

Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Thomas Kirchner

**Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) in Karzinosarkomen des
Ovars und Endometriums: Immunhistochemische Untersuchungen mit
Korrelation zum Überleben**

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

vorgelegt von

Carolin Filser
aus Kaufbeuren

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Doris Mayr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag

der mündlichen Prüfung: 25.02.2016

**Für
meine Mutter**

† 2006

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	3
1.1	Karzinosarkome (maligne mesodermale Müllersche Mischtumoren)	3
1.1.1	Karzinosarkom des Uterus	3
1.1.2	Karzinosarkom des Ovars	4
1.1.3	Histopathologie	4
1.1.4	Immunhistochemie	5
1.1.5	Makroskopie	5
1.1.6	Entstehung	7
1.1.7	Klassifikation	8
1.1.8	Risikofaktoren	12
1.1.9	Symptome und Diagnostik	13
1.1.10	Therapie	15
1.2	Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)	16
1.2.1	E-Cadherin	19
1.2.2	ZEB1 und ZEB2	20
1.2.3	Snail	22
1.2.4	P53	25
1.2.5	Interaktion der an der EMT-beteiligten Transkriptionsfaktoren	27
1.3	Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	29
2	Material und Methoden	30
2.1	Material	30
2.1.1	Auswahl des Patientenkollektivs	30
2.1.2	Verbrauchsmaterial	33
2.1.3	Geräte	33
2.2	Grundlagen der Immunhistochemie	34
2.3	Immunhistochemische Färbungen	34
2.3.1	Entparaffinierung	35
2.3.2	Vorbehandlung	35
2.3.3	Blockierung der endogenen Peroxidase	35
2.3.4	Auftragen der Antikörper und Färbung	35
2.3.5	Herstellung des TRIS-Puffers	36
2.4	Mikroskopische Auswertung	36
2.4.1	Remmele-Score oder Immunreaktiver Score (IRS)	37
2.4.2	Fotomikroskopische Beispiele	38
2.5	Statistische Analyse	39

3	Ergebnisse	40
3.1	Auswertbarkeit der Fälle	40
3.2	Ergebnisse ZEB1	40
3.3	Ergebnisse ZEB2	44
3.4	Ergebnisse snail	47
3.5	Ergebnisse p53	51
3.6	Korrelationen zwischen den Transkriptionsfaktoren	56
3.7	Auswertung der Überlebensdaten	57
4	Diskussion	73
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis	82
7	Danksagung	90

1. Einleitung

1.1 Karzinosarkome (maligne mesodermale Müllersche Mischtumoren)

Das Karzinosarkom, auch bekannt als maligner mesodermaler Müllerscher Misch tumor (MMMT), ist ein sehr seltener, hochmaligner Tumor der Frau, der vor allem im Corpus, seltener in der Cervix uteri, und in den Ovarien auftritt. Eine Lokalisation in der Tuba uterina ist ebenfalls möglich.

1.1.1 Karzinosarkom des Uterus

Mittlerweile nimmt man an, dass es sich um eine besonders aggressive Variante des Endometriumkarzinoms handelt¹. Mit einer Prävalenz von 2-3% aller bösartigen Tumoren des Uterus² ist dieser Tumor einer der seltensten bösartigen Geschwülste des weiblichen Genitaltraktes. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren³. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt im frühen Stadium 40-50%, während sie in fortgeschritteneren Stadien auf 25-30% abfällt⁴.

1.1.2 Karzinosarkom des Ovars

Mit ungefähr 2% aller bösartigen Tumore des Ovars handelt es sich beim Karzinosarkom um eine sehr seltene Form des Ovarialmalignoms⁵. Die Tumore sind epithelialen Ursprungs und molekulare Untersuchungen konnten ein monoklonales Wachstumsmuster bestätigen⁶. Zu 80% treten die Tumore in der Postmenopause auf⁷, sie sind hochmaligne und mit einer sehr schlechten Prognose vergesellschaftet. Meist handelt es sich um große (mittlere Größe 14 cm), beidseits entwickelte, zystisch-soliden Tumoren, häufig einhergehend mit Aszites, Peritonealkarzinose und dem Befall benachbarter Organe.⁸ Die mittlere Überlebenszeit beträgt 6-12 Monate⁹. Über 70% versterben bereits innerhalb des ersten Jahres. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt unter 10%¹⁰. Der maligne mesodermale Müllersche Misch tumor wurde zum ersten Mal 1864 von Virchow beschrieben¹¹.

¹ Günthert AR, 2011.

² Hantschmann P, 2008.

³ Hantschmann P, 2008.

⁴ Hantschmann P, 2008.

⁵ Kurman R.J., WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 2014.

⁶ Kurman R.J., WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 2014.

⁷ Remmele, Band 4, 1997.

⁸ Cho SB, Park CM, Park SW et al., 2001.

⁹ Remmele, Band 4, 1997.

¹⁰ DiSilvestro PA et al, 1995; Harris et al., 2003.

¹¹ Ancle Blaustein, Pathology of the female genital tract, 1977.

1.1.3 Histopathologie

Der Tumor besteht, wie sein Name schon sagt, aus einem karzinomatösen und einem sarkomatösen Anteil. In Abhängigkeit von der sarkomatösen Komponente unterscheidet man zwischen **homologen und heterologen** Karzinosarkomen bzw. MMMT. Das homologe Karzinosarkom enthält mesenchymale Elemente, ausgehend von Zellen, die im Uterus beziehungsweise Ovar normalerweise selbst vorkommen, somit also Zellen des endometrioiden oder ovariellen Stromas. Hierbei handelt es sich beispielsweise um fibröses Gewebe oder glatte Muskulatur. Der heterologe Typ hingegen besteht zusätzlich aus Knorpel, Knochen, Fettgewebe oder Skelettmuskulatur¹². Extrem selten hingegen findet man neuroektodermale, melanozytäre, neuroendokrine, rhabdoide oder Dottersack-Differenzierung¹³.

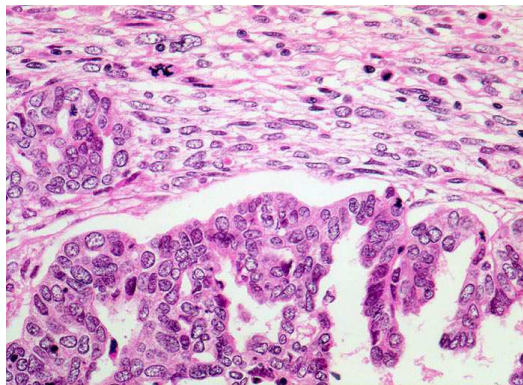


Abb.1: homologer MMMT, Ovar¹⁴

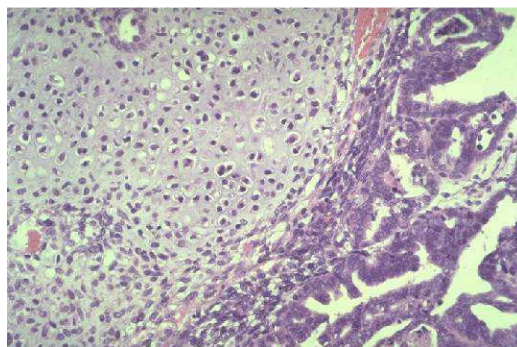


Abb.2: heterologer MMMT, Ovar, mit eingelagertem metaplastischem Knorpelgewebe¹⁵

¹² Horn et al., 2009; Remmele, Band 4, 1997.

¹³ Horn et al., 2009.

¹⁴ <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/getpic-fra.cfm?id=002993>

1.1.4 Immunhistochemie

Epitheliale Anteile des Karzinosarkoms sind positiv gegenüber Zytokeratinen, mesenchymale Anteile gegenüber Vimentin. Zur Sicherung eines rhabdomyo- bzw. chondrosarkomatösen Anteils können Myoglobin, Myo-D1, Desmin und Sarkomer-Actin bzw. S100 von Nutzen sein¹⁶. Die bereits erwähnten seltenen Differenzierungen sind mit entsprechenden Antikörpern ebenfalls nachweisbar. Spezielle immunhistochemische Färbungen sind momentan Inhalt diverser Studien. Hierauf wird jedoch in den Kapiteln 2 und 3 näher eingegangen.

1.1.5 Makroskopie

Makroskopisch weisen MMMT im Durchschnitt ungefähr 9 cm Durchmesser, eine polypöse, seröse Oberfläche mit prominenten Gefäßen und fokalen Einblutungen auf. Die Schnittfläche ist weich, fischfleischartig, häufig auch nekrotisch¹⁷. Die folgenden zwei Abbildungen zeigen beispielhaft das makroskopische Aussehen typischer Karzinosarkome. In Abbildung vier durchsetzt ein faserig fleischiger rotweisser Tumor alle Wandschichten des Uterus und infiltriert Serosa und Vagina.

¹⁵ <http://www2.uni-jena.de/ufk/cdVorlesung/enmmo007ak.jpg>

¹⁶ Horn LC, Dallacker M, Bilek K, 2009.

¹⁷ Horn et al., 2009.



Abb.3: MMMT, Uterus¹⁸

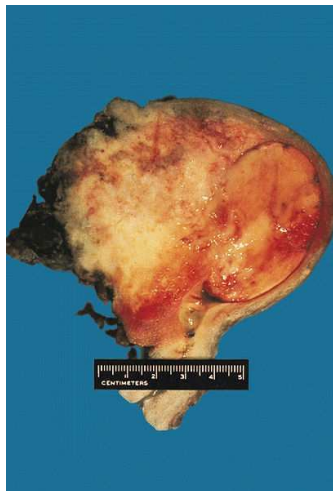


Abb.4: MMMT, Uterus¹⁹

¹⁸ <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/getpic-fra.cfm?id=003676>

¹⁹ <http://peir.net/> PEIR Bild Nr. 402711

1.1.6 Entstehung

Es gibt **vier** verschiedene Theorien zur Entstehung der malignen mesodermalen Müller-schen Mischtumoren²⁰:

1. Die **Kombinationstheorie** besagt, dass die zwei histologischen Komponenten aus einer Stammzelle entstanden sind.
2. In der **Kollisionstheorie** werden die karzinomatöse und sarkomatöse Komponente als zwei voneinander unabhängige Neoplasien angesehen. Das Karzinom stammt dabei aus dem Epithel, das Sarkom aus dem Keimgewebe.
3. Die **Kompositionstheorie** besagt, dass die im Tumor vorkommenden Spindelzellen eine pseudosarkomatöse Reaktion des Stroma auf das Karzinom sind.
4. Bei der **Konversionstheorie** geht man davon aus, dass aus der karzinomatösen Komponente, über die Epitheliale Mesenchymale Transition (EMT), eine sarkomatöse Komponente entstanden ist.

Im Moment deutet alles auf das Zutreffen der letztgenannten, also der Konversionstheorie, hin. Es gibt Studien, die belegen, dass die sarkomatöse Komponente aus der karzinomatösen entstanden ist. Demnach handelt es sich hierbei also um eine Umwandlung einer differenzierten Gewebeart in eine andere²¹. In der aktuellen WHO-Klassifizierung wird den Tumoren ein epithelialer Ursprung zugeschrieben. Übereinstimmende molekulare Veränderungen sowohl in Karzinom- als auch in Sarkomanteilen deuten auf eine monoklonale Herkunft hin. Darüber hinaus ist in der Histologie von Rezidivtumoren und Metastasen meist ein seröses High-grade-Karzinom zu sehen²².

²⁰ Mano MS et al., 2007.

²¹ Brito PA, Silverberg SG, Orenstein JM, 1993; Mayall F, Rutty K, Campbell F, Goddard H, 1994; Horn et al., 2009.

²² Kurman R.J., WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 2014.

1.1.7 Klassifikation

Aufgrund der oben erwähnten neuen Erkenntnisse zur Entstehung von Karzinosarkomen erfolgt die Stadieneinteilung nun nicht mehr nach uterinen Sarkomen, sondern in Analogie zum Endometriumkarzinom²³. Im Jahr 2010 wurde eine neu überarbeitete FIGO/TNM-Klassifikation veröffentlicht, in der ausdrücklich darauf hingewiesen wird, dass Karzinosarkome des Uterus wie Endometriumkarzinome klassifiziert werden sollen. Damit wurde eine Studie von Hanker et Kaufmann aus dem Jahr 2009 wiederlegt, die besagt, MMT gleich den Sarkomen einzustufen.

FIGO/TNM-Klassifikation von MMT

Uterus

TNM-Kategorien	FIGO-Stadien	Definitionen
Tx		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
To		Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Tumor begrenzt auf Corpus uteri
T1a	IA	Tumor begrenzt auf Endometrium oder infiltriert weniger als die Hälfte des Myometriums
T1b	IB	Tumor infiltriert die Hälfte oder mehr des Myometriums
T2	II	Tumor infiltriert das Stroma der Zervix, breitet sich jedoch nicht jenseits des Uterus aus
T3 und/oder N1	III	Lokale und/oder regionäre Ausbreitung wie nachfolgend beschrieben:
T3a	IIIA	Tumor befällt Serosa und/oder Adnexe (direkte Ausbreitung oder Metastasen)
T3b	IIIB	Vaginal- oder Parametriumbefall (direkte Ausbreitung oder Metastasen)
N1	IIIC	Metastasen in Becken- und/oder paraaortalen Lymphknoten
	IIIC1	Metastasen in Beckenlymphknoten

²³ Horn et al., 2009; Horn et al., 2011.

	IIIC2	Metastasen in paraaortalen Lymphknoten
T4	IVA	Tumor infiltriert Blasen- und/oder Rektumschleimhaut
M1	IVB	Fernmetastasen (ausgenommen Metastasen in Vagina, Beckenserosa oder Adnexen, einschließlich Metastasen in inguinalen und anderen intraabdominalen Lymphknoten als paraaortalen und/oder Beckenlymphknoten)

Tab. 1: Klassifikation von Karzinosarkomen des Endometriums²⁴

Ovar

Wie bei der Klassifikation der MMMT des Uterus werden in der Zwischenzeit auch Karzinosarkome des Ovars nicht mehr wie Sarkome eingruppiert, sondern vielmehr als high-grade Ovarialkarzinome mit metaplastischer sarkomatöser Komponente betrachtet und daher wie Karzinome klassifiziert.²⁵ Seit 01.01.2014 gibt es eine Neufassung der FIGO-Stadieneinteilung für das Ovarialkarzinom.²⁶ Änderungen sind in der folgenden Tabelle als Fettdruck hervorgehoben. Eine ergänzende TNM-Klassifikation steht zum aktuellen Zeitpunkt noch aus.

TNM-Kategorien	FIGO-Stadien	Definitionen
Tx		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
To		Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien
T1a	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritoneallavage
T1b	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritoneallavage

²⁴ Die Informationen folgender Tabelle entstammen: Horn et al., 2009 und 2011.

²⁵ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

²⁶ WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 2014.

T1c	IC 1 2 3	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien; Iatrogene Kapselruptur Präoperative Kapselruptur oder Tumor auf der Ovarialoberfläche Maligne Zellen im Aszites oder in der Spülzytologie
T2	II	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
T2a	IIa	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n); keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritoneallavage
T2b	IIb	Ausbreitung auf andere Beckengewebe; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritoneallavage
T2c	IIc	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen in Aszites oder bei Peritoneallavage; Entfällt nach der neuen FIGO-Stadieneinteilung
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonemetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
T3a	IIIA 1 2	Retroperitoneale Lymphknotenmetastasen u/o mikroskopische Metastasen außerhalb des Beckens Ausschließlich retroperitoneale Lymphknotenmetastasen i Metastasen max. 10 mm ii Metastasen größer als 10 mm Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b	IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens; größte Ausdehnung 2cm oder weni-

		ger mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf Leberkapsel und Milz mit ein
T _{3c} u/o N ₁	IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens; größte Ausdehnung mehr als 2cm, u/o retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf Leberkapsel und Milz mit ein
M ₁	IV IVA IVB	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen) Pleuraerguss mit positiver Zytologie Parenchymale Metastasen der Leber u/o der Milz; Metastasen zu außerhalb der Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen u/o anderer außerhalb der Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

Tab. 2: Klassifikation von Karzinosarkomen des Ovars²⁷

Zusätzlich zur TNM/FIGO-Klassifizierung gibt es ein histopathologisches Gradingssystem nach Silverberg. Dieses dreistufige System erlaubt Aussagen über den Differenzierungsgrad von Tumoren und wird bei allen gynäkologischen Karzinomen empfohlen²⁸. Dabei bilden histologische Kriterien wie Architektur, Kernpleomorphie und Mitosezahl einen sogenannten Punkte-Score, mit dessen Hilfe Aussagen über den Differenzierungsgrad gemacht werden können. Der Differenzierungsgrad gibt an, inwieweit die Tumorzellen morphologisch und funktionell vergleichbaren normalen Zellen entsprechen. Dies ist insbesondere für die Prognostik von entscheidender Bedeutung. Je schlechter der Differenzierungsgrad, desto schlechter ist in der Regel die Prognose. Beim malignen Müllerschen Misch tumor handelt es sich meist um einen G₃-Tumor. Neben der histopathologischen Einteilung nach Silverberg gibt es noch ein weiteres Gradingssystem (z.B. nach Malpica et al.). Es ist zweistufig (low- und high-grade) und beschränkt sich primär auf die Zytologie der Tumorzellen, unterstützt von der Anzahl der Mitosen²⁹. Da jedoch molekulare Ähnlichkeiten zwischen serösen

²⁷ Die Informationen folgender Tabelle entstammen: Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

²⁸ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

²⁹ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2014.

Borderlinetumoren und gut differenzierten serösen Karzinomen im Gegensatz zu den schlecht differenzierten serösen Karzinomen festgestellt worden sind, wird nun innerhalb der histologischen Subklassifikation invasiver seröser Karzinome zwischen einem Low- und einem High-grade serösem Karzinom (LGS versus HGS) unterschieden³⁰. Hierzu hat sich das M.D.-Anderson-Gradingssystem als am besten praktikabel erwiesen³¹. Bei Karzinosarkomen besitzt die epitheliale Komponente meistens Charakteristika eines serösen high-grade Karzinoms. Zudem wurde eine Assoziation mit einem serösen intraepithelialen Tubenkarzinom beschrieben.³²

Differenzierungsgrad nach Silverberg

Score	Beschreibung	Differenzierungsgrad
3-5 Punkte	gut differenziert	Grad 1
6-7 Punkte	mäßig differenziert	Grad 2
8-9 Punkte	schlecht differenziert	Grad 3
	kann nicht bestimmt werden	GX
	Tumoren von Borderline-Malignität	GB

Tab. 3: Differenzierungsgrad nach Silverberg

1.1.8 Risikofaktoren

Karzinosarkome weisen aufgrund ihrer Entstehung aus Karzinomen ähnliche Risikofaktoren wie Adenokarzinome des Endometriums und ovarielle Karzinome auf, jedoch scheinen diese bei der Entstehung der Karzinosarkome eine geringere Bedeutung zu haben³³. Hypertension, ein erhöhter „Body Mass Index“, Nullparität sowie Diabetes mellitus stellen solche Risikofaktoren dar³⁴. Rund 15% der Patientinnen zeigen anamnestisch eine pelvine Bestrahlung, mit einer medianen Zeitspanne zwischen Bestrahlung und Diagnose von 1 bis 43 Jahren³⁵. Darüber hinaus steht die Karzinosarkom-Entstehung auch in Zusammenhang mit einer laufenden oder vergangenen Tamoxifen-Therapie³⁶. Jedoch fehlen derzeit Daten, die

³⁰ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2014.

