Cellular and molecular consequences of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in ovarian cancer cells. *NEO* 2006;8:851–61.
99. Davidson B, Hadar R, Stavnes HT, Trope' CG, Reich R. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptors-alpha, -beta, and -gamma in ovarian carcinoma effusions is associated with poor chemoresponse and shorter survival. *Hum. Pathol.* 2009;40:705–13. eng.
100. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J. Clin. Invest.* 2006;116:2062–72. eng.
101. Bettoun DJ, Burris TP, Houck KA, et al. Retinoid X receptor is a nonsilent major contributor to vitamin D receptor-mediated transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.* 2003;17:2320–8. eng.
102. Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X, Porta A. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J. Cell. Biochem.* 2003;88:695–705. eng.
103. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res.* 2010;20:1352–60. eng.
104. Gombart AF, Luong QT, Koeffler HP. Vitamin D compounds: activity against microbes and cancer. *Anticancer Res.* 2006;26:2531–42. eng.
105. Chiang K, C. Chen T. The Anti-cancer Actions of Vitamin D. *ACAMC* 2012;13:126–39.
106. Grant WB, Strange RC, Garland CF. Sunshine is good medicine. The health benefits of ultraviolet-B induced vitamin D production. *J Cosmet Dermatol* 2003;2:86–98. eng.
107. Welsh J. Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012;523:107–14. eng.
108. Mittal MK, Myers JN, Misra S, Bailey CK, Chaudhuri G. In vivo binding to and functional repression of the VDR gene promoter by SLUG in human breast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;372:30–4. eng.
109. Ditsch N, Toth B, Mayr D, et al. The association between vitamin D receptor expression and prolonged overall survival in breast cancer. *J. Histochem. Cytochem.* 2012;60:121–9.
110. Friedrich M., Fersis N., Diesng D., Cordes T., Otte S. von, Diedrich K., ed. The Role of Immunohistochemical Expression of 1, 25-Dihydroxyvitamin-D3-Receptors in Ovarian Carcinoma, In: *Handbook of Immunohistochemistry and in Situ Hybridization of Human Carcinomas: Elsevier, 2005. (; vol. 4).*

111. Friedrich M, Rafi L, Mitschele T, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J. Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2003;164:239–46. eng.
112. Villena-Heinsen C, Meyberg R, Axt-Flidner R, Reitnauer K, Reichrath J, Friedrich M. Immunohistochemical analysis of 1,25-dihydroxyvitamin-D3-receptors, estrogen and progesterone receptors and Ki-67 in ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* 2002;22:2261–7. eng.
113. Silvagno F, Poma CB, Realmuto C, et al. Analysis of vitamin D receptor expression and clinical correlations in patients with ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2010;119:121–4. eng.
114. Cook LS, Neilson HK, Lorenzetti DL, Lee RC. A systematic literature review of vitamin D and ovarian cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2010;203:70–8.
115. Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H. Meta-analysis: Circulating vitamin D and ovarian cancer risk. *Gynecol. Oncol.* 2011;121:369–75. eng.
116. Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 1992;355:446–9. eng.
117. Ditsch N, Vrekoussis T, Lenhard M, et al. Retinoid X receptor alpha (RXR α) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) expression in breast cancer: an immunohistochemical study. *In Vivo* 2012;26:87–92. eng.
118. Stadlmann S, Gueth U, Wight E, Kunz-Schughart LA, Hartmann A, Singer G. Expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma and cyclooxygenase 2 in primary and recurrent ovarian carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 2007;60:307–10. eng.
119. Sakamoto A, Yokoyama Y, Umemoto M, et al. Clinical implication of expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator activated-receptor γ in epithelial ovarian tumours. *Br J Cancer* 2004;91:633–8.
120. Lenhard M, Lennerová T, Ditsch N, et al. Opposed roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors in ovarian cancer survival. *Histopathology* 2011;58:990–4.
121. Lenhard M, Tsvilina A, Schumacher L, et al. Human chorionic gonadotropin and its relation to grade, stage and patient survival in ovarian cancer. *BMC Cancer* 2012;12:2.
122. Zytomed. Das Problem des endogenen Biotins und seine Ursachen, 2008: 3.
123. Kuhn C. Seminar Immunhistochemie. 2010.
124. Zytomed. ZytoChem Plus Polymer Detektionssystem – ein Quantensprung in puncto Sensitivität, 2007: 1.
125. Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987;8:138–40. ger.
126. Ditsch N, Toth B, Mayr D, et al. The Association between Vitamin D Receptor Expression and Prolonged Overall Survival in Breast Cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2012;60:121–9.
127. Kuhn C. Seminar Immunhistochemie. München, 2010.
128. Noll, S., et al. Praxis der Immunhistochemie. Jena: Urban&Fischer, 2000.

129. Chi HC, Chen C, Tsai M, Tsai C, Lin K. Molecular functions of thyroid hormones and their clinical significance in liver-related diseases. *Biomed Res Int* 2013;2013:601361. eng.
130. Vantoros GP, Konstantinopoulos PA, Sotiropoulou-Bonikou G, et al. PPAR-gamma is expressed and NF-kB pathway is activated and correlates positively with COX-2 expression in stromal myofibroblasts surrounding colon adenocarcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006;132:76–84. eng.
131. Chen C, Shen HL, Yang J, Chen QY, Xu WL. Preventing chemoresistance of human breast cancer cell line, MCF-7 with celecoxib. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137:9–17. eng.
132. Ferrandina G, Lauriola L, Distefano MG, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. *J Clin Oncol* 2002;20:973–81. eng.
133. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999;18:7908–16. eng.
134. Li S, Miner K, Fannin R, Carl Barrett J, Davis BJ. Cyclooxygenase-1 and 2 in normal and malignant human ovarian epithelium. *Gynecol. Oncol.* 2004;92:622–7. eng.
135. Matsumoto Y, Ishiko O, Deguchi M, Nakagawa E, Ogita S. Cyclooxygenase-2 expression in normal ovaries and epithelial ovarian neoplasms. *Int J Mol Med* 2001;8:31–6. eng.
136. Kim HJ, Yim GW, Nam EJ, Kim YT. Synergistic Effect of COX-2 Inhibitor on Paclitaxel-Induced Apoptosis in the Human Ovarian Cancer Cell Line OVCAR-3. *Cancer Res Treat* 2014;46:81–92. eng.
137. Kelly MG, Alvero AB, Chen R, et al. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2006;66:3859–68. eng.
138. Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 2001;15:2742–4. eng.
139. Lampiasi N, Azzolina A, Umezawa K, Montalto G, McCubrey JA, Cervello M. The novel NF-kappaB inhibitor DHMEQ synergizes with celecoxib to exert antitumor effects on human liver cancer cells by a ROS-dependent mechanism. *Cancer Lett* 2012;322:35–44. eng.
140. Ahmed N, Riley C, Quinn MA. An immunohistochemical perspective of PPAR β and one of its putative targets PDK1 in normal ovaries, benign and malignant ovarian tumours. *Br J Cancer* 2008;98:1415–24.
141. Li Z, Meng ZH, Chandrasekaran R, et al. Biallelic inactivation of the thyroid hormone receptor beta1 gene in early stage breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62:1939–43. eng.
142. Brönnegård M, Törning O, Böös J, Sylven C, Marcus C, Wallin G. Expression of thyrotropin receptor and thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1994;79:384–9.
143. Puzianowska-Kuznicka M, Krystyniak A, Madej A, Cheng S, Nauman J. Functionally impaired TR mutants are present in thyroid papillary cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:1120–8. eng.
144. Markowitz S, Haut M, Stellato T, Gerbic C, Molkenkin K. Expression of the ErbA-beta class of thyroid hormone receptors is selectively lost in human colon carcinoma. *J. Clin. Invest.* 1989;84:1683–7. eng.

145. Gittoes NJ, McCabe CJ, Verhaeg J, Sheppard MC, Franklyn JA. Thyroid hormone and estrogen receptor expression in normal pituitary and nonfunctioning tumors of the anterior pituitary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82:1960–7. eng.
146. Puzianowska-Kuznicka M, Nauman A, Madej A, Tanski Z, Cheng S, Nauman J. Expression of thyroid hormone receptors is disturbed in human renal clear cell carcinoma. *Cancer Letters* 2000;155:145–52.
147. Lee JW, Chen CL, Juang BT, Chen JY, Yang CS, Doong SL. Elevated expression of thyroid hormone receptor alpha 2 (c-erb A- alpha 2) in nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer* 2000;83:1674–80. eng.
148. Menezes RJ, Cheney RT, Husain A, et al. Vitamin D receptor expression in normal, premalignant, and malignant human lung tissue. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008;17:1104–10. eng.
149. Kim SH, Chen G, King AN, et al. Characterization of vitamin D receptor (VDR) in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2012;77:265–71. eng.
150. Trowbridge R, Sharma P, Hunter WJ, Agrawal DK. Vitamin D receptor expression and neoadjuvant therapy in esophageal adenocarcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* 2012;93:147–53. eng.
151. Ditsch N, Toth B, Himsl I, et al. Thyroid hormone receptor (TR)alpha and TRbeta expression in breast cancer. *Histol. Histopathol.* 2013;28:227–37. eng.
152. Wakim AN, Polizotto SL, Buffo MJ, Marrero MA, Burholt DR. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil. Steril.* 1993;59:1187–90. eng.
153. Asahara S., Sato A., Aljonaid A., Maruo T. Thyroid Hormone Synergizes with Follicle Stimulating Hormone to Inhibit Apoptosis in Porcine Granulosa Cells Selectively from Small Follicles. *Kobe J. Med. Sci.* 2003;49:107–16.
154. Burges A, Brüning A, Dannenmann C, et al. Prognostic significance of estrogen receptor alpha and beta expression in human serous carcinomas of the ovary. *Arch Gynecol Obstet* 2010;281:511–7.
155. Lenhard M, Tereza L, Heublein S, et al. Steroid hormone receptor expression in ovarian cancer: progesterone receptor B as prognostic marker for patient survival. *BMC Cancer* 2012;12:553. eng.
156. Heublein S, Vrekoussis T, Mayr D, et al. Her-2/neu expression is a negative prognosticator in ovarian cancer cases that do not express the follicle stimulating hormone receptor (FSHR). *J Ovarian Res* 2013;6:6. eng.
157. Heublein S, Mayr D, Vrekoussis T, et al. The G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) is a gonadotropin receptor dependent positive prognosticator in ovarian carcinoma patients. *PLoS ONE* 2013;8:e71791. eng.
158. Dian D, Lenhard M, Mayr D, et al. Staining of MUC1 in ovarian cancer tissues with PankoMab-GEX detecting the tumour-associated epitope, TA-MUC1, as compared to antibodies HMFG-1 and 115D8. *Histol. Histopathol.* 2013;28:239–44. eng.
159. Engelstaedter V, Heublein S, Schumacher AL, et al. Mucin-1 and its relation to grade, stage and survival in ovarian carcinoma patients. *BMC Cancer* 2012;12:600. eng.
160. Jeschke U, Wiest I, Schumacher AL, et al. Determination of MUC1 in sera of ovarian cancer patients and in sera of patients with benign changes of the ovaries with CA15-3, CA27.29, and PankoMab. *Anticancer Res.* 2012;32:2185–9. eng.