³¹ Malpica et al., 2004; <http://www.springermedizin.de/seroese-tumoren-des-ovars/5163492.html>

³² Brustmann H. 2013.

³³ Horn et al., 2009.

³⁴ Uterine Sarkome und Mischtumoren, Köhler und Evert, 2009, S.158.

³⁵ Horn et al., 2009.

³⁶ Uterine Sarkome und Mischtumoren, Köhler und Evert, 2009, S.158.

einen karzinogenen Effekt von Tamoxifen im Rahmen der Pathogenese von Karzinosarkomen belegen³⁷. Erwartungsgemäß spielen auch genetische Veränderungen eine wichtige Rolle. Am häufigsten konnten bislang Mutationen im TP53-Gen nachgewiesen werden³⁸. Nahezu 50% der Tumore zeigen Veränderungen im PI3K/Akt- und/oder im Ras/Raf- Signalweg³⁹. Darüber hinaus wurde eine Häufung von BRCA2-Mutationen bei Karzinosarkomen beschrieben⁴⁰.

1.1.9 Symptome und Diagnostik

Das häufigste Symptom des uterinen Karzinosarkoms ist die postmenopausale Blutung⁴¹. Die Methode der Wahl für deren Abklärung ist die fraktionierte Abrasio. Als diagnostische Verfahren für die Früherkennung stehen der zytologische Abstrich, die transvaginale Sonographie und die Endometriumbiopsie zur Verfügung. Der Goldstandard zur endgültigen Abklärung einer pathologischen Blutung, einer Postmenopausenblutung, eines pathologischen Abstrichs oder eines abnormen sonographischen Befundes bleibt die Hysteroskopie gefolgt von einer fraktionierten Abrasio⁴². Bei einem sonographisch sehr verdächtigen Befund sollte eine Hysteroskopie jedoch nicht durchgeführt werden, damit kein Tumormaterial mittels Spülung in die Bauchhöhle verschleppt wird. In einem solchen Fall sollte primär mit einer kleinen Curette aus dem Cavum uteri Material entnommen werden⁴³. Weitere Symptome können aufgrund des schnellen Wachstums ein Hämatometra oder Hämatozerivix sein. Der vergrößerte, relativ weiche Uterus ist aber manchmal das einzige Symptom des uterinen Karzinosarkoms⁴⁴.

Das ovarielle Karzinosarkom wird aufgrund des anfänglichen symptomarmen Verlaufs in etwa 70% der Fälle erst in fortgeschrittenen Stadien (FIGO III und IV) diagnostiziert⁴⁵. Typische Beschwerden können Schmerzen im Bereich des Unterbauchs, neu aufgetretener Me-

³⁷ Horn et al., 2009.

³⁸ WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 2014, S.42-43 und S.150-151.

³⁹ WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 2014, S.42-43 und S.150-151.

⁴⁰ WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 2014, S.42-43 und S.150-151.

⁴¹ Uterine Sarkome und Mischtumoren, Köhler und Evert, 2009, S.168.

⁴² Scottish Hysteroscopy Audit Group, 1995.

⁴³ Uterine Sarkome und Mischtumoren, Köhler und Evert, 2009, S.168.

⁴⁴ Uterine Sarkome und Mischtumoren, Köhler und Evert, 2009, S.168.

⁴⁵ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

teorismus, Völlegefühl, Verstopfung, irreguläre Menstruationszyklen oder Müdigkeit sein⁴⁶. In fortgeschrittenen Stadien können auch Symptome wie Zunahme des Bauchumfanges durch Aszites und / oder die Ausbildung von Tumormasse, Harnstau infolge der Raumforderung oder eine ungewollte Gewichtsabnahme beziehungsweise Kachexie sein. Diagnostisches Mittel der Wahl stellt die transvaginale Sonographie (TVS) dar, bei der bereits geringgradige morphologische Veränderungen zu sehen sind⁴⁷. Des Weiteren kann eine Dopplersonographie durchgeführt werden⁴⁸, mit deren Hilfe Vaskularisation und Blutströmungsmuster im Bereich des Tumors beurteilt werden können. Sobald ein Ovarialkarzinom in Betracht gezogen wird, werden bildgebende Untersuchungen im Sinne einer Computertomographie oder Magnetresonanztomographie durchgeführt, um weitere Informationen bezüglich der Ausbreitung und Lokalisation zu gewinnen. Die endgültige Diagnose kann aber erst bei einem chirurgischen Eingriff gestellt werden.

Der Tumormarker CA 125 kann bei beiden Tumorlokalisationen erhöht sein. Es handelt sich um ein hochmolekulares Glykoprotein, welches in erster Linie von serösen Ovarialkarzinomen gebildet wird⁴⁹. Da der Tumormarker auch bei benignen Geschehen, etwa einer Endometriose oder einem Uterus myomatosus, erhöht sein kann, ist er für den Einsatz als Screeningverfahren nicht geeignet⁵⁰. Zur Beurteilung der Tumoraktivität bei Therapie- und Verlaufskontrollen ist die CA 125-Bestimmung jedoch durchaus geeignet. Darüber hinaus werden derzeit andere Tumormarker wie beispielsweise hK5 (human Kallikrein 5), hK11 oder das HE4-Protein auf ihre klinische Wertigkeit überprüft⁵¹.

⁴⁶ Burges A, Schmalfeldt B. 2011.

⁴⁷ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

⁴⁸ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

⁴⁹ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

⁵⁰ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

⁵¹ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

1.1.10 Therapie

Sowohl bei uterinen als auch bei ovariellen Karzinosarkomen ist das primäre Ziel zunächst eine möglichst vollständige chirurgische Resektion. Dabei wirkt sich die Radikalität der Tumorsektion entscheidend auf die Heilungschancen aus⁵². Zahlreiche Studien konnten belegen, dass eine möglichst radikale Primärchirurgie positive Auswirkungen sowohl auf Lebenszeit als auch Lebensqualität hat⁵³. Da Karzinosarkome bereits häufig in frühen Stadien in pelvine und paraaortale Lymphknoten, in die Adnexe, Peritonealhöhle und die Vagina metastasieren, empfehlen viele Autoren auch in den Stadien I und II eine beidseitige Entfernung der Adnexe, eine Hysterektomie sowie eine Resektion des Omentum majus inklusive Lymphknoten⁵⁴. Letzteren wird dabei vor allem eine prognostische Bedeutung zugeschrieben. Karzinosarkome zeigen ein sehr aggressives biologisches Verhalten und in beiden Fällen ein schlechtes Ansprechen auf eine für das Ovarial- bzw. Endometriumkarzinom typische Chemotherapie⁵⁵. Während für eine adjuvante Chemotherapie keine Verbesserung der Überlebensprognose nachgewiesen wurde, ist dagegen eine signifikante Verlängerung des Überlebens in der metastasierten Situation und beim Rezidiv durch eine palliative Chemotherapie zu erreichen⁵⁶. Meist kommen platinhaltige Zytostatika, nach neueren Mitteilungen aber auch Taxane in Kombination zum Einsatz⁵⁷. Eine Verbesserung durch die Gabe von Gemcitabin konnte ebenfalls beobachtet werden⁵⁸. Strahlentherapie scheint keinen Einfluss auf das Überleben zu haben, kann jedoch die Häufigkeit von lokalen Rezidiven verhindern⁵⁹.

⁵² Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

⁵³ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

⁵⁴ Tumormanual: Malignome des Corpus uteri, 2007.

⁵⁵ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010; Tumormanual: Malignome des Corpus uteri, 2007.

⁵⁶ Park JY et al., 2008.

⁵⁷ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

⁵⁸ Tumormanual: Maligne Ovarialtumoren, 2010.

⁵⁹ Uterine Sarkome und Mischtumoren, Köhler und Evert, 2009, S.179-184.

1.2 Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)

Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) beschreibt einen Prozess, bei dem ein Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften stattfindet. Epithelzellen erfahren somit eine Umwandlung zu mesenchymalen Zellen⁶⁰, was man auch als Phänotyptransition bezeichnen kann. So wird z.B. die Zellform flacher und Vimentinfilamente bilden den Hauptanteil an Intermediärfilamenten. Es finden Veränderungen in der Zell-Zell-Adhäsion statt, die sowohl physiologisch in der Embryonalentwicklung als auch pathologisch bei der Tumorprogression eine Rolle spielen⁶¹. So handelt es sich bei der EMT um einen entscheidenden Schritt in der embryonalen Morphogenese, der die Bildung eines dreischichtigen Embryos bei der Gastrulation von Vertebraten ermöglicht⁶². Darüber hinaus ist EMT für die Neuralrohrbildung und Organentwicklung von entscheidender Bedeutung⁶³. Eine Beteiligung bei Wundheilungs- und Entzündungsprozessen konnte ebenfalls nachgewiesen werden⁶⁴. Da 80-90% aller Tumore aus Epithel entstehen, findet auch hier ein sogenannter Wechsel im Phänotyp der Zelle statt: Differenzierte, polarisierte Epithelzellen werden zu mobilen, mesenchymalen Zellen. Dieser Prozess ist insbesondere für die Invasion und Metastasierung maligner Tumore von entscheidender Bedeutung, wenn man bedenkt, dass die Ausbildung von Makrometastasen 90% der Krebsmortalität beim Menschen ausmacht⁶⁵. Für die Etablierung von Metastasen bzw. einer Zellaggregation im Zielgewebe braucht es allerdings noch eine Umkehr des EMT, und zwar eine Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET)⁶⁶ (siehe Abb. 5). Es ist jedoch noch nicht genau geklärt, bei welchen Schritten der Metastasierungskaskade EMT eine Rolle spielt. Möglich ist, dass durch eine Änderung im Phänotyp der Zellen ein Durchbruch der Basalmembran stattfinden kann. Dafür spricht, dass EMT-spezifische Gene an der Invasionsfront primärer Tumore exprimiert werden⁶⁷. Andere Modelle sprechen der EMT eine Funktion bei der Intra- oder Extravasation zu⁶⁸. Da der Prozess der EMT umkehrbar ist (MET), bedeutet dies wiederum, dass die EMT an der Invasionsfront von Tumoren nur zeitweise aktiv ist und durch Faktoren aus der Tu-

⁶⁰ Grunert et al. 2003; Thiery und Sleeman 2006.

⁶¹ Savagner, 2001.

⁶² Thiery, 2002.

⁶³ R&DSYSTEMS, Epithelial to Mesenchymal Transition, 2010.

⁶⁴ Kalluri, Weinberg, 2009.

⁶⁵ Sporn, 1996.

⁶⁶ Thiery, Sleeman, 2006; Grünert et al., 2003; Spaderna, Kirchner et al., 2007.

⁶⁷ Brabletz T, Kirchner T et al, 2005; Gavert et al., 2005; Lee et al., 2006.

⁶⁸ Grünert et al., 2003; Yang et al., 2004.

morumgebung reguliert wird⁶⁹. Bei diesen Faktoren handelt es sich um extrazelluläre Signale oder Wachstumsfaktoren, die über die Aktivierung von Signalwegen intrazelluläre Signalmoleküle induzieren. Dies führt entweder direkt zu einem Umbau des Zytoskeletts oder aber zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die dann wiederum den Abbau oder die Repression von E-Cadherin oder anderen Zelladhäsionsmolekülen bewirken (siehe Abb.6).

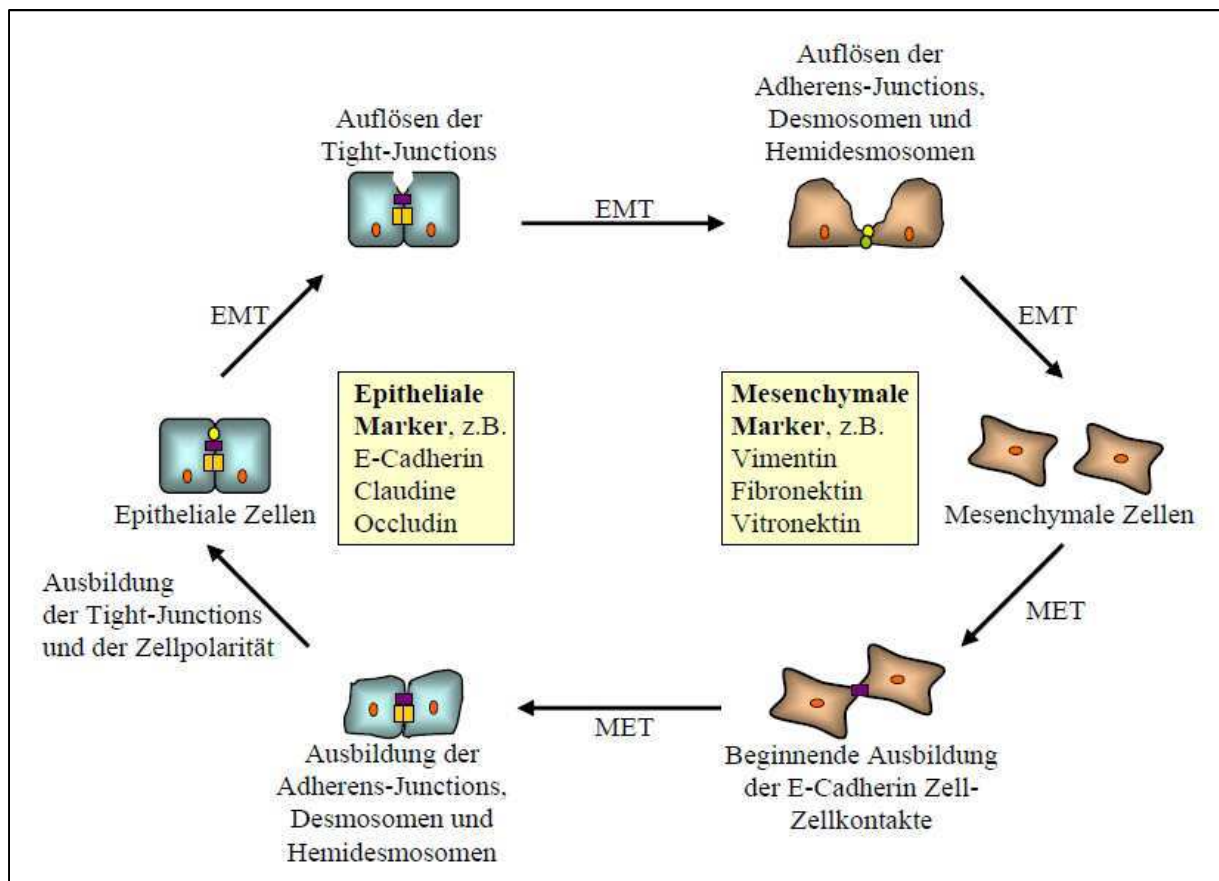


Abb. 5: **Schematische Darstellung der EMT und MET** (nach Thiery und Sleeman 2006) „Während der Epithelialen-Mesenchymalen Transition verlieren Epithelzellen nach und nach ihren epithelialen Charakter und erwerben dabei Eigenschaften des mesenchymalen Phänotyps. Neben dem Auflösen ihrer Zell-Zellkontakte und dem Verlust der Zellpolarität kommt es auch zum Verlust von epithelialen Markern, z.B. E-Cadherin und der Expression von mesenchymalen Markern, z.B. Vimentin. Im Laufe der EMT erwirbt die Zelle mehr und mehr mesenchymale Eigenschaften, wird beweglicher und kann somit in benachbartes Gewebe und die Lymph- bzw. Blutgefäße einwandern. Der Vorgang der EMT ist umkehrbar (MET).“⁷⁰

⁶⁹ Spaderna et al., 2006.

⁷⁰ Thiery, Sleeman, 2006.

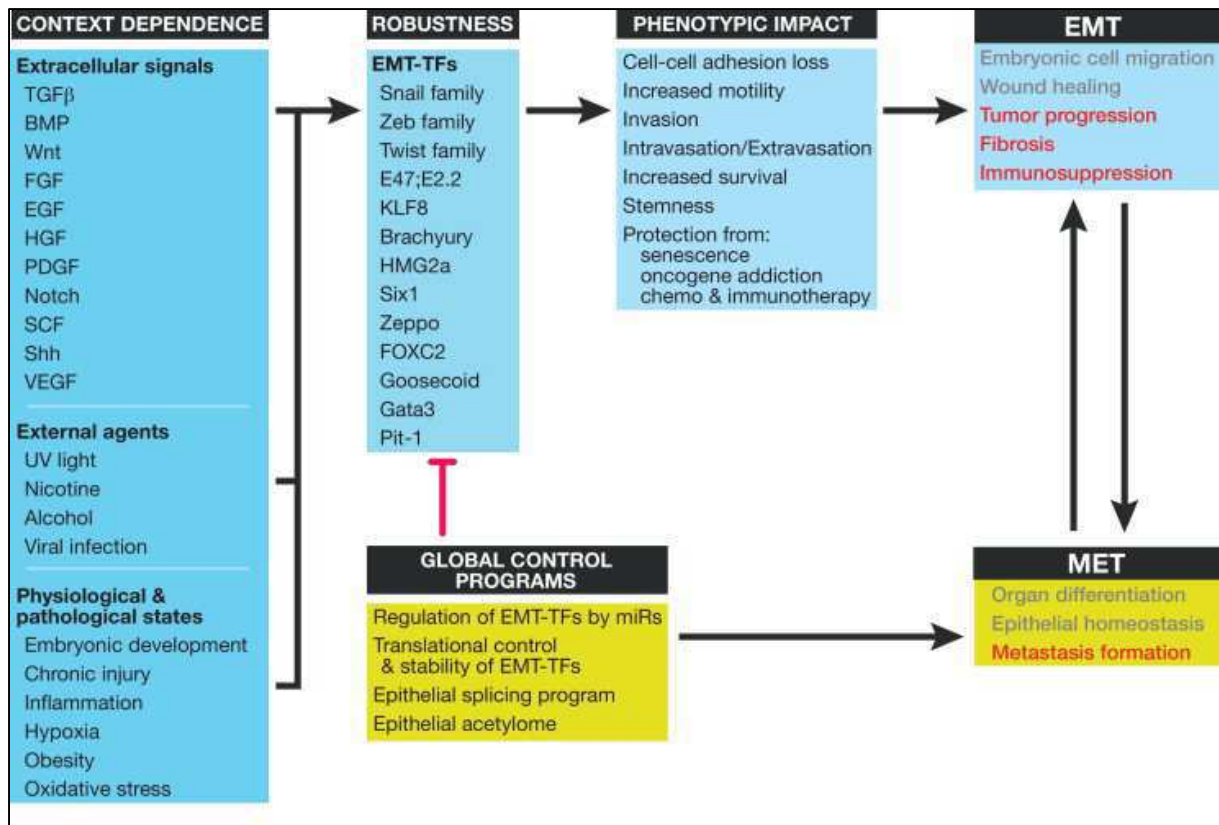


Abb. 6: „EMT-Regulationsmechanismen: Die Epithelial-Mesenchymale Transition kann als dynamischer, häufig auch transientser Prozess verstanden werden. Zahlreiche Signalkaskaden interagieren untereinander, um Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, die den mesenchymalen Phänotyp entstehen lassen bzw. aufrechterhalten. Daneben führen äußere Einflüsse (external agents) sowie physiologische und pathologische Zustände zu einer Induktion bzw. Verstärkung der EMT. Dies geschieht anhand phänotypischer Veränderungen. Das Vorhandensein mehrere Genfamilien fördert außerdem die Widerstandsfähigkeit (robustness) dieses Systems. Kontrollinstanzen (global control programs) wie beispielsweise regulierende mi-RNAs müssen dabei überwältigt oder umgangen werden werden.“⁷¹

Auslöser der EMT sind demnach also transkriptionelle Repressoren, wie die Mitglieder der Snail-Familie, die Transkriptionsfaktoren Snail⁷² und Slug⁷³, Twist⁷⁴, E12⁷⁵, Mitglieder der Familie der Zinkfinger- Homöodomänentranskriptionsfaktoren ZEB1 (ZFHX1a oder ΔEF1)⁷⁶ und ZEB2 (ZFHX1b oder SIP1)⁷⁷. All diese Transkriptionsfaktoren unterdrücken direkt oder indirekt die Expression des membranassoziierten Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, welches ein wichtiger Marker des epithelialen Phänotyps darstellt⁷⁸. Darüber hinaus induzieren sie die Expression von mesenchymalen Markern wie z.B. Vimentin.