161. Jeschke U, Mylonas I, Kunert-Keil C, et al. Immunohistochemistry, glycosylation and immunosuppression of glycodelin in human ovarian cancer. *Histochem. Cell Biol.* 2009;131:283–95. eng.
162. Scholz C, Heublein S, Lenhard M, Friese K, Mayr D, Jeschke U. Glycodelin A is a prognostic marker to predict poor outcome in advanced stage ovarian cancer patients. *BMC Res Notes* 2012;5:551. eng.
163. Tsviliana A, Mayr D, Kuhn C, et al. Determination of glycodelin-A expression correlated to grading and staging in ovarian carcinoma tissue. *Anticancer Res.* 2010;30:1637–40. eng.
164. Park JW, Zhao L, Cheng S. Inhibition of estrogen-dependent tumorigenesis by the thyroid hormone receptor β in xenograft models. *Am J Cancer Res* 2013;3:302–11. eng.
165. Kim WG, Zhao L, Kim DW, Willingham MC, Cheng S. Inhibition of tumorigenesis by the thyroid hormone receptor β in xenograft models. *Thyroid* 2014;24:260–9. eng.
166. Guigon CJ, Cheng S. Novel oncogenic actions of TRbeta mutants in tumorigenesis. *IUBMB Life* 2009;61:528–36. eng.
167. Ando S, Sarlis NJ, Oldfield EH, Yen PM. Somatic mutation of TRbeta can cause a defect in negative regulation of TSH in a TSH-secreting pituitary tumor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:5572–6. eng.
168. Ahonen MH, Zhuang YH, Aine R, Ylikomi T, Tuohimaa P. Androgen receptor and vitamin D receptor in human ovarian cancer: growth stimulation and inhibition by ligands. *Int. J. Cancer* 2000;86:40–6. eng.
169. Zhang X, Nicosia SV, Bai W. Vitamin D receptor is a novel drug target for ovarian cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets* 2006;6:229–44. eng.
170. Katsetos C., Stadnicka I., Boyd J., Ehya H., Zheng S., Soprano C., Cooper H., Patchefsky A., Soprano D., Soprano K. Cellular Distribution of retinoic acid receptor-alpha-protein in serous adenocarcinomas of ovarian, tubal and peritoneal origin 1998. *American Journal of Pathology*, 1998;153:469–80.
171. Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL, et al. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 1997;386:407–10. eng.
172. Crowe DL, Chandraratna, Roshantha A S. A retinoid X receptor (RXR)-selective retinoid reveals that RXR-alpha is potentially a therapeutic target in breast cancer cell lines, and that it potentiates antiproliferative and apoptotic responses to peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Breast Cancer Res.* 2004;6:R546-55. eng.
173. Elstner E, Müller C, Koshizuka K, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95:8806–11. eng.
174. Elstner E, Williamson EA, Zang C, et al. Novel therapeutic approach: ligands for PPARgamma and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2002;74:155–65. eng.
175. Singh Ahuja H, Liu S, Crombie DL, et al. Differential effects of rexinoids and thiazolidinediones on metabolic gene expression in diabetic rodents. *Mol. Pharmacol.* 2001;59:765–73. eng.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke für die Überlassung des Themas und die Motivation zu Postervorträgen und Publikationen. Außerdem bedanke ich mich für die geduldige Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Doktorarbeit.

Bei Frau Christina Kuhn möchte ich mich für die Einweisung in die Immunhistochemie bedanken. Außerdem danke ich ihr und Frau Simone Hofmann für die stets geduldige und umfangreiche Beantwortung meiner Fragen. Bei Frau Irmgard Wiest möchte ich mich für die gemeinsame Durchführung meiner ersten immunhistochemischen Färbung bedanken.

Frau Dr. Sabine Heublein und Herrn Christoph Freier danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Dank gilt außerdem meinen Eltern Waltraud und Peter Sattler, die mich während meines gesamten Studiums und meiner Promotion unterstützten, wo sie nur konnten.

Publikationen

Posterpräsentationen:

Thyroidhormonrezeptor THR α 2-Expression als Proliferationsfaktor in Ovarialkarzinomen

Conny Sattler, Christina Kuhn, Simone Hofmann, Sabine Heublein, Irmi Wiest, Klaus Friese, Miriam Lenhard, Nina Ditsch, Udo Jeschke
eingereicht beim BGGF 2012

Thyroidhormonrezeptor THR α 2 als Prognosefaktor beim Ovarialkarzinom des serösen Subtyps

Conny Sattler, Doris Mayr, Sabine Heublein, Christina Kuhn, Simone Hofmann, Irmi Wiest, Klaus Friese, Miriam Lenhard, Nina Ditsch, Udo Jeschke
eingereicht beim DGGG 2012

Anhang

Grading

Böcker, Werner; Denk, Helmut; Heitz, Philipp U.; Moch, Holger (2008): *Lehrbuch Pathologie. 4., Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier.*

G1 Gut differenziert

G2 Mäßig differenziert

G3 Schlecht differenziert

(G4 Undifferenziert/Analplastisch)