⁷¹ Nieto M, Cano A, 2012.

⁷² Cano et al., 2000; Carver et al., 2001.

⁷³ Bolos et al., 2003.

⁷⁴ Yang et al., 2004.

⁷⁵ Perez-Moreno et al., 2001.

⁷⁶ Postigo, Dean, 1997.

⁷⁷ Comijn et al., 2001.

⁷⁸ Spaderna et al., 2008; Yang und Weinberg, 2008.

1.2.1 E-Cadherin

Cadherine sind transmembrane Glykoproteine aus der Gruppe der Adhäsionsproteine. Ihre Funktion besteht hauptsächlich in der Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte, was vor allem für epithiales Gewebe von entscheidender Bedeutung ist. Die Expression der Cadherine unterliegt strengen Kontrollen und jedes Gewebe oder jeder Zelltyp ist durch ein bestimmtes Expressionsmuster gekennzeichnet⁷⁹. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Zellpolarität und Signaltransduktion. E-Cadherin ist das Produkt des CDH1-Gens, welches auf Chromosom 16q22.1 lokalisiert ist⁸⁰, und gilt als Prototyp-Molekül für die gesamte Cadherin-Unterfamilie⁸¹. Eine Verminderung der Transkription des CDH1-Gens durch Promotormethylierung, Genmutation oder veränderte Regulation der Transkriptionsfaktoren führt zu einem Kettenabbruch und somit zur verminderten E-Cadherin-Expression. Wie bereits erwähnt, ist dies ein entscheidender Schritt bei der Einleitung der Epithelial-Mesenchymalen Transition. E-Cadherin besitzt eine intrazelluläre Domäne, welche u.a. β -catenin binden kann⁸². β -catenin ist ein zytoplasmatisches Protein und dient als regulatorische Schaltstelle zwischen transmembranären Cadherinen und den Aktinfilamenten des Zytoskeletts⁸³. Des Weiteren ist es als Signalmolekül im Wnt-Signalweg von entscheidender Bedeutung⁸⁴. Hierbei wird es in den Zellkern transportiert und agiert dort per Bindung an einen Transkriptionsfaktor. Über den Wnt-/ β -catenin-Signalweg erfolgt eine Aktivierung oder Repression zahlreicher Transkriptionfaktoren, die dann wiederum eine EMT einleiten können (siehe Abb. 6). Aktuelle Studien haben gezeigt, dass β -catenin eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung spielt, da man u.a. eine nukleäre Akkumulation an den Invasionsfronten von Kolonkarzinomen festgestellt hat⁸⁵. Darüber hinaus scheint das nukleäre Vorkommen ein wichtiger Prognosemarker bei kolorektalen Karzinomen zu sein⁸⁶.

⁷⁹ Nollet F et al., 2000.

⁸⁰ Takeichi, 1991.

⁸¹ Nollet F et al., 2000.

⁸² Nelson WJ, Nusse R, 2004.

⁸³ Nelson WJ, Nusse R, 2004.

⁸⁴ Nelson WJ, Nusse R, 2004.

⁸⁵ Horst D, 2012.

⁸⁶ Horst D et al., 2009.

1.2.2 ZEB1 und ZEB2

ZEB1 (δ EF1 oder TCF8) und ZEB2 (SIP1 oder smad) sind E-Box-bindende Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die mit regulatorischen Regionen von Zielgenen interagieren. Sie besitzen jeweils zwei Zinkfingergruppen aus drei bzw. vier Zinkfingern, die eine Homöodomäne umschließen⁸⁷ (siehe Abb).

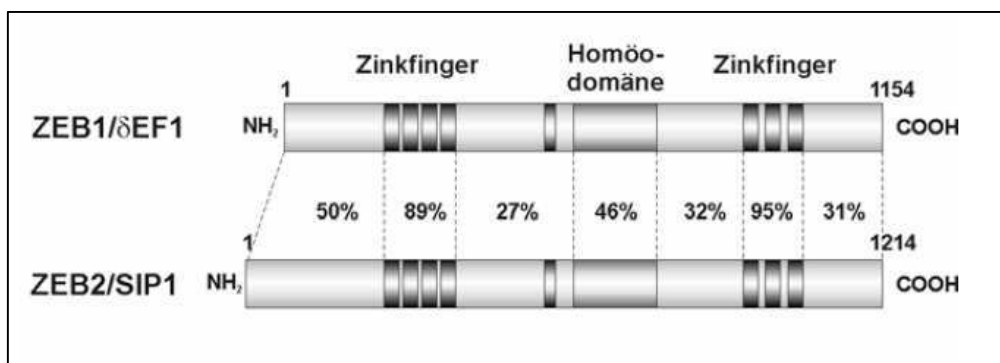


Abb.7: Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktoren ZEB1 und ZEB2 mit ihren wichtigsten Domänen⁸⁸

ZEB1 und ZEB2 dienen als Repressoren der Transkription und sind somit durch die Repression des CDH1-Gens wichtige Regulatoren der Epithelial-mesenchymalen Transition. Beide binden an die E-Box-Elemente im proximalen Promotorbereich des E-Cadherins und inaktivieren dieses auf transkriptioneller Ebene. Neben dem CDH1-Gen werden auch noch andere Gene, die für Proteine von Zell-Zell-Kontakten codieren, via ZEB1 und ZEB2 unterdrückt⁸⁹. Beispiele hierfür sind Gene codierend für Tight junctions, Desmosome oder Gap junctions. ZEB2 reguliert außerdem die Expression von Vimentin in menschlichen Brustkrebszellen, da die Vimentin-Expression mit der ZEB2-Expression übereinstimmt⁹⁰. Auch ZEB1 scheint in der Lage zu sein, mesenchymale Gene hochregulieren zu können⁹¹. Wie genau ZEB1 und ZEB2 Vimentin regulieren, ist unklar. Der Vorgang muss allerdings indirekt erfolgen, da in der Vimentin-Promotor-Region kein 2-teiliges Element vorkommt⁹². Eine Studie aus dem Jahr 2010 besagt, dass ZEB2 nicht ausschließlich im Zellkern maligner Tumorzellen vor-

⁸⁷ Funahashi et al., 1993; Verschuere et al., 1999.

⁸⁸ angepasst nach Postigo, Dean; 2000.

⁸⁹ Vandewalle et al., 2005.

⁹⁰ Bindels S et al., 2006.

⁹¹ Guaita et al., 2002.

⁹² Bindels S et al., 2006.

kommt, sondern auch in deren Zytoplasma⁹³. Es muss also einen bislang unbekanntem Regulationsmechanismus geben, der dazu führt, dass ZEB2 in den Zellkern transportiert wird⁹⁴. Der TGF β -Signalweg scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen, wobei hier ZEB1 und ZEB2 gegensätzlich agieren⁹⁵. Eine Unterdrückung der ZEB1- und ZEB2-Expression durch miRNAs ist ebenfalls nachgewiesen worden⁹⁶ (siehe Abb.).

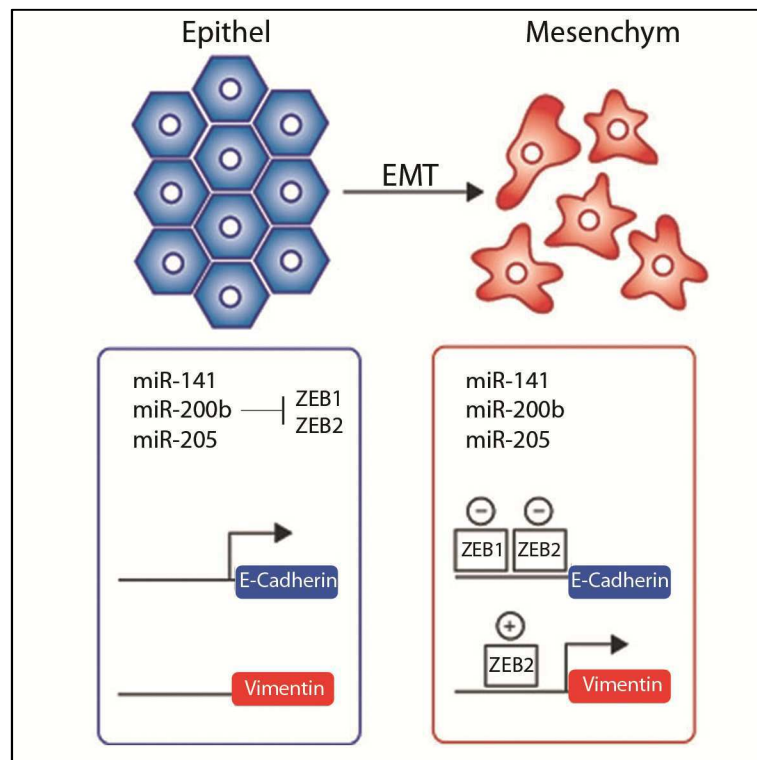


Abb.8: ZEB1 und ZEB2-Regulierung⁹⁷

2007 wurde ZEB2 im Zusammenhang mit EMT zusätzlich eine direkte Repression von Cyclin D1 zugeschrieben⁹⁸. Dies hat ein Fortschreiten des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase zur Folge, was wiederum ein Schutz vor Apoptose darstellt. Darüber hinaus kann ZEB2 eine Hypophosphorylierung des Tumorsuppressors Retinoblastom-Protein(Rb) bewirken⁹⁹, was die Tumorzelle ebenfalls vor einer Eliminierung schützt. In Ovarialtumoren konnte während des Übergangs von benignen zu malignen Tumoren einschließlich der Borderline-

⁹³ Oztas E et al., 2010.

⁹⁴ Oztas E et al., 2010.

⁹⁵ Postigo AA et al., 2003.

⁹⁶ Gregory et al., 2008.

⁹⁷ Miska EA, 2008.

⁹⁸ Mejlvang J et al., 2007.

⁹⁹ Mejlvang J et al., 2007.

Zwischenstufen, ein schrittweiser Anstieg des ZEB2-Vorkommens beobachtet werden¹⁰⁰. Eine ZEB1-Überexpression ist hingegen direkt mit hoher Aggressivität und schlechter Prognose bei Endometriumkarzinomen vergesellschaftet¹⁰¹. Beide Transkriptionsfaktoren scheinen außerdem unter dem Einfluss des Tumorsuppressors p53 zu stehen: Laut einer Studie aus dem Jahr 2011 lässt sich die Epithelial-Mesenchymale Transition per Repression von ZEB1 und ZEB2 durch p53 unterdrücken¹⁰². Hierbei sorgt p53 für eine Hochregulierung sogenannter mi-RNAs, die wie oben bereits erwähnt, die ZEB1- und 2- Expression unterdrücken¹⁰³. Der gleiche Effekt lässt sich auch bei den Tumorsuppressoren p15 und p16 beobachten¹⁰⁴. Umgekehrt kann aber auch ZEB1 auf transkriptioneller Ebene zu einer Repression von p53 führen¹⁰⁵, was Untersuchungen am Ösophagus gezeigt haben. Interessanterweise spielt ZEB1 außerdem eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade von Östrogen¹⁰⁶: Das Hormon induziert die ZEB1-Transkription, ZEB1 aktiviert daraufhin die Transkription nachgeschalteter Zielgene¹⁰⁷. Auf die Hierarchie und gegenseitige Steuerung der einzelnen Transkriptionsfaktoren wird später in Kapitel 1.2.5 ausführlicher eingegangen.

1.2.3 Snail

Snail (*snai1*) ist ebenfalls ein Zinkfingertranskriptionsfaktor, der direkt an die E-Box im E-Cadherin-Promotor binden und dessen Expression auf diese Weise unterdrücken kann. Es besteht aus vier terminalen, DNA-bindenden Zinkfingern und einer N-terminalen regulatorischen Region einschließlich SNAG-Domäne (siehe Abb.). Ebenso wie ZEB1 und ZEB2, kann auch snail mesenchymale Gene wie zum Beispiel das Vimentin- oder Fibronektin-Gen hochregulieren¹⁰⁸.

¹⁰⁰ Yoshida J et al., 2009.

¹⁰¹ Singh M et al., 2008.

¹⁰² Kim T et al., 2011.

¹⁰³ Kim T et al., 2011.

¹⁰⁴ Ohashi S et al., 2010.

¹⁰⁵ Ohashi S et al., 2010.

¹⁰⁶ Dillner NB, Sanders MM, 2004.

¹⁰⁷ Dillner NB, Sanders MM, 2004.

¹⁰⁸ Guaita et al., 2002.

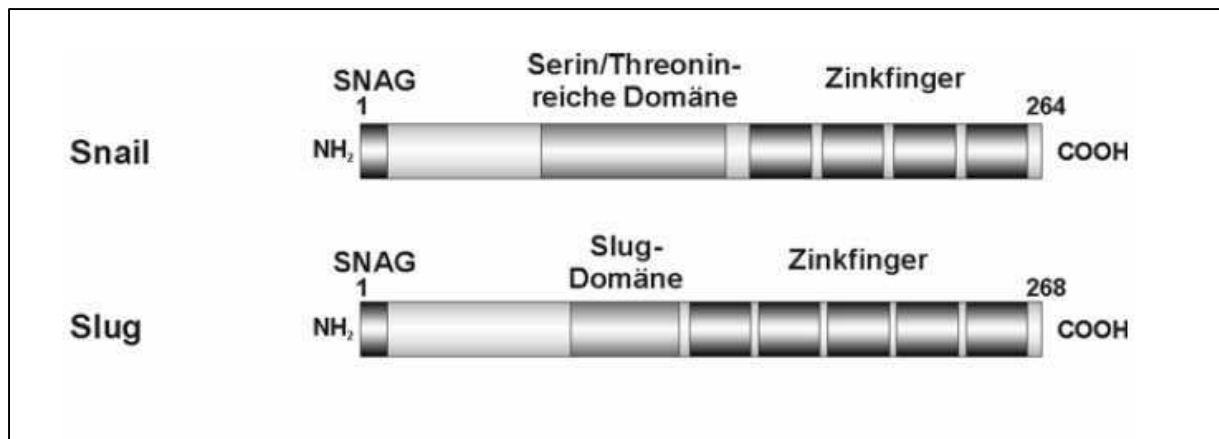


Abb.9: Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktoren snail und slug mit ihren wichtigsten Domänen¹⁰⁹

Snail und slug(snaiz) sind zwei wichtige Vertreter der Snailfamilie, zu der mehr als 50 Transkriptionsfaktoren gehören. Man spricht vor allem snail eine immense Rolle als sogenannter „EMT-Inducer“ zu. Drei E-Box-Elemente mit der Konsensussequenz CAC/GC/GTG, wurden in der regulatorischen Einheit des E-Cadherin-Gens nachgewiesen¹¹⁰. Claudin und Occludin als Bestandteile von Tight Junctions und p53 sind ebenfalls Zielgene von snail. Über eine negative Rückkopplungsschleife ist sogar das snail-Gen selbst Ziel des Transkriptionsfaktors¹¹¹. Analog zu den ZEB-Transkriptionsfaktoren, hemmt auch snail das Fortschreiten des Zellzyklus und die Einleitung der Apoptose, indem die Expression von Zellzyklus-Progressionsfaktoren und Apoptose-Genen unterdrückt wird¹¹². Darüber hinaus werden Zellzyklus-Inhibitoren und Survival-Faktoren von snail induziert¹¹³. Folglich bedeutet dies, Apoptose-Resistenz und Tumor-Progression. Snail fördert die Invasion eines Tumors stärker als das Tumorstadium, da snail-exprimierende Epithelzellen nach der EMT nicht mehr zur Teilung fähig sind¹¹⁴. Es konnte eine Korrelation zwischen der Expression von snail und dem Vorhandensein von Fernmetastasen bei Untersuchungen an Ösophaguskarzinomen nachgewiesen werden, wobei eine Expression von Matrix-Metalloproteinasen von Bedeutung zu sein scheint¹¹⁵. Darüber hinaus konnten snail-positive Brustmalignome mit einer schlechten

¹⁰⁹ angepasst nach Postigo, Dean; 2000.

¹¹⁰ Cano et al., 2000; Batlle et al., 2000.

¹¹¹ Peiro et al., 2006.

¹¹² Christofori G., 2010.

¹¹³ Christofori G., 2010.

¹¹⁴ Vega S. et al., 2004.

¹¹⁵ Usami Y. et al., 2008.

Prognose in Zusammenhang gebracht werden¹¹⁶. Eine snail-Expression wurde vor allem in infiltrierenden duktalem Karzinomen ausfindig gemacht, welche bereits Lymphknoten- oder Fernmetastasen ausgebildet haben¹¹⁷. Snail-Positivität im Stroma von Kolonmalignomen in frühen Stadien soll darüber hinaus ebenfalls ein Indikator für eine schlechte Prognose sein¹¹⁸. Wie bereits erwähnt wird die Aktivität der Transkriptionsfaktoren über zahlreiche Signalmoleküle reguliert. Snail wird vor allem über den Notch-Signalweg aktiviert und via Wnt-Signalweg stabilisiert¹¹⁹.