Staging

Cannistra, S. A., M.D. *Cancer of the Ovary. N Engl J Med 2004;351:2519–29*

Table 1. Staging System for Epithelial Ovarian Cancer.*

Stage	Characteristics
I	Tumor limited to ovary or ovaries†
A	One ovary involved, without ascites, positive peritoneal washings, surface involvement, or rupture
B	Both ovaries involved, without ascites, positive peritoneal washings, surface involvement, or rupture
C	Ascites, positive peritoneal washings, surface involvement, or rupture present
II	Ovarian tumor with pelvic extension†
A	Involvement of the uterus or fallopian tubes
B	Involvement of other pelvic organs (e.g., bladder, rectum, or pelvic sidewall)
C	Pelvic extension, plus findings indicated for stage IC
III	Tumor involving the upper abdomen or lymph nodes
A	Microscopical disease outside the pelvis, typically involving the omentum
B	Gross deposits ≤2 cm in diameter‡
C	Gross deposits >2 cm in diameter or nodal involvement‡
IV	Distant organ involvement, including pleural space or hepatic or splenic parenchyma§

Protokoll für Antikörper mit der ABC-Methode

1. Entparaffinieren für 20 Minuten in Xylol
2. In 100% Ethanol schwenken
3. Blockieren der endogenen Peroxidase durch 20 Minuten in 3%igem Wasserstoffperoxid in Methanol (=3ml 30%iges Wasserstoffperoxid+ 97ml Methanol)
4. In 100% Ethanol schwenken
5. Nacheinander in 70%, 50% Ethanol schwenken
6. Aqua dest.
7. Demaskierung durch Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf mit Na-Zitratpuffer pH 6,0:
Lsg A: 21,01g 0,1M Zitronensäure + 1l Aqua dest.
Lsg B: 29,41g 0,1M Na-Zitrat + 1l Aqua dest.
Durchführung: Dampfkochtopf mit Puffer füllen und Platte auf Stufe 12 stellen; nach 7 Minuten fängt der Puffer zu kochen an; Schnitte einstellen, Deckel verschließen und Wecker auf 5 Minuten stellen; wenn der 2. Ring des Ventil zu sehen ist, auf Stufe 4 herunterregeln; nach den 5 Minuten Topf in einem Wasserbecken abdampfen lassen, Deckel öffnen und vorsichtig Leitungswasser zu dem Puffer laufen lassen
8. Aqua dest.
9. 2x2 Minuten in PBS waschen
10. 3 Minuten Power Block: 1:10 in Aqua dest. verdünnen (sättigt elektrostatische Ladungen im Gewebe ab und verhindert, dass sich Immunglobuline durch hydrophobe Bindung unspezifisch an Membranen oder Fettgewebe binden; somit wird eine unspezifische Anfärbung verhindert.)
11. Nur abkippen, nicht waschen
12.

PrimärAK RXR 1h bei RT, 1:150 in Power-PBS (1:1000)	PrimärAK VitDR 1h bei RT, 1:100 in Power-PBS (1:100)	PrimärAK PPARγ 16h bei 4°C, 1:1000 in Dako	PrimärAK THRα1/2 1h bei RT, 1:800 in Power-PBS (1:100)
---	--	---	---
13. 2x2 Minuten in PBS waschen
14.

30 Minuten SekundärAK= biotinylierter Link-AK, der den ABC bindet=	
3 Tropfen Normalserum + 1 Tropfen Anti-Mouse-IgG + 10ml PBS	3 Tropfen Goat Normalserum + 1 Tropfen Anti-Rabbit-IgG + 10ml PBS

Währenddessen Ansetzen des ABC (die Lösung muss 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt werden!) 4 Tropfen Reagenz A + 4 Tropfen Reagenz B + 10ml PBS
15. 2x2 Minuten in PBS waschen
16. 30 Minuten ABC
17. 2x2 Minuten in PBS waschen
18. Substratfärbung mit DAB= 1ml Substratpuffer + 1 Tropfen DAB Chromogen (kanzerogen!)

2 Minuten	30 Sekunden	2 Minuten	1 Minute
-----------	-------------	-----------	----------
19. 2x2 Minuten in Aqua dest. um die Farbreaktion zu stoppen
20. 2 Minuten Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer
21. 5 Minuten in Leitungswasser bläuen
22. Aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
23. Eindecken mit Eukitt

Positivkontrolle:

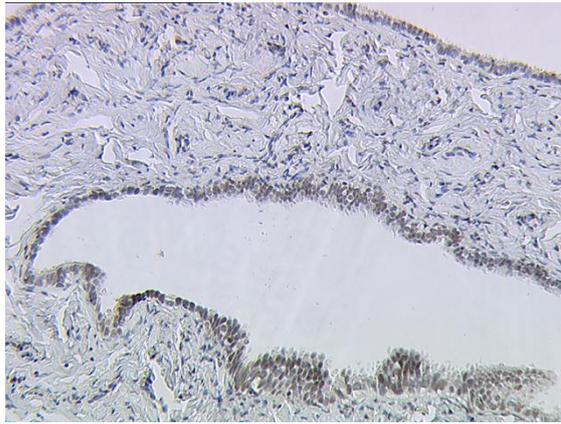
Plazenta 44	Plazenta 4	Reife Plazenta	Struma
-------------	------------	----------------	--------

Protokoll für Antikörper mit der HRP-Polymer-Methode

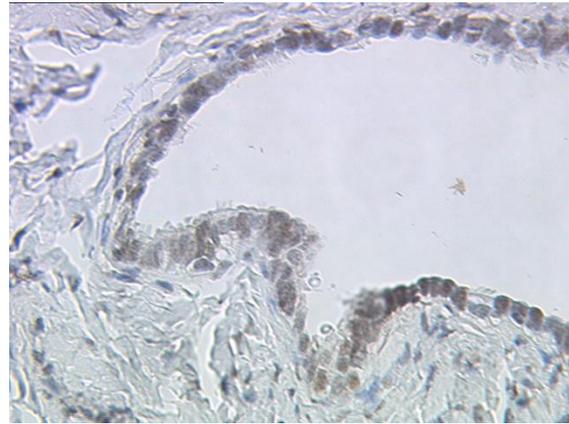
1. Entparaffinieren für 20 Minuten in Xylol
2. In 100% Ethanol schwenken
3. Blockieren der endogenen Peroxidase durch 20 Minuten in 3%igem Wasserstoffperoxid in Methanol (=3ml 30%iges Wasserstoffperoxid+ 97ml Methanol)
4. In 100% Ethanol schwenken
5. Nacheinander in 70%, 50% Ethanol schwenken
6. Aqua dest.
7. Demaskierung durch Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf mit Na-Zitratpuffer pH 6,0:
Lsg A: 21,01g 0,1M Zitronensäure + 1l Aqua dest.
Lsg B: 29,41g 0,1M Na-Zitrat + 1l Aqua dest.
Durchführung: Dampfkochtopf mit Puffer füllen und Platte auf Stufe 12 stellen; nach 7 Minuten fängt der Puffer zu kochen an; Schnitte einstellen, Deckel verschließen und Wecker auf 5 Minuten stellen; wenn der 2. Ring des Ventil zu sehen ist, auf Stufe 4 herunterregeln; nach den 5 Minuten Topf in einem Wasserbecken abdampfen lassen, Deckel öffnen und vorsichtig Leitungswasser zu dem Puffer laufen lassen
8. Aqua dest.
9. 2x2 Minuten in PBS waschen
10. 5 Minuten Blocking Solution (Reagent 1) (sättigt elektrostatische Ladungen im Gewebe ab und verhindert, dass sich Immunglobuline durch hydrophobe Bindung unspezifisch an Membranen oder Fettgewebe binden; somit wird eine unspezifische Anfärbung verhindert) | 3 Minuten Power Block (siehe ABC Protokoll)
11. 2x2 Minuten in PBS waschen
12. PrimärAK **THRα1** 1h bei RT, 1:200 in PBS | PrimärAK **THRα2** 1h bei RT, 1:1000 in PBS | PrimärAK **THRβ1** 1h bei RT, 1:200 in Dako | PrimärAK **THRβ** 1h bei RT, 1:150 in Power-PBS (1:1000)
13. 2x2 Minuten in PBS waschen
14. 20 Minuten Post Block (Reagent 2)
15. 2x2 Minuten in PBS waschen
16. 30 Minuten HRP-Polymer (Reagent 3)
17. 2x2 Minuten in PBS waschen
18. Substratfärbung mit DAB= 1ml Substratpuffer + 1 Tropfen DAB Chromogen (kanzerogen!)
3 Minuten | 1 Minute | 1 Minute | 1 Minute
19. 2x2 Minuten in Aqua dest. um die Farbreaktion zu stoppen
20. 2 Minuten Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer
21. 5 Minuten in Leitungswasser bläuen
22. Aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
23. Eindecken mit Eukitt

Positivkontrolle:

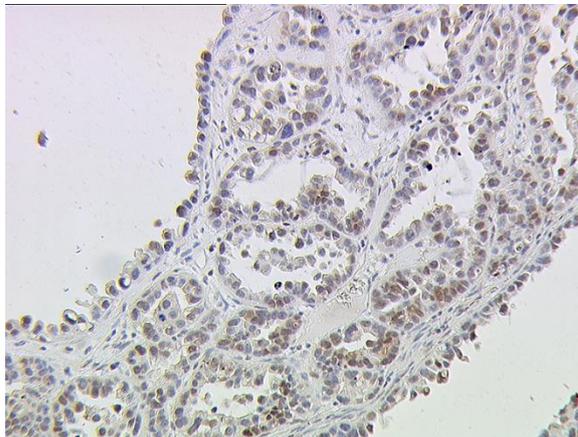
Colon (Patho)	Ma-Ca 3	Ma-Ca 151/94	Plazenta 44a
---------------	---------	--------------	--------------

THRa1 – Immunhistochemische Bilder

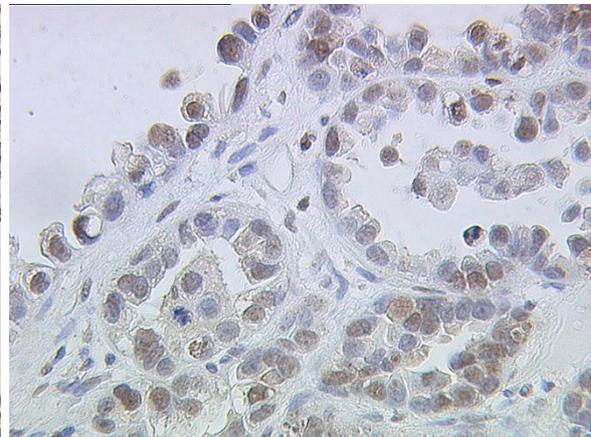
THRa1-Expression im serösen OvCa98, 10-fache Vergrößerung



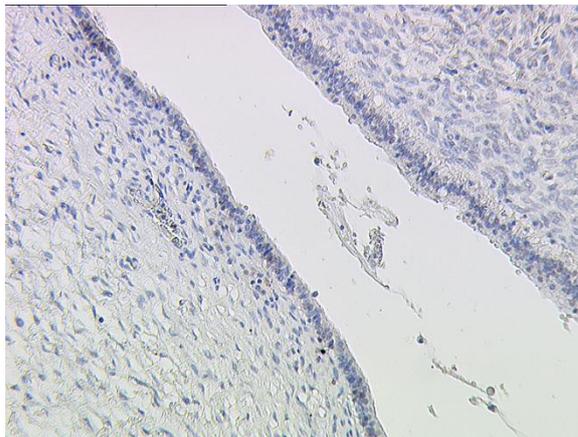
THRa1-Expression im serösen OvCa98, 25-fache Vergrößerung