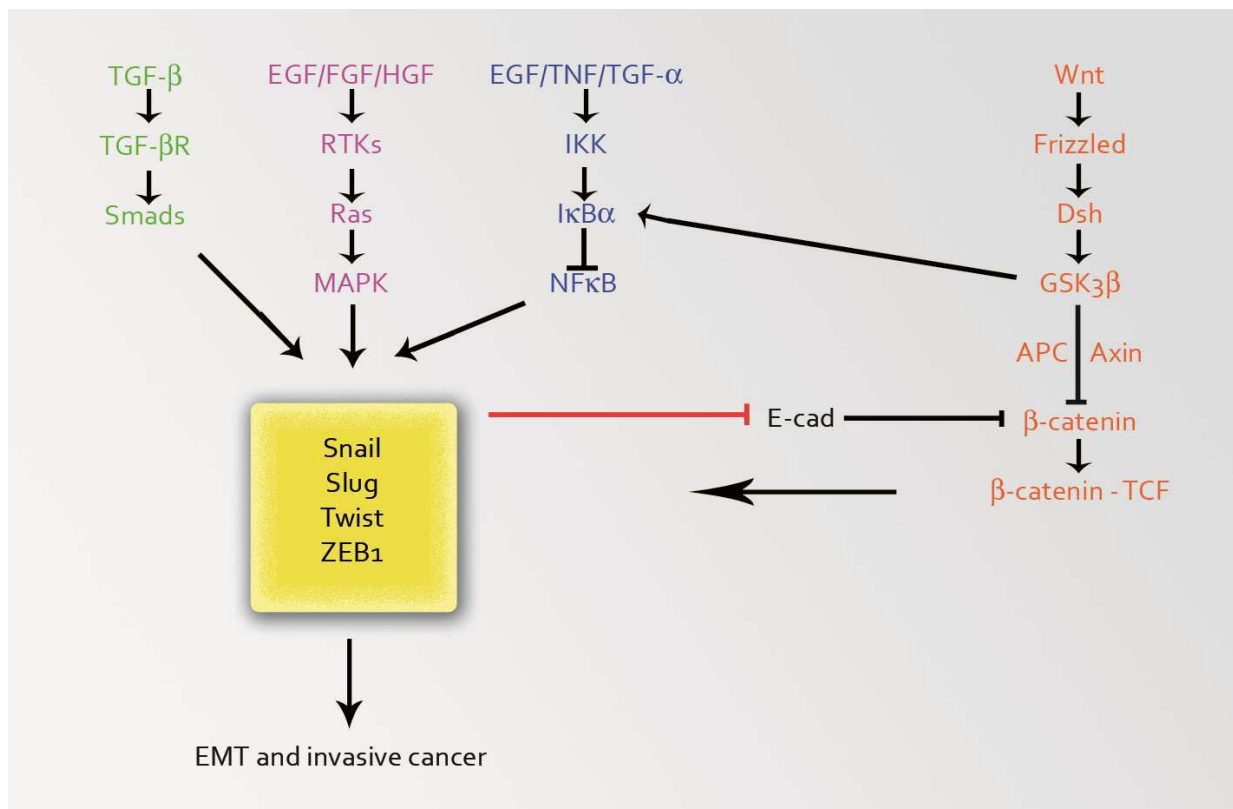


Abb.10: Signalwege, die zur Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren führen¹²⁰

Snail, Slug und andere Transkriptionsfaktoren sind demnach also Ziele der induzierten Signalwege. Sie können transkriptionell, posttranslational oder über die subzelluläre Lokalisierung

¹¹⁶ Polyak, Weinberg, 2009.

¹¹⁷ Hugo HJ et al., 2011.

¹¹⁸ Franci et al., 2009.

¹¹⁹ Yook JI et al., 2005.

¹²⁰ Gavert N, Ben-Ze'ev A, 2008.

nung gesteuert werden¹²¹. Phosphorylierungen mit Hilfe unterschiedlicher Kinasen spielen vor allem bei der posttranslationalen Regulation und der subzellulären Lokalisierung eine entscheidende Rolle. So wird zum Beispiel über eine Glycogen-Synthase-Kinase snail phosphoryliert, ins Zytosol exportiert und proteosomal abgebaut¹²².

1.2.4 p53

Das p53-Protein, auch bekannt als sogenannter „Wächter des Genoms“¹²³, ist ein im Zellkern lokalisierter Tumorsuppressor, mit dem gleichnamigen Tumorsuppressorgen auf Chromosom 17p13¹²⁴, welcher eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Zellwachstums darstellt. P53 kann dabei eine Inhibition des Zellzyklus (Zellzyklus-Arrest) oder die Transkription von Apoptose-Mediatoren hervorrufen¹²⁵, was somit den Zelluntergang zur Folge hat. Vor allem am G1-S-Übergang und am G2-M-Übergang nimmt das Protein seine regulierende Funktion wahr¹²⁶. Darüber hinaus scheint es die Transkription wichtiger DNA-Reperatur-Gene zu induzieren¹²⁷. Die Aktivierung von p53 kann durch zahlreiche Stresssignale hervorgerufen werden. So führt zum Beispiel eine DNA-Schädigung zur p53-Induktion, worauf es direkt an die Promotoren zahlreicher abhängiger Gene binden und somit die Rolle als Transkriptionsfaktor erfüllen kann¹²⁸. Eine Funktion im Cytoplasma als proapoptotischer Faktor wird über anti- und proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie gesteuert¹²⁹. Die medizinische Relevanz wird vor allem dadurch deutlich, dass das p53-Gen in ungefähr 55% aller menschlichen Tumoren mutiert ist¹³⁰. Somatische Mutationen führen dabei zu einer Inaktivierung der Tumorsuppression¹³¹. Auch eine veränderte Expression von p53-Antagonisten oder Co-Faktoren kann die Funktion als Tumorsuppressor massiv stören. So kann zum Beispiel eine Akkumulation des p53-Antagonisten Mdm2 zu einem Export des p53-Proteins aus dem Zellkern ins Cytoplasma führen¹³². Darüber hinaus scheint p53 eine

¹²¹ Barrallo-Gimeno A, Nieto MA, 2005.

¹²² Peinado et al., 2007.

¹²³ Lane DP, 1992.

¹²⁴ Molecular biology of cancer, 2008.

¹²⁵ Molecular biology of cancer, 2008.

¹²⁶ Molecular biology of cancer, 2008.

¹²⁷ Lane DP, 1992.

¹²⁸ Cawley et al., 2004.

¹²⁹ Moll et al., 1998.

¹³⁰ Hollstein et al., 1991.

¹³¹ Pietsch et al., 2006.

¹³² Haupt et al., 1997.

wichtige Rolle bei der Regulierung der Epithelial-Mesenchymalen Transition zu spielen¹³³. So unterstützt ein funktionierendes p53, über die Aktivierung der Translation bestimmter Mikro-RNA, die epitheliale Differenzierung von Zellen. Nebenbei unterdrückt es indirekt die Epitheliale-Mesenchymale Transition via Hemmung EMT-induzierender Faktoren, wie den Transkriptionsfaktor ZEB1¹³⁴ (Abb.7). Ein Verlust der normalen p53-Funktion zeigte eine Zunahme der Teilungsrate potenzieller Tumorstammzellen im Mausmodell¹³⁵. Darüber hinaus ist mittlerweile bekannt, dass sowohl eine Überexpression von mutiertem p53, als auch der Verlust des normalen Wildtyps, zu einem kompletten Funktionsverlust führen können¹³⁶. Dies widerspricht jedoch einigen Studien, die besagen, dass nur mutiertes p53, und kein kompletter Verlust, zu Metastasierung und Invasion von Tumorzellen führt¹³⁷. Es wird vermutet, dass zahlreiche weitere Mechanismen existieren, die über eine Veränderung der p53-Funktion eine EMT und die damit verbundene Invasion und Metastasierung herbeiführen können¹³⁸.

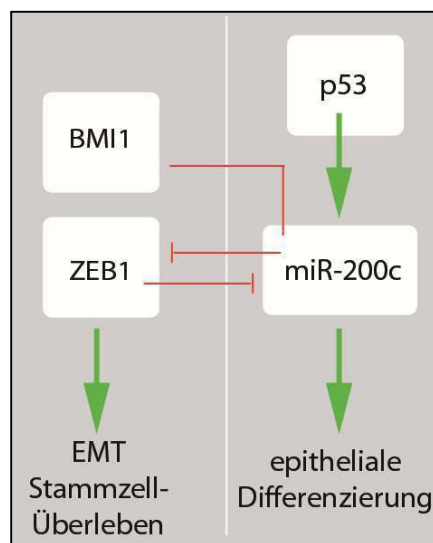


Abb. 11: „ p53 aktiviert die Transkription von miR-200c, ein Mitglied der Mikro-RNA-Familie. ZEB1 und miR-200c hemmen sich gegenseitig in ihrer Expression. Zusätzlich unterdrückt miR-200c indirekt die Translation von Stammzellfaktoren. P53 stimuliert die Expression von miR-200c und führt dadurch zu einer epithelialen Differenzierung. Gleichzeitig hemmt es den Prozess der EMT und die Translation von Stammzellfaktoren. Die Expression von miR-200c kann von malignen Zellen verhindert werden, indem p53 mutiert ist oder abnormale EMT-Faktoren exprimiert werden, was zu einer EMT-Triggerung führt.“¹³⁹

¹³³ Schubert J, Brabletz T, 2011 und Chang et al., 2011.

¹³⁴ Chang et al.; 2011.

¹³⁵ Cicalese et al.; 2009.

¹³⁶ Schubert J, Brabletz T.; 2011.

¹³⁷ Morton JP et al.; 2010.

¹³⁸ Schubert J, Brabletz T.; 2011.

¹³⁹ Schubert J, Brabletz T.; 2011.

1.2.5 Interaktion der an der EMT-beteiligten Transkriptionsfaktoren

Vieles deutet darauf hin, dass es eine Hierarchie zwischen den einzelnen Transkriptionsfaktoren während der Epithelial-Mesenchymalen Transition gibt. Unterschiedliche Bindungsaffinitäten könnten hierfür der Grund sein¹⁴⁰. Obwohl alle Faktoren an sehr ähnliche E-Boxen-Elemente binden, scheinen snail und ZEB2 affiner gegenüber diesen Elementen zu sein als Slug oder ZEB2¹⁴¹. Snail ist außerdem in der Lage, die ZEB1-Expression zu induzieren¹⁴². Die ZEB1-Aktivierung bleibt danach, trotz Abwesenheit von snail, weiter bestehen¹⁴³. Eine Hochregulierung des Transkriptionsfaktors slug scheint ebenfalls ein Ziel von snail zu sein¹⁴⁴, wobei slug einen Dreier-Komplex mit p53 vom Wildtyp und Mdm2 bildet, um wiederum einen Abbau von snail zu erzwingen¹⁴⁵. Mutiertes p53 ist dazu jedoch nicht in der Lage, was eine Steigerung der snail-Expression und damit ein Fortschreiten des Tumors zur Folge hat¹⁴⁶. Snail und slug sind sehr homolog und können sich gegenseitig unter bestimmten Umständen in ihrer Funktion ersetzen¹⁴⁷. Trotzdem scheinen sie unterschiedliche Funktionen zu haben, da am Maus-Modell gezeigt wurde, dass ein snail-Knockout während der Gastrulation tödliche Folgen hat, während Mäuse mit slug-Knockout trotzdem überleben und sogar fertil sind¹⁴⁸. Eine Hochregulierung von slug korreliert signifikant mit einer ZEB2-Expression, was Untersuchungen an intestinalen Tumoren gezeigt haben¹⁴⁹. Diese Tatsache führt zu der Annahme, dass slug und ZEB2 synergistisch bei der Repression des E-Cadherin-Gens agieren. Ebenso wurde auch bei snail und ZEB1 eine ähnliche wechselseitige Beziehung festgestellt¹⁵⁰. Zusätzlich scheint ZEB1 die Expression von slug zu unterdrücken¹⁵¹, was auch Untersuchungen zur embryologischen Entwicklung am Mausmodell gezeigt haben¹⁵².

¹⁴⁰ Peinado et al., 2007.

¹⁴¹ Peinado et al., 2007.

¹⁴² Guaita et al., 2002.

¹⁴³ Guaita et al., 2002.

¹⁴⁴ Boutet et al., 2006.

¹⁴⁵ Wang et al., 2009.

¹⁴⁶ Wang et al., 2009.

¹⁴⁷ Hugo HJ et al., 2011.

¹⁴⁸ Hugo HJ et al., 2011.

¹⁴⁹ Castro Alves et al., 2007.

¹⁵⁰ Guaita et al., 2002.

¹⁵¹ Hugo HJ et al., 2011.

¹⁵² Murray, Gridley, 2006.

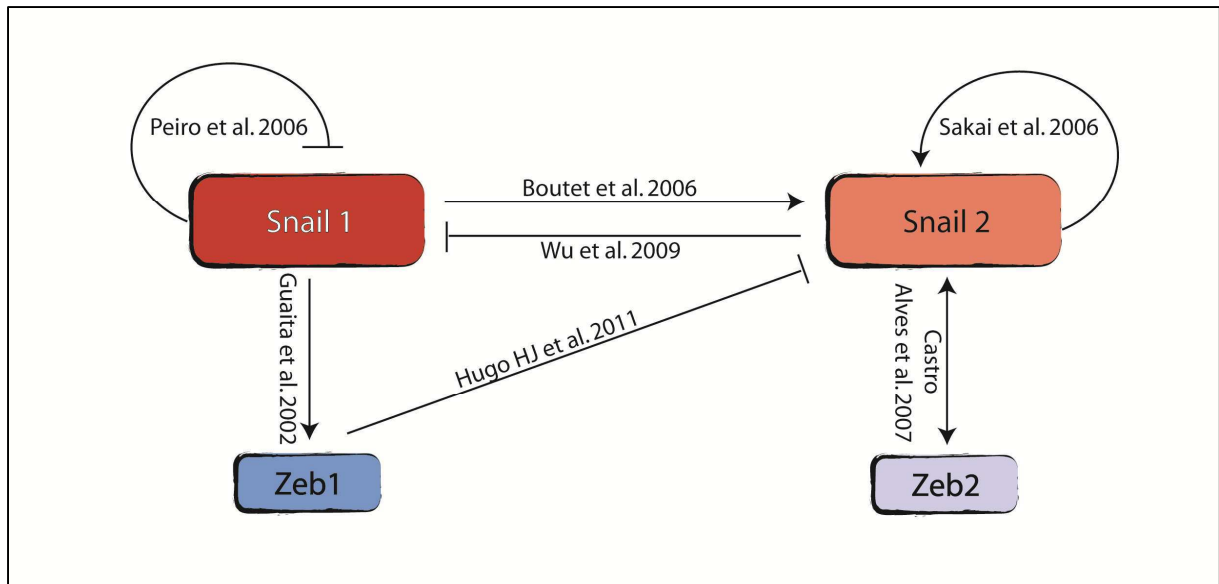


Abb.12: Vereinfachte Darstellung der Interaktionen zwischen E-Cadherin-Repressoren nach Hugo HJ et al., 2011¹⁵³.

Beim Prozess der Epithelial-Mesenchymalen Transition konnte nachgewiesen werden, dass eine initiale snail-Induktion zur Ausbildung anderer Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel slug, ZEB1, ZEB2 oder Twist führt¹⁵⁴. Untersuchungen aus dem Jahr 2011 zeigten drei Tage nach einer snail-, eine ZEB1-Induktion¹⁵⁵. ZEB1 wies dabei den größten Expressionsunterschied zwischen mesenchymalen und epithelialen Zellen auf, was annehmen lässt, dass ZEB1 den mesenchymalen Phänotyp erhalten soll¹⁵⁶.

¹⁵³ Hugo HJ et al., 2011.

¹⁵⁴ Peinado et al., 2007.

¹⁵⁵ Hugo HJ et al., 2011.

¹⁵⁶ Hugo HJ et al., 2011.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Viele Aspekte Maligner Mesodermaler Mischtumore (Karzosarkome) des Ovars und Uterus sind bis heute ungeklärt. So ist beispielsweise die Frage nach der Entstehung dieser Tumore weiterhin Grundlage zahlreicher Diskussionen. Darüber hinaus wurden bisher nur wenig immunhistochemische Untersuchungen an Karzosarkomen des Ovars und Uterus vorgenommen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Beantwortung folgender Fragen zu leisten:

- Sind EMT-typische Transkriptionsfaktoren immunhistochemisch in histologischen Präparaten von Karzosarkomen nachweisbar?
- Gibt es Unterschiede in der Expression dieser Transkriptionsfaktoren zwischen Sarkom- und Karzinomanteilen der Tumore?
- Lassen sich daraus Rückschlüsse bezüglich der Entstehung derartiger Tumore ziehen beziehungsweise können die einzelnen Entstehungstheorien bestätigt oder entkräftet werden?
- Ist es möglich anhand des immunhistochemischen Färbeverhaltens auf andere tumorbiologische Merkmale zu schließen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Auswahl des Patientenkollektivs

Untersucht wurden insgesamt 52 gesammelte Fälle aus dem täglichen Eingang des Instituts für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München aus den Jahren 1988 bis 2005. Es wurde ausschließlich histologisches Material von Patientinnen mit der Diagnose Karzinosarkom bzw. maligner mesodermaler Müllerscher Misch tumor des Ovars oder Endometriums in das Kollektiv aufgenommen. In 32 Fällen befand sich das Malignom im Ovar, ein- oder beidseits, in den restlichen 20 Fällen war es im Uterus lokalisiert. Genau 50% der Karzinosarkome waren heterolog, die anderen 50% homolog differenziert. Die Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 28,8 und 96,9 Jahre alt. Die Stadienverteilung im Patientenkollektiv entsprach der natürlichen Verteilung, was den Abbildungen 13 und 14 zu entnehmen ist. Bei der Graphik Nummer 14 mit dem Titel „FIGOgrob“ wird nur zwischen den Stadien I bis IV unterschieden. Auf eine Unterteilung in a, b oder c wird hierbei zwecks der Übersichtlichkeit verzichtet.