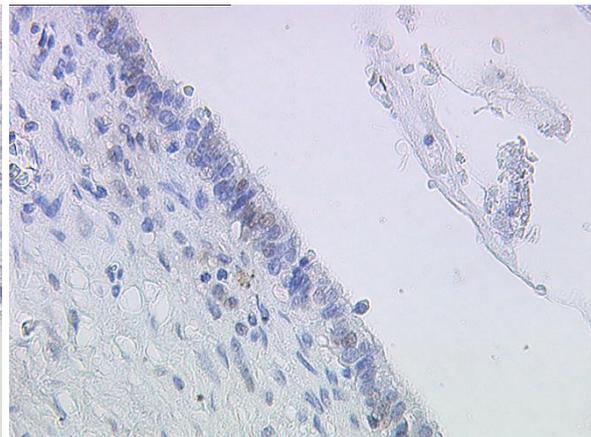
THRa1-Expression im endometrioiden OvCa21, 10-fache Vergrößerung



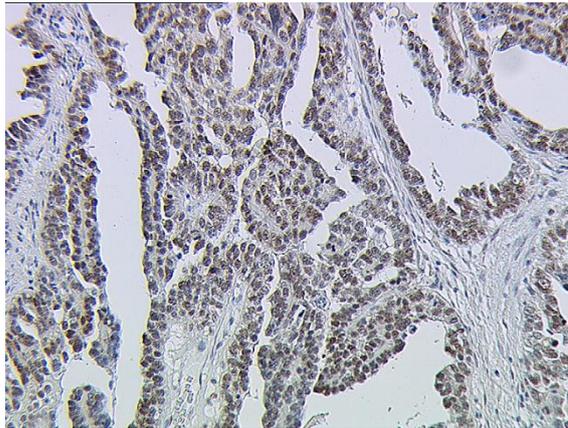
THRa1-Expression im endometrioiden OvCa21, 25-fache Vergrößerung



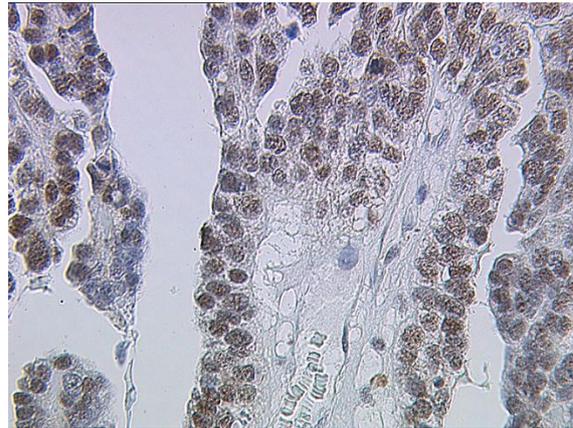
THRa1-Expression im muzinösen OvCa5, 10-fache Vergrößerung



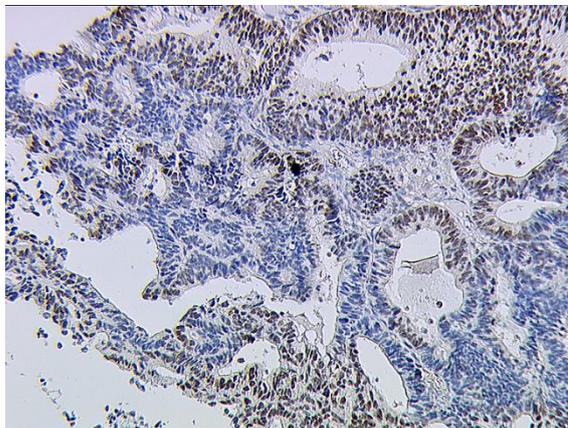
THRa1-Expression im muzinösen OvCa5, 25-fache Vergrößerung

RXR α - Immunhistochemische Bilder

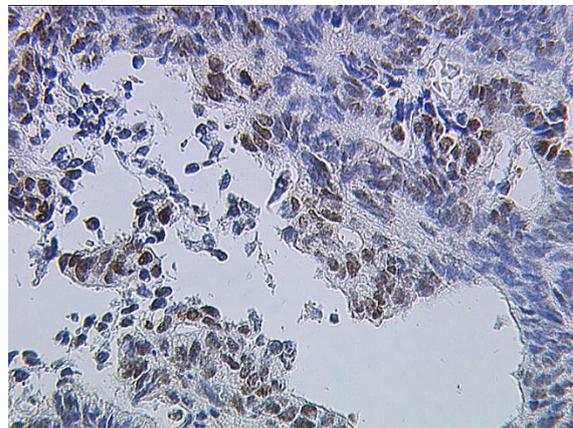
RXR α -Expression im serösen OvCa100, 10-fache Vergrößerung



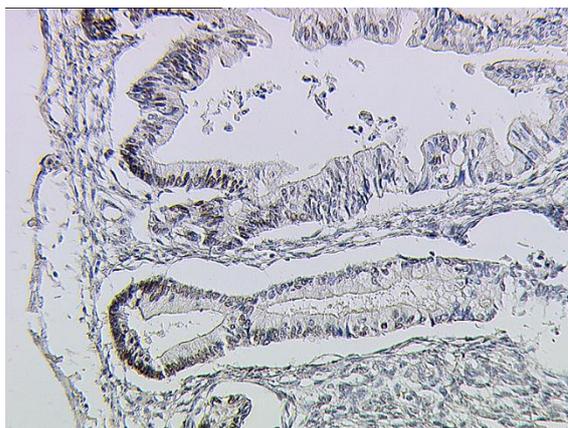
RXR α -Expression im serösen OvCa100, 25-fache Vergrößerung