Fall- num- mer	Diagnose- datum	Alter bei Diagnose	Lokalisation O = Ovar U = Uterus	Differenzie- rung 1 = homolog 2 = heterolog	FIGO	Fern- metastasen 0 = keine 1 = vorhanden
1	04.05.1988	62,35	O	2	Ila	0
2	02.03.1990	78,76	O	2	IIIc	0
3	11.02.1993	80,16	O	2		X
4	28.01.1994	86,58	O	2	Ila	0
5	22.04.1994	63,80	O	2	IIIc	0
6	26.07.1994	71,55	O	2	IIIc	0
7	23.06.1994	62,08	O	2	IIIb	0
8	16.09.1994	81,82	O	2	IIIb	0
9	03.12.1997	48,54	O	2	IIIc	0
10	21.08.1997	67,67	O	1	IIIb	0
11	11.03.1998	51,64	U	1	IVb	1
12	23.10.1998	28,80	O	1	IIIc	0
13	23.07.1999	59,86	U	1	Ib	0
14	29.12.1999	63,85	O	1	Ila	0
15	14.03.2000	59,09	O	1	IIIc	0
16	11.04.2000	74,75	O	1	Ila	0
17	25.03.2002	78,52	O	2	IIIb	0
18	23.04.2002	91,15	O	1	Ib	0
19	03.02.2003	68,19	O	2	IIIc	1
20	09.05.2003	67,18	O	1	IIIb	0

21	10.07.2003	48,11	O	1	IIIc	0
22	31.07.2003	72,92	U	1	Ic	0
23	20.08.2003	72,96	O	2	IIIc	0
24	02.04.2004	77,04	U	1	IIIc	0
25	13.04.2004	80,57	U	2	II	0
26	09.06.2004	71,43	U	1	Ib	0
27	05.08.2004	88,36	U	2	Ib	0
28	18.10.2004	60,05	U	2	IVb	1
29	26.11.2004	48,22	O	2	IIIc	0
30	20.01.2005	85,41	U	1	IIIc	X
31	27.01.2005	68,07	O	2	IIIb	0
32	18.03.2005	82,23	O	1	IIIb	0
33	07.04.2005	53,72	O	1	IIIc	0
34	21.04.2005	67,56	O	1	IIIc	0
35	15.06.2005	82,40	U	2	Ib	0
36	18.04.2006	73,88	O	1	IIIc	0
37	08.05.2006	80,17	U	1	IVb	1
38	26.07.2006	58,92	U	1	IVb	1
39	28.08.2006	66,36	U	1	IIIb	0
40	17.01.2007	62,27	O	1	IIIc	0
41	14.02.2007	42,28	O	2	IIIc	0
42	15.05.2007	78,59	U	2	II	0
43	24.05.2007	80,90	U	1	Ic	0
44	24.07.2007	96,92	U	2	Ic	0
45	08.10.2007	76,86	U	2	II	0
46	09.10.2007	76,65	U	1	IVa	X
47	07.12.2007	53,08	O	1	IIIb	0
48	26.02.2008	67,87	O	2	IIIc	0
49	17.04.2008	81,69	O	2	Ic	0
50	27.05.2008	76,35	O	2	IIc	0
51	16.01.2009	70,18	U	1	II	0
52	19.05.2010	74,95	U	2	Ib	0

Tab. 4: Patientenkollektiv

N	Gültig	52
	Fehlend	0
Mittelwert		69,6792
Median		71,4908

Tab. 5: Mittel- und Medianwert des Alters zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

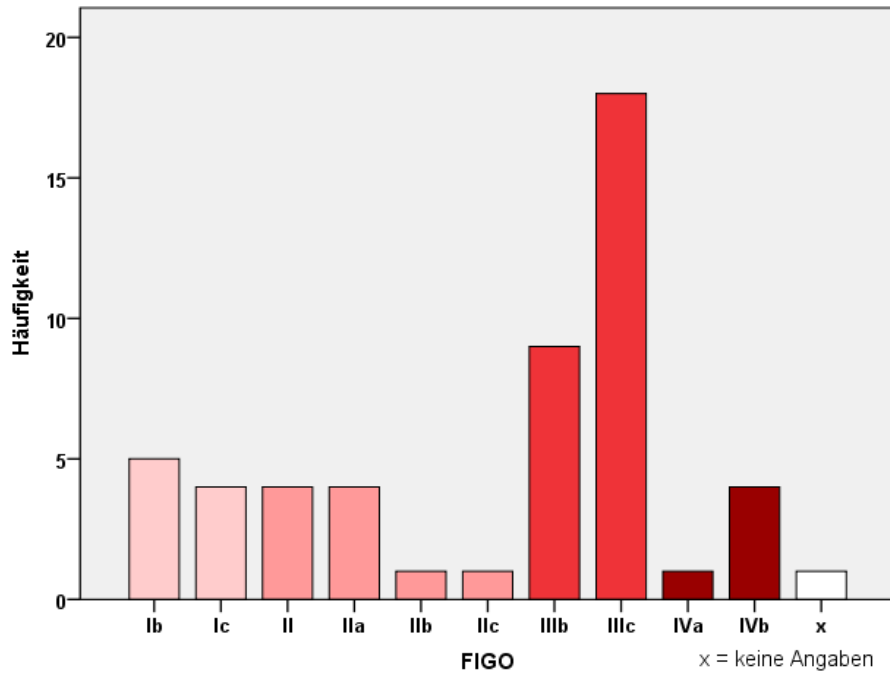


Abb.13: FIGO-Stadien des Patientenkollektivs

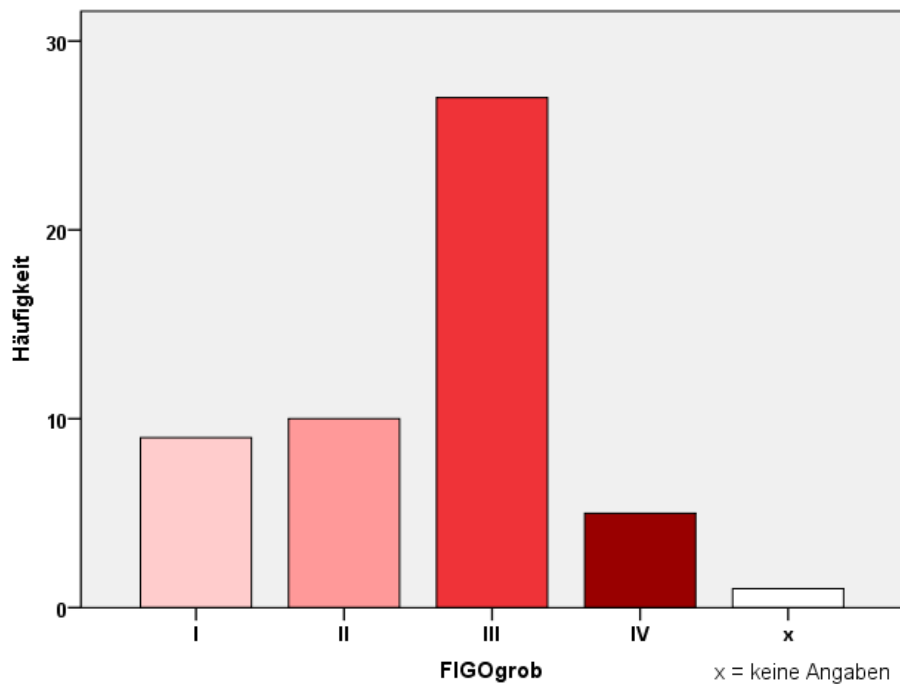


Abb.14: FIGO-Stadien des Patientenkollektivs / grobe Zusammenfassung

Bei der Erstellung des Patientenkollektivs wurden zunächst HE-Schnitte ausgewählt und mit Hilfe des Lichtmikroskops nach Art und Qualität des Präparates genauer selektiert. Danach wurden die zu den ausgewählten HE-Schnitten zugehörigen Paraffinblöcke aus dem Archiv entnommen. Pro Fall wurde der Paraffinblock mit dem repräsentativsten intakten

Tumoranteil ausgewählt. Es wurde vor allem darauf geachtet, dass sowohl Karzinom- als auch Sarkomanteile enthalten sind. Bei den Blöcken handelt es sich um histologisches Material, das in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurde. Daraus konnten wiederum neue Leerschnitte mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms angefertigt werden, die als Grundlage für sämtliche immunhistochemische Färbungen dienten.

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Paraffin	Gold Standard Series Peel-A-Way Micro-Cut Paraffin, Polysciences, Inc., Warrington, USA
Objektträger	Menzel-Gläser Super Frost Plus, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Abdichtklebstoff	Fixogum, Marabuwerke GmbH & Co.KG, Tamm, Deutschland
Eindeckgelantine	Kaisers Glyceringelantine, Merck, Darmstadt, Deutschland

Tab. 6: Verbrauchsmaterial zur Herstellung der histologischen Schnitte

2.1.3 Geräte

Mikrotom	Jung AG, Heidelberg, Deutschland
Mikrowelle	Mikromat Duo, AEG, Deutschland
Zentrifuge	Poly Labo, Straßburg, Frankreich
Pipetten	Eppendorf Reference, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Typ 3047. Köttermann GmbH, Uetze/Häningsen, Deutschland
ph-Meter	Schott Glas, Mainz, Deutschland

Tab. 7: Benötigte Gerätschaften zur Herstellung der histologischen Schnitte

2.2 Grundlagen der Immunhistochemie

Als Immunhistochemie wird eine Methode bezeichnet, bei der Proteine mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden können. Dies ist insbesondere in der medizinischen Histologie von Bedeutung, da auf diese Weise Tumorzellen auf das Vorhandensein bestimmter Antigene untersucht werden können, was wiederum entscheidend für die Klassifizierung und Therapie des Tumors ist. Mit sogenannten „targeted therapies“ versucht man gezielt, tumorspezifische Rezeptoren, Stoffwechselwege oder Ähnliches zu unterdrücken. Es gibt zahlreiche unterschiedliche Methoden, mit denen sich das Antigen nachweisen lässt. Das Reaktionsmuster eines Antikörpers ergibt sich aus der Lokalisation des Antigens. Man unterscheidet die drei Reaktionsmuster zytoplasmatisch, nukleär und membranständig.

2.3 Immunhistochemische Färbungen

Die Färbungen von E-Cadherin (polyklonal, Ratte, Klon EP700Y, Firma Ventana) und p-53 (polyklonal, Maus, Klon DO-7, Firma Ventana) erfolgten automatisiert im Labor des Pathologischen Instituts in München-Großhadern. Aus diesem Grund folgt an dieser Stelle nur für die per Hand gefärbten Tests von ZEB1, ZEB2 und Snail eine ausführliche Beschreibung.

	Antikörper, Klonalität, Tierquelle	Bestell Nummer	Ver- dün- nung	Firma	Detektionssys- tem	Firma	Chromogen
ZEB1	polyklonal, Hase	HPA027524	1:100	Atlas Anti- bodies	Vectastain ABC-Kit	Vector, PK6200	AEC von Invit- rogen (00-1122)
ZEB2	polyklonal, Hase	sc-48789	1:30	santa cruz	ImmPRESS Reagent Kit	Vector, MP-7401	AEC+ von Dako (K3461)
snail	Polyklonal, Hase	AP20370PU--N	1:80	Acris	Vectastain ABC-Kit	Vector, PK6200	AEC+ von Invit- rogen (K3461)

Tab. 8: Übersichtstabelle

2.3.1 Entparaffinierung

Da die anzufärbenden Schnitte in Paraffin eingebettet vorlagen, mussten sie für den folgenden Färbeprozess erst entparaffiniert werden. Dazu wurden sie 30 Minuten mit Xylol inkubiert und danach 10 Minuten in Ethanol ausgewaschen, um das Xylol wieder zu entfernen. Anschließend erfolgte die Lufttrocknung.

2.3.2 Vorbehandlung

Eine Vorbehandlung, die der Demaskierung der Antigene dient, erfolgte mit Pro Taqs IX Antigen Enhancer von der Firma Quartett (Bestellnummer: 401603692) in der Mikrowelle für 2 x 15 Minuten bei 750 Watt. Danach ließ man die Präparate bei Raumtemperatur 20 Minuten abkühlen. Anschließend folgten zwei Spülungen mit TRIS-Puffer (siehe unten) à 5 Minuten, um den pH-Wert auszugleichen.

2.3.3 Blockierung der endogenen Peroxidase

Da im folgenden Schritt die Peroxidase sichtbar gemacht werden sollte, wurde die gewebe-eigene Peroxidase gehemmt, um eine diffuse Anfärbung des Gewebes zu verhindern. Hierzu war es notwendig die Schnitte bei Raumtemperatur 10 Minuten mit 7,5 % Wasserstoffperoxid-Lösung zu behandeln und anschließend ebenso lange unter fließendes Wasser zu halten. Danach wurde erneut 2 x 5 Minuten mit dem TRIS-Puffer gespült. Es folgte eine 20-minütige Behandlung mit dem blocking serum aus dem jeweiligen Kit (siehe Tabelle). Dabei war stets darauf zu achten, dass die Überstände abgekippt wurden.

2.3.4 Auftragen der Antikörper und Färbung

Den Präparaten musste nun der jeweilige Primär-Antikörper mit der entsprechenden Verdünnung (ZEB1 1:100; ZEB2 1:30; snail 1:80) hinzugefügt werden. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und dauerte 60 Minuten. Danach war wieder eine Spülung mit TRIS-Puffer-Lösung für den Zeitraum von 2 x 5 Minuten indiziert. Es erfolgte nun die 30-minütige Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper aus dem jeweiligen Kit samt anschließender 2 x 5-minütiger Spülung mit TRIS-Puffer. Daraufhin wurde das entsprechende Chromogen für 10 Minuten aufgetragen und danach weitere 10 Minuten unter fließendem Wasser gespült, um Farbeüberschüsse zu entfernen. Nun musste noch eine Gegenfärbung mit Hematoxylin Gill's Formula von der Firma Merck (Bestellnummer: 1.09242.0100) für 10 Sekunden durchgeführt werden, der eine 10-minütige Wässerung folgte. Zum Schluss wurden die Präparate

mit dem wässrigen Eindeckmedium Kaisers Glyceringelantine von der Firma Merck (Bestellnummer: 1.09242.0100) überzogen und mit einem Deckglas versehen.

2.3.5 Herstellung des TRIS-Puffers

Zur Herstellung des TRIS-Puffers wurden jeweils 43,9 Gramm Natriumchlorid, 34,25 Gramm Trizma Hydrochlorid und 4,5 Gramm Trizma base in 5 Liter Wasser gegeben. Nachdem die drei Lösungen zusammengefügt worden sind, sollte der pH-Wert des so entstandenen Puffers **genau 7,5** sein.

2.4 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops der Firma Carl Zeiss AG. Dabei lag der Fokus vor allem auf der Lokalisation positiver Zellen im Tumorgewebe, da der begründete Verdacht bestand, dass es Unterschiede in der Expression der Transkriptionsfaktoren gibt, was die epithelialen und mesenchymalen Anteile betrifft. Darüber hinaus wurde die Färbeintensität der positiven Zellen bewertet, wobei zwischen stark, mittel und schwach positiv unterschieden wurde. Wie oben bereits erwähnt, wurde auch das Reaktionsmuster des Antikörpers beurteilt. Jeder Färbung wurde eines der drei Muster cytoplasmatisch, nukleär oder membranständig zugeteilt. Die Auswertung der Snail- und p53-Färbungen erfolgte mit Hilfe des sogenannten Remmele-Scores. Dabei wurden an den 52 Präparaten durch semiquantitative Schätzungen die Kriterien dieses Scores bestimmt. Ursprünglich entwickelt wurde dieses Wertungssystem 1986 zur Bestimmung des Östrogenrezeptor-Status¹⁵⁷. Seitdem wurde der Remmele-Score auf zahlreiche andere immunhistochemische Verfahren übertragen und gilt als eine anerkannte Bewertungsgrundlage¹⁵⁸.

¹⁵⁷ Remmele und Stegner, 1987.

¹⁵⁸ Gohring U.J., Scharl A., Ahr A., 1996; Beckmann W:M., Niederacher D., Massenkeil G., Tutschek B., Beckmann A., Schenko G., Schnürch H.G. Bender H.G., 1996.

2.4.1 Remmele-Score oder Immunreaktiver Score (IRS)¹⁵⁹

Färbeintensität (staining intensity = SI)	Score
keine Färbung nachweisbar	0
geringe Färbeintensität der Kerne	1
mäßige Färbeintensität der Kerne	2
starke Färbeintensität der Kerne	3

Tab.9: Färbeintensität

Anzahl positiver Zellen (PP)	Score
keine positiven Kerne nachweisbar	0
weniger als 10 % positive Zellen (Kernfärbung)	1
10 - 50 % positive Zellen (Kernfärbung)	2
51 - 80 % positive Zellen (Kernfärbung)	3
mehr als 80 % positive Zellen (Kernfärbung)	4

Tab.10: Anzahl positiver Zellen

Der Immunreaktive Score (IRS) wird aus dem Produkt der Färbeintensität (SI) und der Anzahl positiver Zellen (PP) errechnet, sodass das Ergebnis einen Wert zwischen 0 und 12 haben kann. Scores bis einschließlich 2 Punkte werden als negativ, alle darüber liegenden Werte als positiv angesehen.

IRS	Bedeutung
0	keine Expression
1-3	geringe Expression
4-8	mäßige Expression
9-12	starke Expression

Tab.11: Immunreaktiver Score

¹⁵⁹ Remmele Band 4, 1997, S.259.

2.4.2 Fotomikroskopische Beispiele

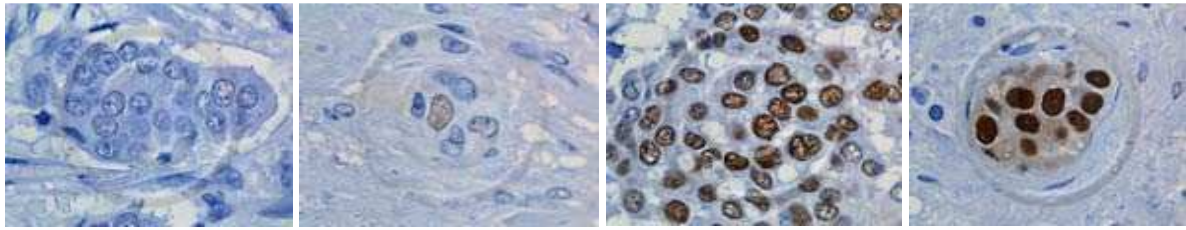


Abb. 15, 16, 17, 18: Färbintensität in aufsteigender Reihenfolge von links nach rechts¹⁶⁰ (SI o - 3)

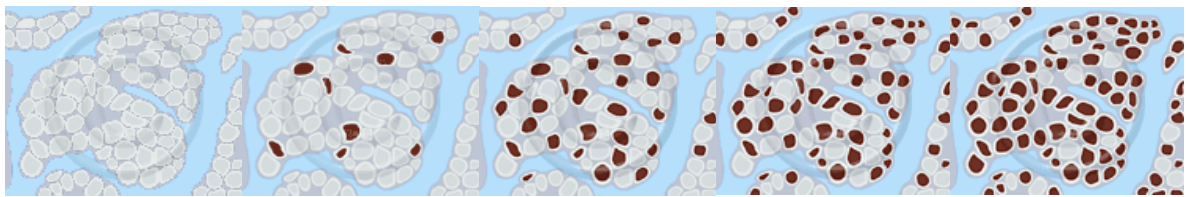


Abb. 19, 20, 21, 22: Prozentsatz positiver Zellen in aufsteigender Reihenfolge von links nach rechts (PP o - 4)¹⁶¹

¹⁶⁰ Remmele und Stegner, 1987.

¹⁶¹ Remmele und Stegner, 1987.

2.5 Statistische Analyse

Zur Dokumentation der Daten wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel der Firma Microsoft verwendet. Die deskriptive statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung konnte mit dem Datenanalyseprogramm SPSS (Superior Performance Software Systems for Windows, Microsoft, USA) Version 21 der Firma IBM durchgeführt werden.