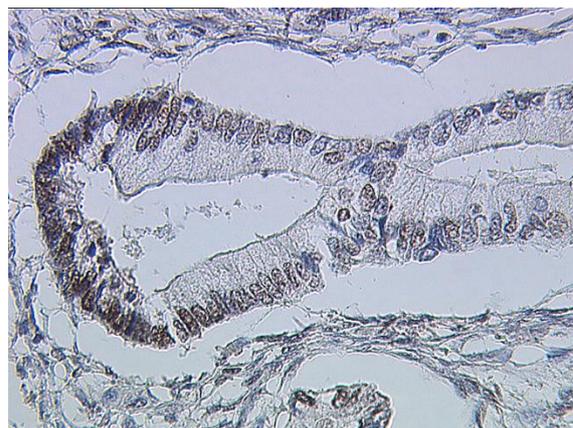
RXR α -Expression im endometrioiden OvCa8, 10-fache Vergrößerung



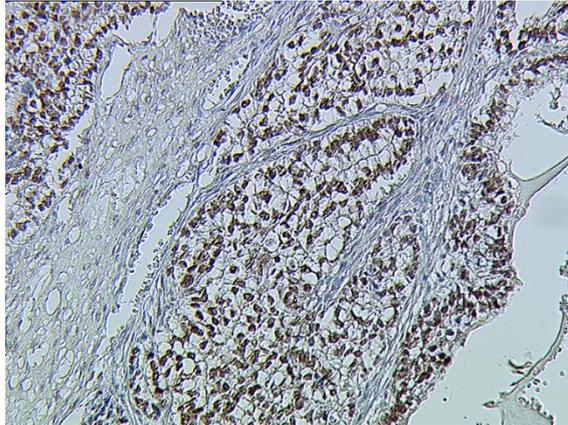
RXR α -Expression im endometrioiden OvCa8, 25-fache Vergrößerung



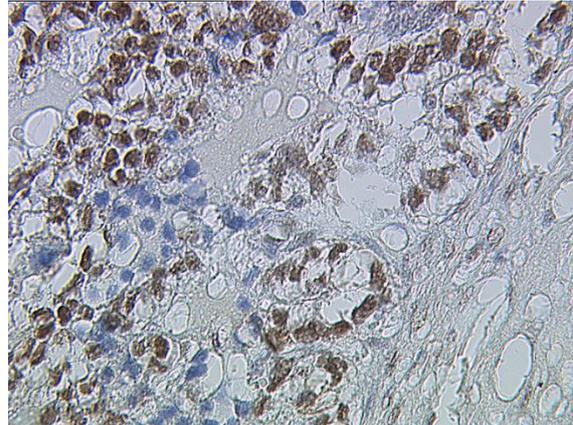
RXR α -Expression im muzinösen OvCa11, 10-fache Vergrößerung