Hierbei kamen vor allem Häufigkeitsberechnungen zum Einsatz, welche graphisch mit Hilfe von Balken- oder Boxplot-Diagrammen dargestellt wurden. Letztere ermöglichen das Ablesen des Medians mit Hilfe des dicken horizontalen Balkens. Die 75. Perzentile wird durch die obere, die 25. Perzentile durch die untere Begrenzung des Rechtecks erkenntlich gemacht. Die sich daraus ergebenden Flächen, werden als Quartilen bezeichnet. Der Interquartilabstand entspricht somit der Länge der Box und stellt ein Maß für die Streuung der Werte dar. Die vertikalen Linien werden Fehlerbalken genannt und betragen maximal das 1,5-fache des Interquartilabstands. Die des unteren Fehlerbalkens ergeben das 2,5 % Quantil, die des oberen das 97,5 % Quantil. Somit befinden sich 95 % aller beobachteten Werte innerhalb der Fehlerbalkengrenzen. Werte, die darüber oder darunter liegen, werden als Ausreißer kenntlich gemacht.

Mit Hilfe der sogenannten Kaplan-Meier Methode wurden Überlebenszeitanalysen durchgeführt. Zum Zeitpunkt des Endes des Follow-Ups noch lebende Patienten wurden als zensiert definiert. Der Log-Rank-Test diente hierbei dem Vergleich unterschiedlicher Patienten-Gruppen hinsichtlich ihrer Überlebensraten.

Um die Signifikanz von Unterschieden zwischen Fallgruppen zu prüfen, wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson angewandt. Dieser Signifikanztests erlaubt eine Aussage darüber, ob der Unterschied in den Anteilswerten der Stichprobe auch in der Grundgesamtheit besteht.

Der Mann-Whitney-U-Test diente dem Vergleich zweier Stichproben dahingehend, ob sie sich in der Größe der Messwerte signifikant unterscheiden.

Mit Hilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression der einzelnen Transkriptionsfaktoren gibt.

P-Werte wurden als signifikant betrachtet, wenn sie $< 0,05$ waren.

3. Ergebnisse

3.1 Auswertbarkeit der Fälle

Die immunhistochemischen Untersuchungen fielen je nach Färbung unterschiedlich aus. Da E-Cadherin und p53 automatisiert bearbeitet wurden und diese Verfahren für die Diagnostik seit längerer Zeit etabliert sind, zeigte sich eine stabile und gut auswertbare Färbequalität. ZEB1, ZEB2 und snail erwiesen sich hinsichtlich der Färbung teilweise als problematisch. Genaue Angaben zur Auswertbarkeit der einzelnen Färbungen folgen in den jeweiligen Ergebnis-Teilen. Von den insgesamt 52 Fällen mussten letztendlich 5 komplett aus dem Kollektiv entfernt werden, da entweder kein Tumorgewebe angeschnitten war oder technische Gründe, wie schlechte Färbung oder zerstörtes Gewebe, eine Auswertung unmöglich machten. Alle nachfolgend beschriebenen Ergebnisse und Berechnungen beziehen sich somit auf 47 Fälle.

3.2 Ergebnisse ZEB1

Die immunhistochemischen Färbungen zu ZEB1 zeigten alle eine nukleäre Expression des Transkriptionsfaktors. In 7 Fällen konnte zusätzlich eine Positivität im Cytoplasma nachgewiesen werden. Die nukleäre Expression war ausschließlich in sarkomatösen, die cytoplasmatische hingegen ausschließlich in karzinomatösen Anteilen nachweisbar. Bei der nukleären Expression konnte in 24 Fällen eine starke, in 20 eine mäßige und in 3 eine schwache Färbeintensität beobachtet werden. Cytoplasmatisch positive Zellen zeigten hingegen maximal eine schwache Anfärbung.

ZEB1-Reaktionsmuster

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
nukleär und cytoplasmatisch	7	14,9	14,9	14,9
Gültig nukleär	40	85,1	85,1	100,0
Gesamt	47	100,0	100,0	

Tab. 12: ZEB1-Reaktionsmuster

ZEB1-Färbeintensitäten

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
schwach	3	6,4	6,4	6,4
Gültig mäßig	20	42,6	42,6	48,9
stark	24	51,1	51,1	100,0
Gesamt	47	100,0	100,0	

Tab. 13: ZEB1-Färbeintensität Nukleär-Sarkom

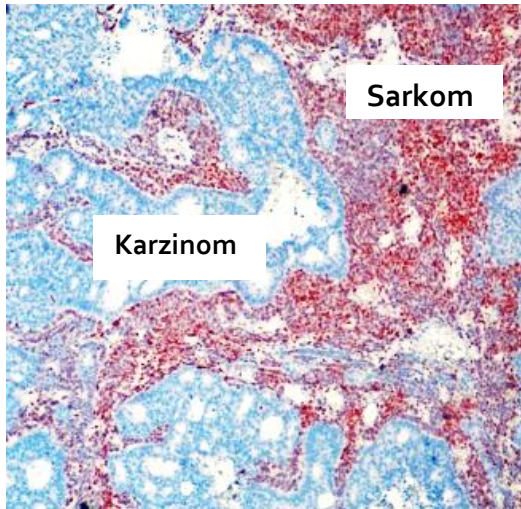


Abb.23: ZEB1 positive Zellkerne in Sarkom-Anteilen des Tumors; die darin eingebetteten Karzinom-Anteile sind negativ (4-fach vergrößert)

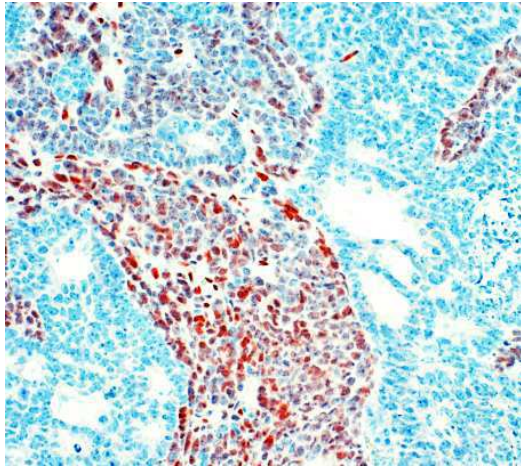


Abb.24: ZEB1 positive Zellkerne in Sarkom-Anteilen des Tumors (20-fach vergrößert)

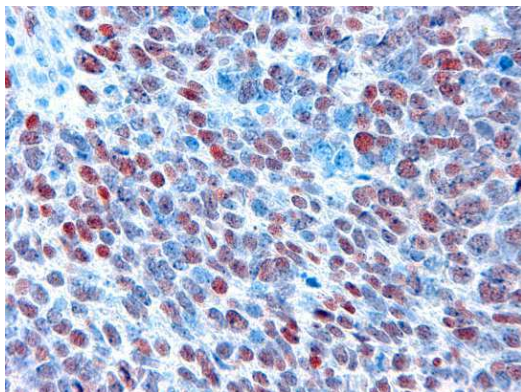


Abb.25: ZEB1 positive Zellkerne (40-fach vergrößert)

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
keine	40	85,0	85,0	85,0
Gültig schwach	7	15,0	15,0	100,0
Gesamt	47	100,0	100,0	

Tab. 14: ZEB1-Färbeintensität Cytoplasma-Karzinom

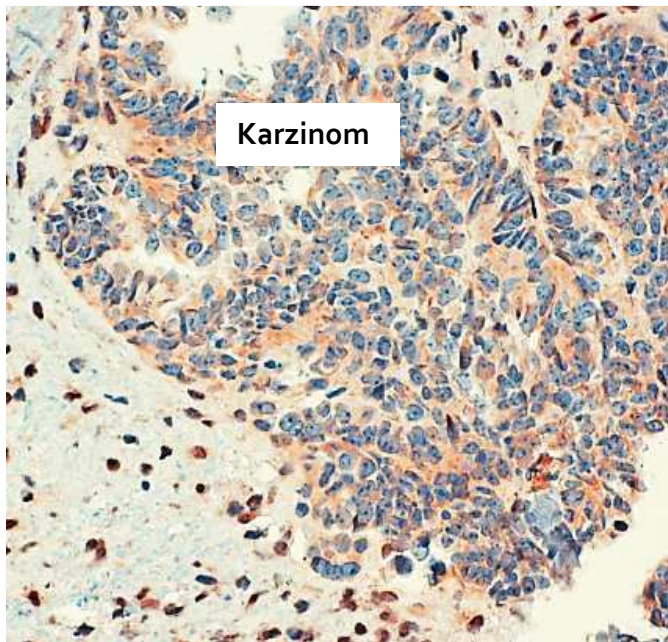


Abb. 26: ZEB1-positives Cytoplasma in Karzinom-Anteilen des Tumors sowie positive Zellkerne in Sarkom-Anteilen (10-fach vergrößert)

3.3 Ergebnisse ZEB2

ZEB2 zeigte in 21 Fällen eine nukleäre und zugleich cytoplasmatische Positivität der Zellen. Am zweit häufigsten konnte mit 15 Vorkommnissen eine rein cytoplasmatische Färbung nachgewiesen werden. Hingegen gab es, verglichen mit ZEB1, nur 6 Fälle mit einer rein nukleären Positivität. 5 zeigten gar keine Färbung. Wie bei ZEB1, waren auch hier die positiven nukleären Anteile im Sarkom, die positiven cytoplasmatischen Anteile im Karzinom zu finden. Die Färbeintensität der Zellen mit nukleärer Expression war in 16 Fällen mäßig, in 6 schwach und in 4 stark. In 21 Fällen konnte jedoch gar keine ZEB2-Färbung im Kern nachgewiesen werden. Die cytoplasmatisch positiven Zellen zeigten hingegen in 35 Kasus eine schwache, in 6 eine mäßige und in 11 gar keine Färbeintensität.

ZEB2-Reaktionsmuster

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
keine	5	10,6	10,6	10,6
cytoplasmatisch	15	31,9	31,9	42,6
Gültig nukleär und cytoplasmatisch	21	44,7	44,7	87,2
nukleär	6	12,8	12,8	100,0
Gesamt	47	100,0	100,0	

Tab. 15: ZEB2-Reaktionsmuster

ZEB2-Färbeintensitäten

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
keine	21	44,7	44,7	44,7
schwach	6	12,8	12,8	57,4
Gültig mäßig	16	34,0	34,0	91,5
stark	4	8,5	8,5	100,0
Gesamt	47	100,0	100,0	

Tab. 16: ZEB2-Färbeintensität Nukleär-Sarkom

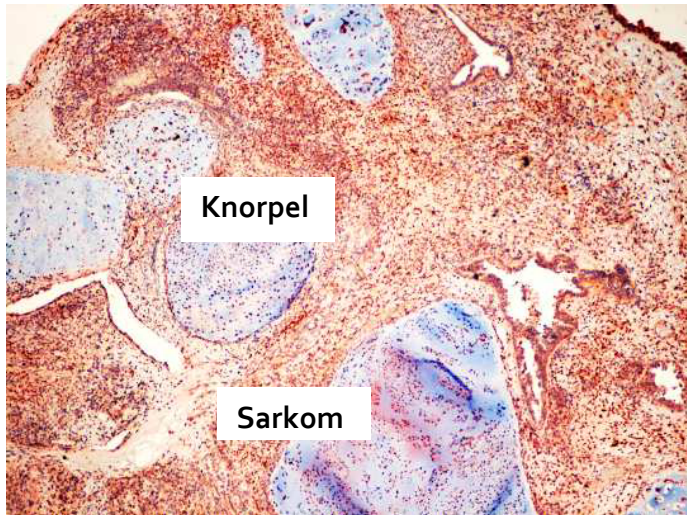


Abb.27: ZEB2-positive Zellkerne in Sarkom-Anteilen des Tumors (4-fach vergrößert)

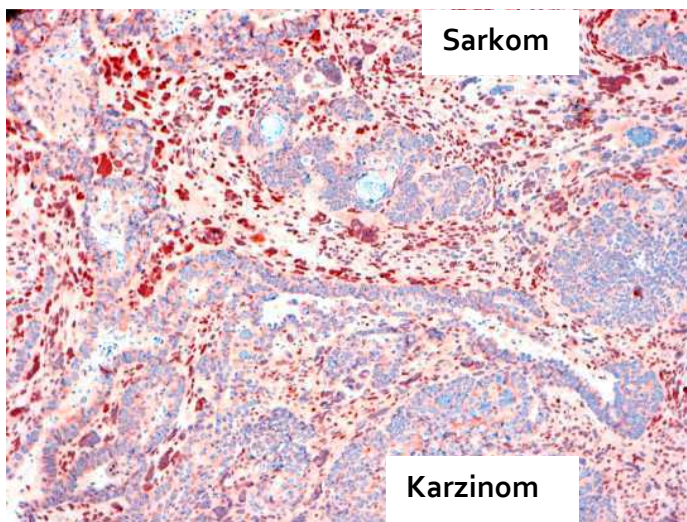


Abb.28: ZEB2-positive Zellkerne in Sarkom-Anteilen des Tumors (10-fach vergrößert)

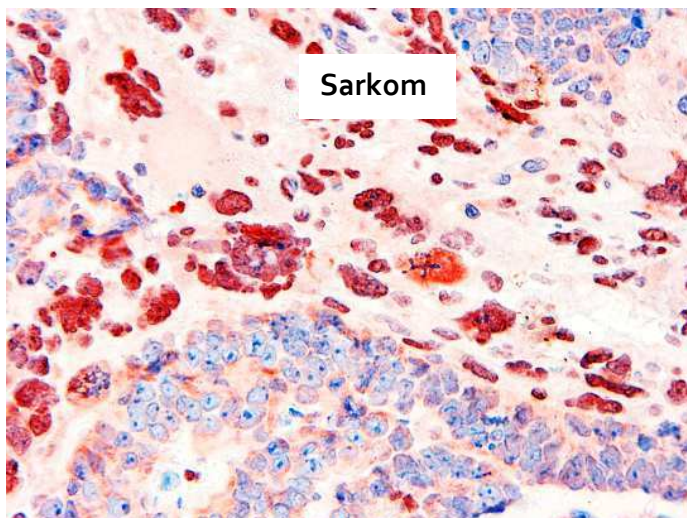


Abb.29: ZEB2-positive Zellkerne in Sarkom-Anteilen des Tumors (40-fach vergrößert)

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozen- te	Kumulierte Pro- zente
Gültig	keine	11	23,4	23,4
	schwach	35	74,5	97,9
	mäßig	1	2,1	100,0
	Gesamt	47	100,0	100,0

Tab. 17: ZEB2-Färbeintensität Cytoplasma-Karzinom

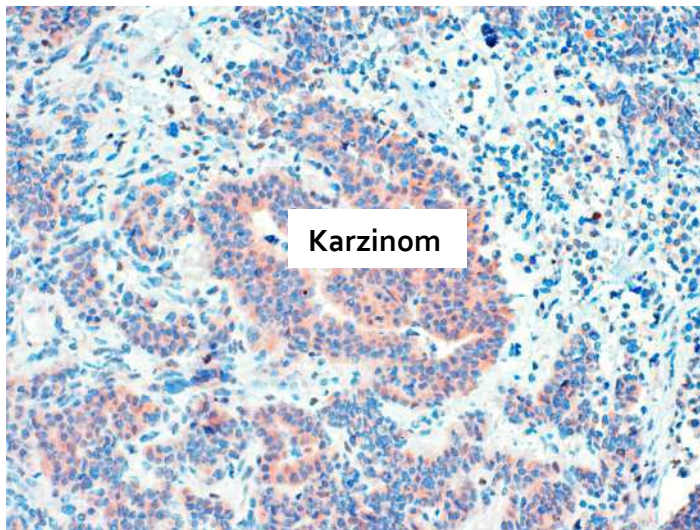


Abb.30: ZEB2-positives Cytoplasma in Karzinom-Anteilen des Tumors (20-fach vergrößert)

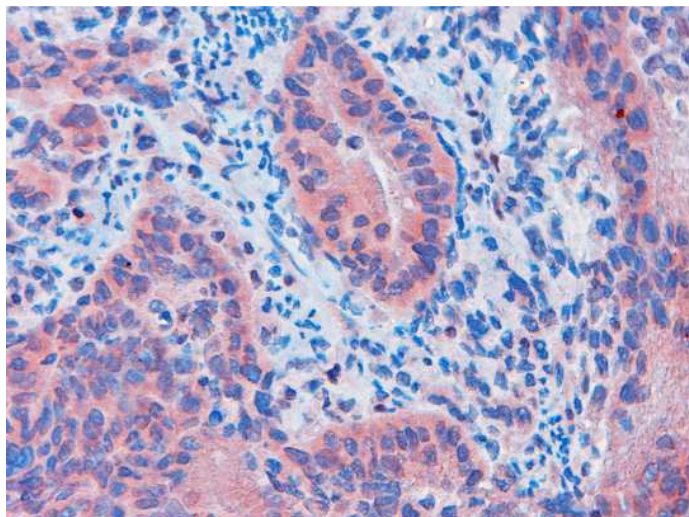


Abb.31: ZEB2-positives Cytoplasma in Karzinom-Anteilen des Tumors (40-fach vergrößert)

3.4 Ergebnisse snail

Der Transkriptionsfaktor Snail zeigte in 40 der 47 Fälle eine nukleäre Positivität. Die restlichen 7 Fälle waren negativ. Somit konnte keine einzige cytoplasmatische Färbung nachgewiesen werden. Die 40 positiven nukleären Kasus wurden mit dem in Kapitel 4.1 beschriebenen Remmele-Scores ausgewertet. Daraus ergaben sich sieben Fälle ohne, 20 Fälle mit geringer, 16 mit mäßiger und 4 mit starker Expression.

Snail-Reaktionsmuster

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
keine	7	14,9	14,9	14,9
Gültig nukleär	40	85,1	85,1	100,0
Gesamt	47	100,0	100,0	

Tab. 18: Snail-Reaktionsmuster

Snail-Remmele-Score

Die Ergebnisse der einzeln berechneten Remmele-Scores für den Transkriptionsfaktor snail und deren Häufigkeiten sind in nachfolgender Tabelle und Graphik dargestellt.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
0	7	14,9	14,9	14,9
1	10	21,3	21,3	36,2
2	10	21,3	21,3	57,4
Gültig 4	14	29,8	29,8	87,2
6	2	4,3	4,3	91,5
9	3	6,4	6,4	97,9
12	1	2,1	2,1	100,0
Gesamt	47	100,0	100,0	

Tab. 19: Snail-Remmele-Score

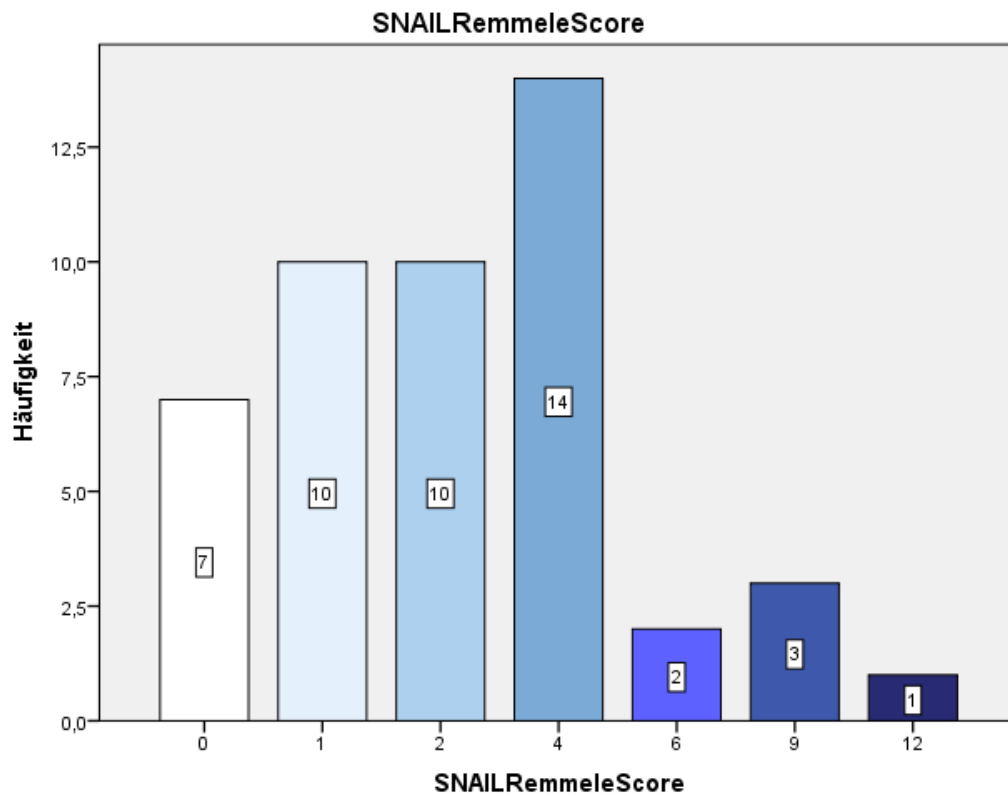


Abb 32: Snail-Remmele-Score

Mann-Whitney-U-Test

Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests konnte untersucht werden, ob sich die homolog und heterolog differenzierten Tumore in der Höhe des Remmele-Scores des Transkriptionsfaktors Snail signifikant unterscheiden. Im Ergebnis zeigte sich mit $p=0,921$ keine statistische Signifikanz.

	Differenzierung	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
SNAILRemmeleScore	homolog	20	16,38	327,50
	heterolog	12	16,71	200,50
	Gesamt	32		

Tab. 20: Ränge

	SNAIL Remmele-Score
Mann-Whitney-U	117,500
Wilcoxon-W	327,500
Z	-,100
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,921
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,924 ^b

Tab. 21: Teststatistik

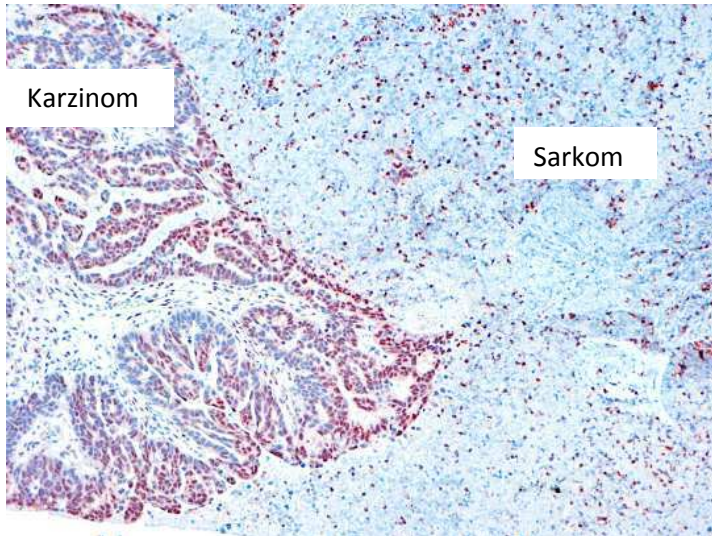


Abb.33: Snail-positive Zellkerne in Karzinom- sowie Sarkom-Anteilen des Tumors (10-fach vergrößert)

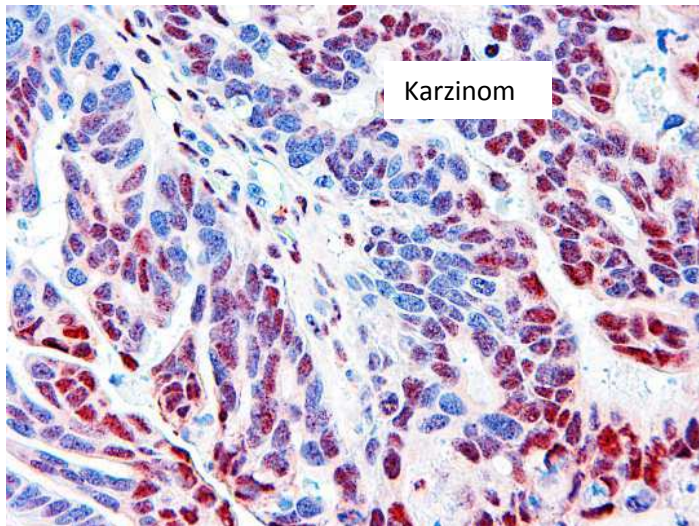


Abb.34: Snail-positive Zellkerne in Karzinom-Anteilen des Tumors (40-fach vergrößert)

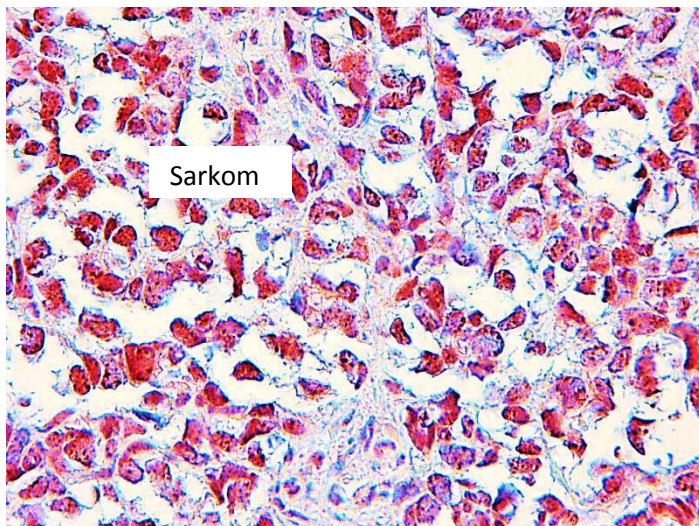


Abb.35: Snail-positive Zellkerne in Sarkom-Anteilen des Tumors (40-fach vergrößert)

3.5 Ergebnisse für p53

P53-Reaktionsmuster

Die immunhistochemischen Untersuchungen von p53 ließen in 36 Fällen eine nukleäre Färbung erkennen. 10 Fälle erbrachten ein negatives Resultat und nur 1 Fall zeigte eine cytoplasmatische Positivität.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozen- te	Kumulierte Pro- zente
Gültig	keine	10	21,3	21,3
	cytoplasmatisch	1	2,1	23,4
	nukleär	36	76,6	100,0
	Gesamt	47	100,0	100,0

Tab. 22: p53-Reaktionsmuster

Lokalisation positiver Zellen

Mit einem prozentualen Anteil von 45,9 % befanden sich die meisten p53-positiven Zellen gleichzeitig in Karzinom- sowie in Sarkomanteilen der Tumore. 35,1 % der Fälle waren ausschließlich im Sarkom und 18,9 % im Karzinom p53-positiv.

p53 - Lokalisation positiver Zellen

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozen- te	Kumulierte Pro- zente
Gültig	Karzinom	7	18,9	18,9
	Karzinom+Sarkom	17	45,9	64,9
	Sarkom	13	35,1	100,0
	Gesamt	37	100,0	100,0

Tab. 23: p53-Lokalisation positiver Zellen

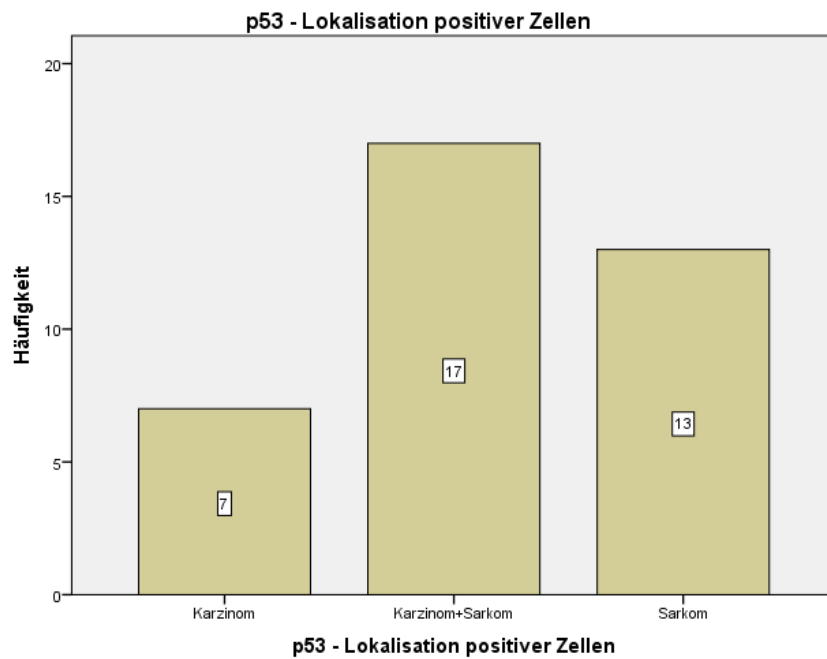


Abb. 36: p53-Lokalisation

P53-Remmele-Score

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung und die darauffolgende Berechnung des Remmele-Scores für den Transkriptionsfaktor p53 werden in nachfolgender Tabelle und Graphik aufgeführt.

P53Remmele-Score				
	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
0	10	21,3	21,3	21,3
1	7	14,9	14,9	36,2
2	4	8,5	8,5	44,7
4	5	10,6	10,6	55,3
Gültig 6	10	21,3	21,3	76,6
8	1	2,1	2,1	78,7
9	8	17,0	17,0	95,7
12	2	4,3	4,3	100,0
Gesamt	47	100,0	100,0	

Tab. 24: p53-Remmele-Score

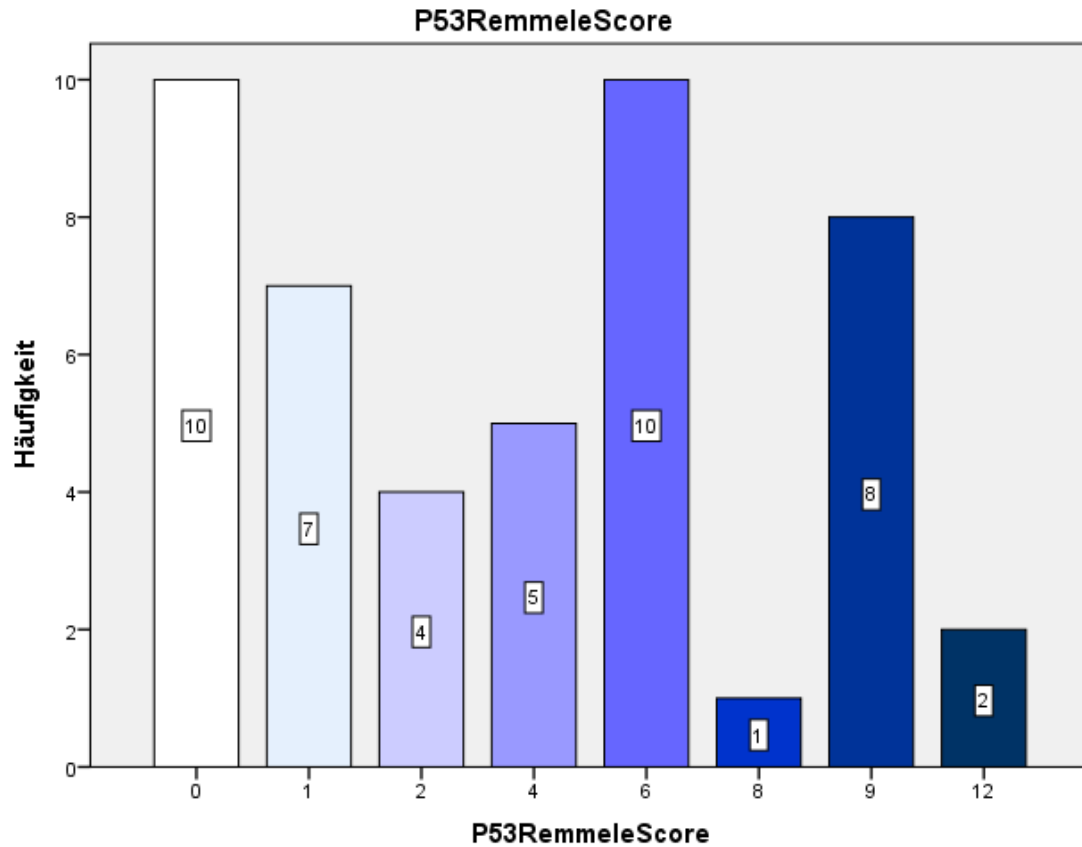


Abb.37: p53-Remmele-Score

Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-U-Test sollte zeigen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen homolog und heterolog differenzierter Tumore in der Höhe des p53-Remmele-Scores existiert. Mit einem berechneten p-Wert von 0,026 lässt sich somit ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen.

	Differenzierung	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
P53RemmeleScore	Homolog	20	13,70	274,00
	Heterolog	12	21,17	254,00
	Gesamt	32		

Tab. 25: Ränge

	P53RemmeleScore
Mann-Whitney-U	64,000
Wilcoxon-W	274,000
Z	-2,224
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,026
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,029 ^b

Tab. 26: Teststatistik

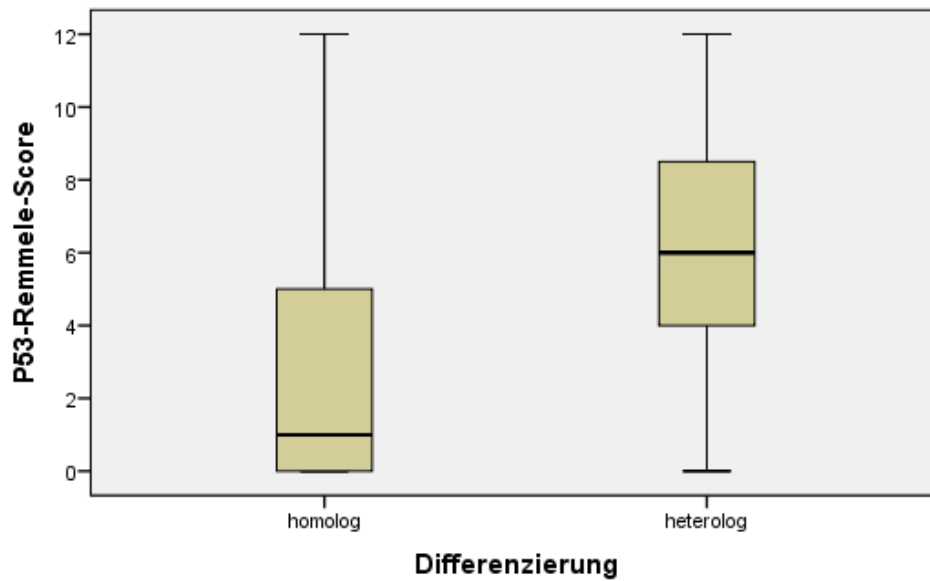


Abb. 38: Boxplot-Diagramm zu Differenzierung und Höhe des Remmele-Scores

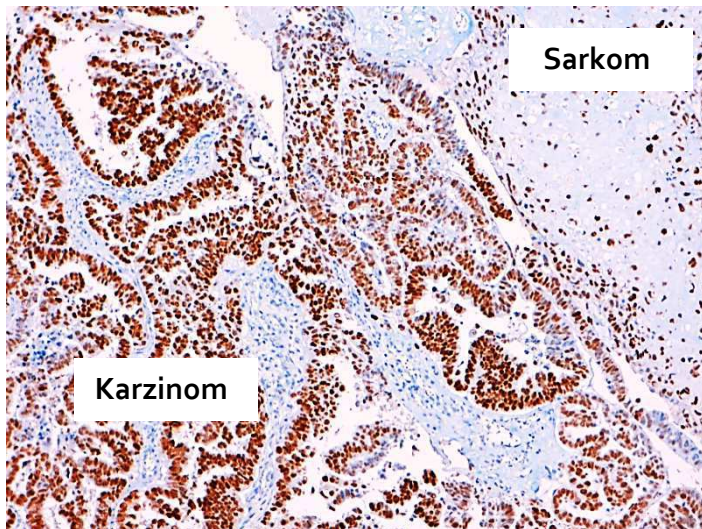


Abb.39: p53-positive Zellkerne in Karzinom- sowie Sarkom-Anteilen des Tumors (10-fach vergrößert)

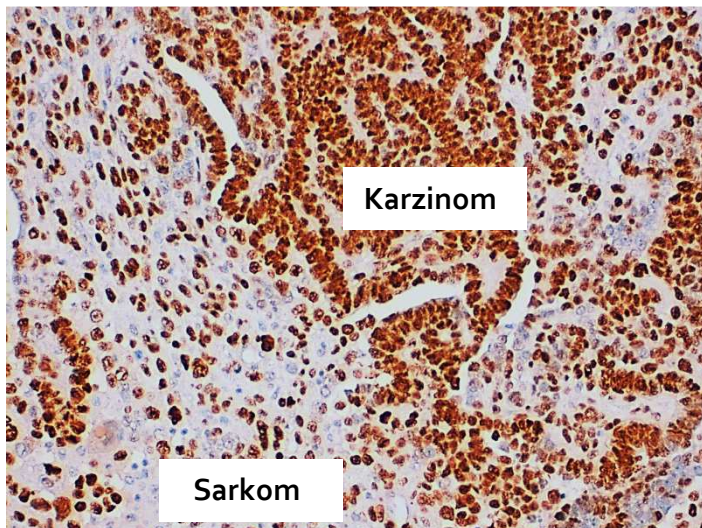


Abb.40: p53-positive Zellkerne in Karzinom- sowie Sarkom-Anteilen des Tumors (20-fach vergrößert)



Abb.41: p53-positive Zellkerne in Karzinom-Anteilen des Tumors (40-fach vergrößert)

3.6 Korrelationen zwischen den Transkriptionsfaktoren

	ZEB1-Färbeintensität Nukleär-Sarkom	ZEB1-Färbeintensität Cytoplasma-Karzinom	SNAIL Remmele-Score	P53 Remmele-Score	ZEB2-Färbeintensität Nukleär-Sarkom	ZEB2-Färbeintensität Cytoplasma-Karzinom
ZEB1-Färbeintensität Nukleär-Sarkom	1	,024	-,106	-,183	,118	,203
Korrelation nach Pearson						
Signifikanz (2-seitig)		,875	,479	,219	,431	,172
ZEB1-Färbeintensität Cytoplasma-Karzinom	,024	1	,078	-,372*	,293*	,087
Korrelation nach Pearson						
Signifikanz (2-seitig)	,875		,601	,010	,045	,562
SNAIL Remmele-Score	-,106	,078	1	,083	,281	,020
Korrelation nach Pearson						
Signifikanz (2-seitig)	,479	,601		,577	,056	,894
p53 Remmele-Score	-,183	-,372*	,083	1	-,203	-,149
Korrelation nach Pearson						
Signifikanz (2-seitig)	,219	,010	,577		,172	,318
ZEB2-Färbeintensität Nukleär-Sarkom	,118	,293*	,281	-,203	1	,203
Korrelation nach Pearson						
Signifikanz (2-seitig)	,431	,045	,056	,172		,171
ZEB2-Färbeintensität Cytoplasma-Karzinom	,203	,087	,020	-,149	,203	1
Korrelation nach Pearson						
Signifikanz (2-seitig)	,172	,562	,894	,318	,171	

Tab. 27: Korrelationen

*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Um zu untersuchen, ob zwischen der Expression der einzelnen Transkriptionsfaktoren ein Zusammenhang besteht, wurde für jedes Variablenpaar der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet und dessen Signifikanz bestimmt. Ein signifikantes Ergebnis konnte zum einen zwischen dem Remmele-Score von p53 und der Färbeintensität von ZEB1 im Cytoplasma der Karzinomzellen nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um eine nega-

tive Korrelation mit mäßiger Stärke. Des Weiteren konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der nukleären Färbeintensität von ZEB2 im Sarkom und der cytoplasmatischen Färbeintensität von ZEB1 im Karzinom nachgewiesen werden. Die Korrelation war hierbei positiv und ebenfalls mäßig stark ausgeprägt.