RXR α -Expression im muzinösen OvCa11, 25-fache Vergrößerung

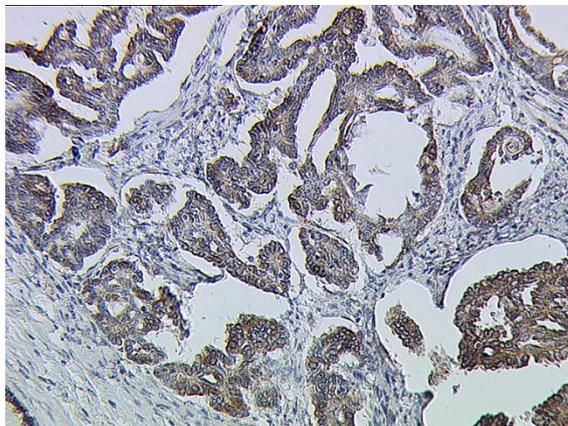


RXRα-Expression im klarzelligen OvCa6, 10-fache Vergrößerung

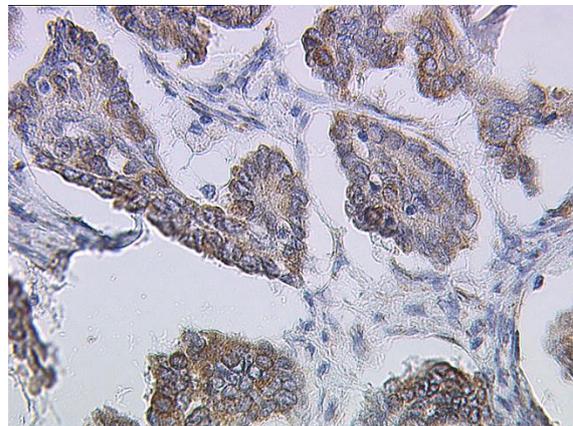


RXRα-Expression im klarzelligen OvCa6, 25-fache Vergrößerung

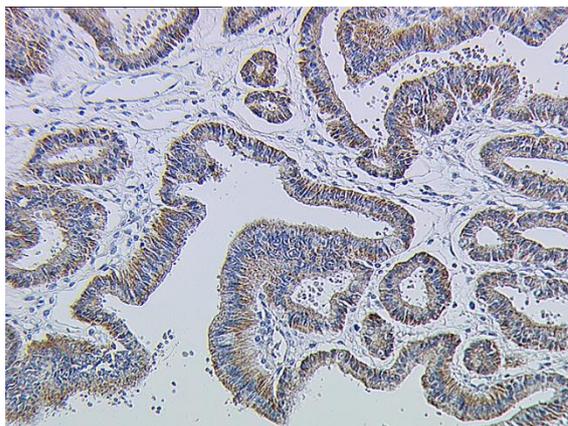
PPAR γ – Immunhistochemische Bilder



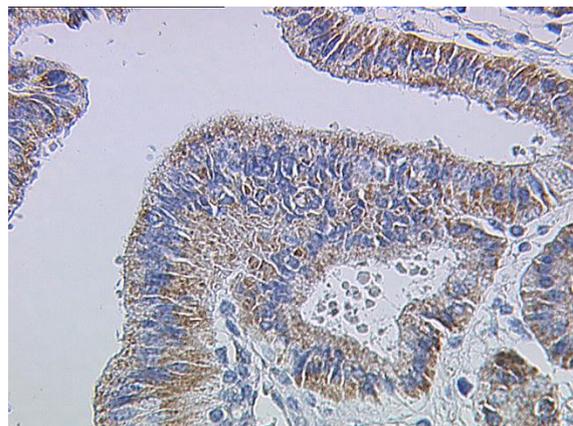
PPAR γ -Expression im serösen OvCa75, 10-fache Vergrößerung



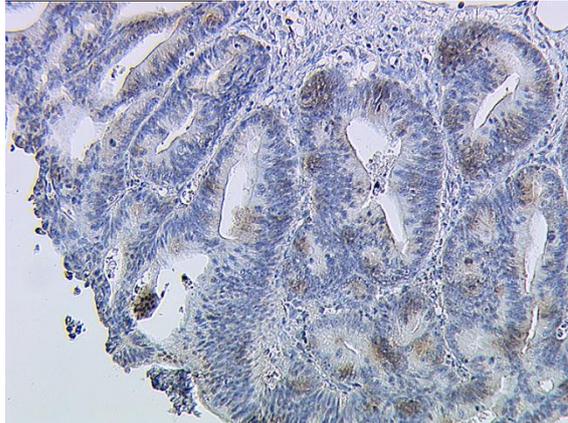
PPAR γ -Expression im serösen OvCa75, 25-fache Vergrößerung



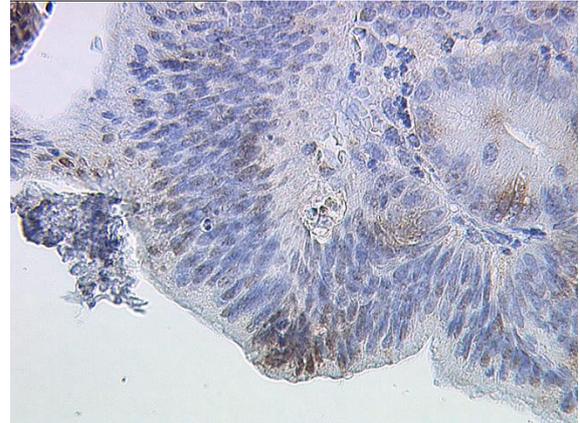
PPAR γ -Expression im endometrioiden OvCa14, 10-fache Vergrößerung



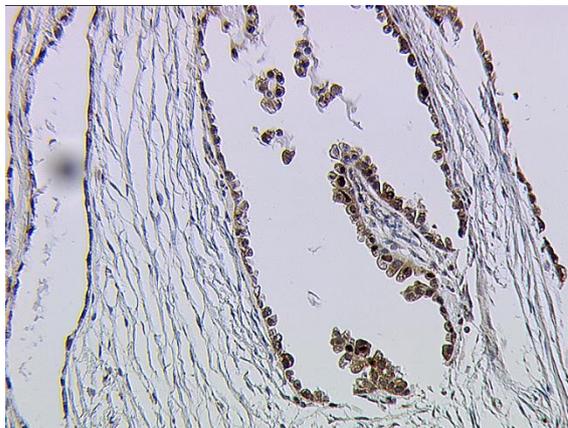
PPAR γ -Expression im endometrioiden OvCa14, 25-fache Vergrößerung



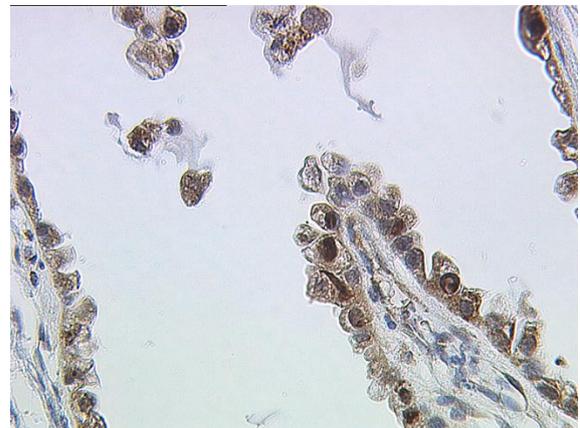
PPAR γ -Expression im muzinösen OvCa10, 10-fache Vergrößerung



PPAR γ -Expression im muzinösen OvCa10, 25-fache Vergrößerung



PPAR γ -Expression im klarzelligen OvCa5, 10-fache Vergrößerung



PPAR γ -Expression im klarzelligen OvCa5, 25-fache Vergrößerung

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Cornelia Sattler, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Expressionsanalyse nukleärer Hormonrezeptoren im Ovarialkarzinom

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Kiel, 26.08.2014

Unterschrift Doktorandin/Doktorand