3.7 Auswertung der Überlebensdaten

Anhand des Tumorregisters München (TRM) konnten die Daten der hier genannten 47 Fälle hinsichtlich des Überlebens abgerufen werden. Es wurde zwischen den Kategorien „am Leben“, „tot“ und „unklar“ unterschieden. Der Zeitpunkt der Datenerhebung war der 26.04.2013. Bei 13 der 47 Fälle fehlte eine Angabe zum aktuellen Lebensstatus. 27 Patientinnen sind bereits verstorben und 7 waren zu dem oben genannten Zeitpunkt noch am Leben.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
tot	27	57,4	57,4	57,4
Gültig am Leben	7	14,9	14,9	72,3
unklar	13	27,7	27,7	100,0
Gesamt	47	100,0	100,0	

Tab. 28: Lebensstatus

Darüber hinaus wurde unterschieden zwischen tumorabhängigem und tumorunabhängigem Tod. 18 der 27 verstorbenen Patientinnen sind tumorabhängig verstorben, 2 tumorunabhängig und bei 7 Fällen fehlte die Angabe zur Todesursache.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
tumorabhängig	18	66,7	66,7	66,7
Gültig tumorunabhängig	2	7,4	7,4	74,1
unklar	7	25,9	25,9	100,0
Gesamt	27	100,0	100,0	

Tab. 29: Todesursache

Das Überleben der Patientinnen wurde in Tagen ab Diagnosedatum definiert. Minimal betrug dies 34, maximal 4528 Tage (= 12,4 Jahre).

N	Gültig	32
	Fehlend	0
Mittelwert		799,09
Median		456,00
Standardabweichung		984,881
Spannweite		4494
Minimum		34
Maximum		4528

Tab. 30: Überleben in Tagen

Die 7 Fälle mit unklarer Todesursache wurden in die Statistik mit aufgenommen, da bei allen Patientinnen mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen ist, dass sie ebenfalls tumorabhängig verstorben sind, da in allen Fällen ein ausgedehntes Tumorleiden (FIGO-Stadium II und III) vorlag.

Gesamtüberleben in Abhängigkeit der FIGO-Klassifikation

In den folgenden Tabellen und Graphiken wird das Gesamtüberleben der Patientinnen verglichen mit den einzelnen FIGO-Stadien. Zum einen werden die Stadien klassisch in I-IV untergliedert, zum anderen wurde eine etwas grobere Einteilung vorgenommen, wobei hier die Stadien I/II und III/IV zusammenfasst worden sind. Weder bei der Unterteilung in 4 ($p=0,097$) FIGO-Gruppen, noch bei der in 2 ($p=0,161$), lässt sich eine signifikante Beziehung zwischen den einzelnen Stadien und der Gesamtüberlebenszeit feststellen.

FIGO	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse (=Tod)	Zensiert (=am Leben)	
			N	Prozent
I	5	5	0	0,0%
II	6	2	4	66,7%
III	18	15	3	16,7%
IV	3	3	0	0,0%
Gesamt	32	25	7	21,9%

Tab. 31: FIGO-Stadien – Häufigkeiten

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	6,316	3	,097

Tab. 32: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von FIGO.

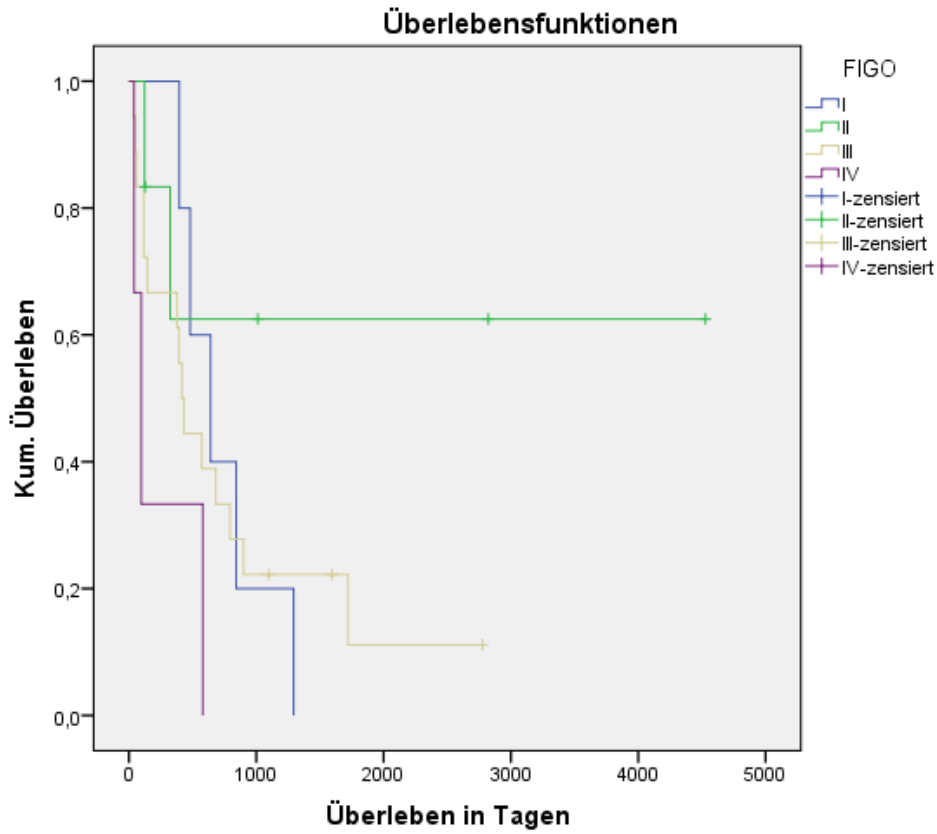


Abb. 42: Kaplan-Meier-Überlebenskurve

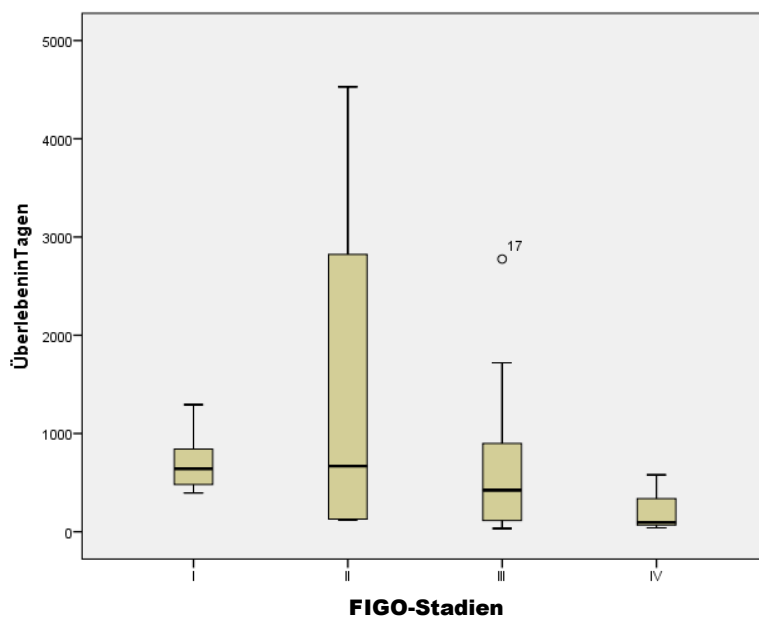


Abb. 43: Boxplot-Diagramm der Überlebensanalyse

FIGO	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse (=Tod)	Zensiert (=am Leben)	
			N	Prozent
FIGO I/II	11	7	4	36,4%
FIGO III/IV	21	18	3	14,3%
Gesamt	32	25	7	21,9%

Tab. 33: FIGO-Stadien - Häufigkeiten

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,965	1	,161

Tab. 34: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von FIGOsehrgrö.

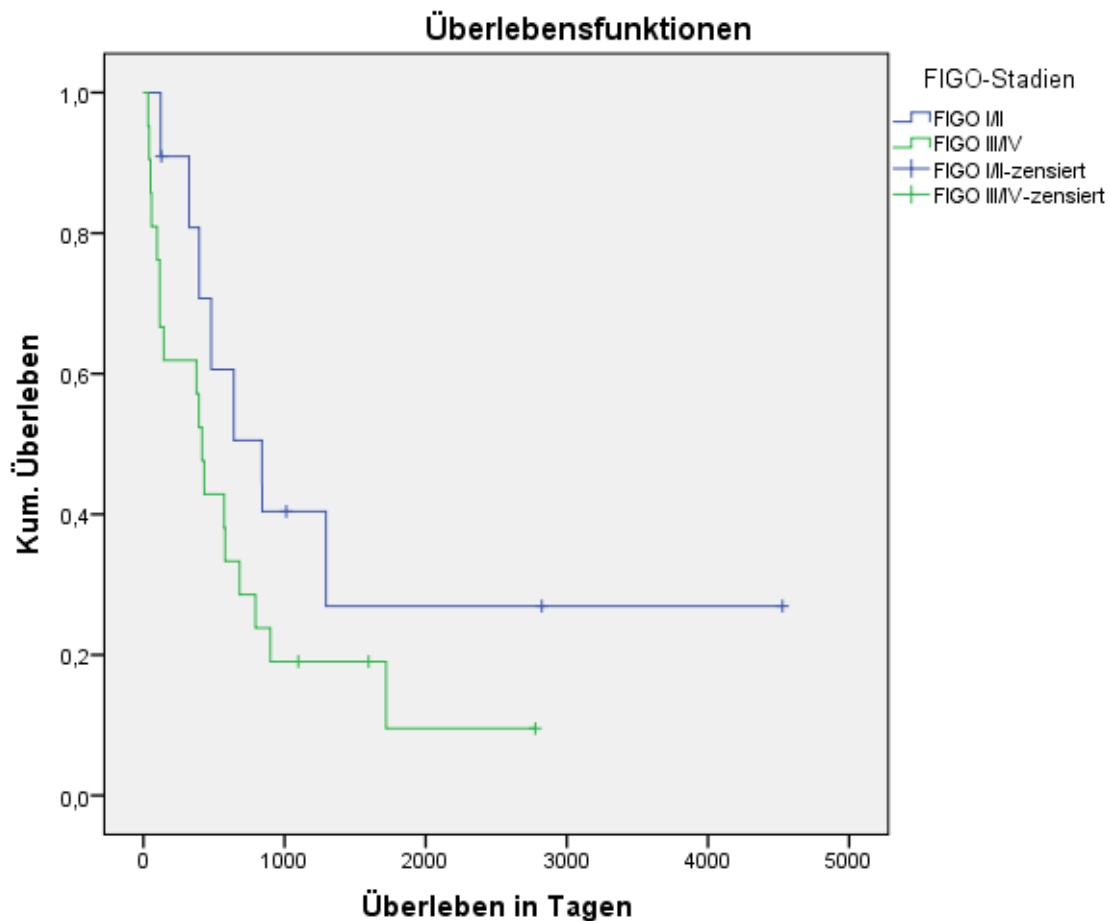


Abb. 44: Kaplan-Meier Überlebensfunktion

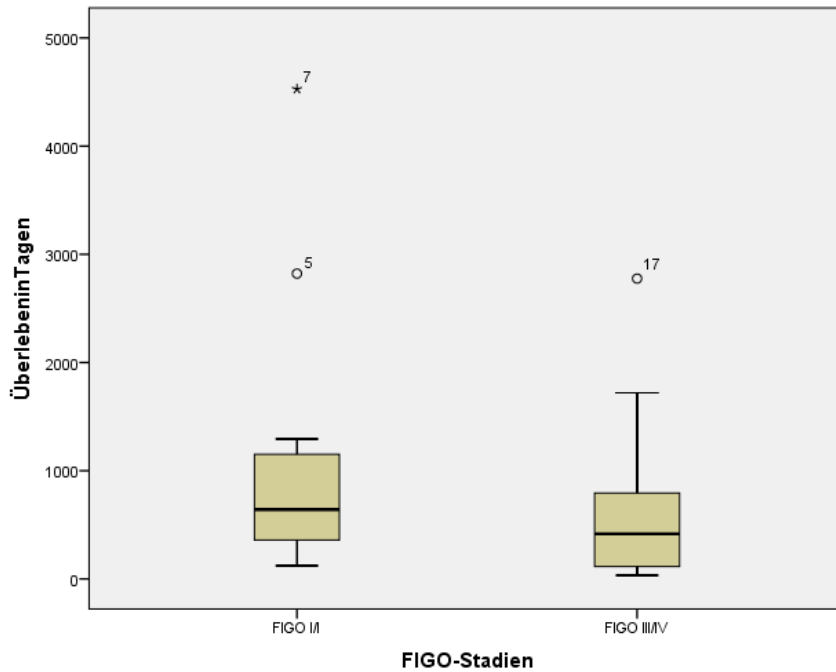


Abb. 45: Boxplot-Diagramm der Überlebensanalyse; Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Gesamtüberleben in Abhängigkeit des ZEB1-Färbeverhaltens

Auch hier wurde mittels der Kaplan-Meier Überlebensanalyse und dem Log-rank-Test das Gesamtüberleben mit dem Färbeverhalten des Transkriptionsfaktors verglichen. Es konnte weder zwischen der nukleären Färbeintensität in Sarkomanteilen ($p=0,797$), noch zwischen der cytoplasmatischen Färbeintensität in Karzinomanteilen ($p=0,530$) und der Überlebenszeit ein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

ZEB1FärbeintensitätNukleär Sarkom	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
Mäßig	17	13	4	23,5%
Stark	15	12	3	20,0%
Gesamt	32	25	7	21,9%

Tab. 35: ZEB1-Färbeintensität-Sarkom - Häufigkeiten

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,066	1	,797

Tab. 36: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von ZEB1FärbeintensitätNukleärSarkom.

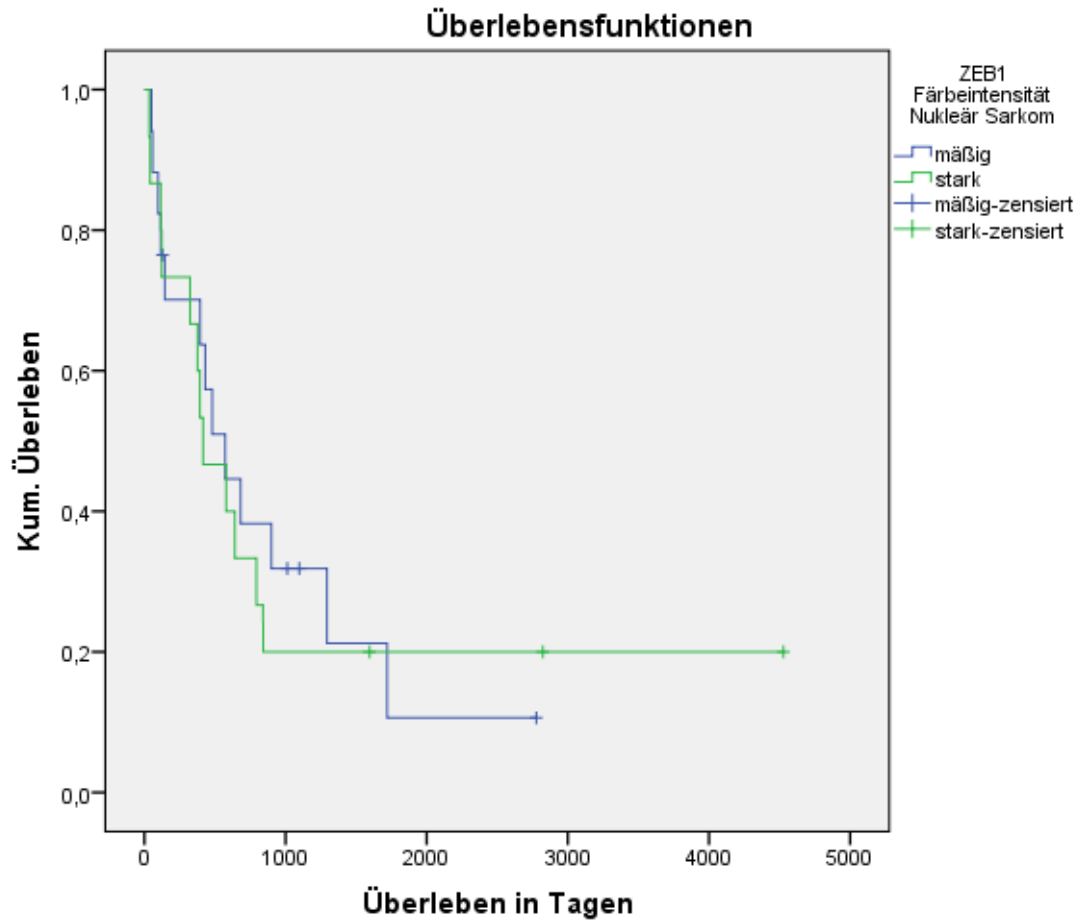


Abb. 46: Kaplan-Meier Überlebensfunktion

ZEB1 Färbeintensität Cytoplasma Karzinom	Gesamtzahl	Anzahl der Er- eignisse	Zensiert	
			N	Prozent
Keine	25	19	6	24,0%
schwach	7	6	1	14,3%
Gesamt	32	25	7	21,9%

Tab. 37: ZEB1-Färbeintensität-Karzinom - Häufigkeiten

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,395	1	,530

Tab. 38: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von ZEB1FärbeintensitätCytoplasmaKarzinom.

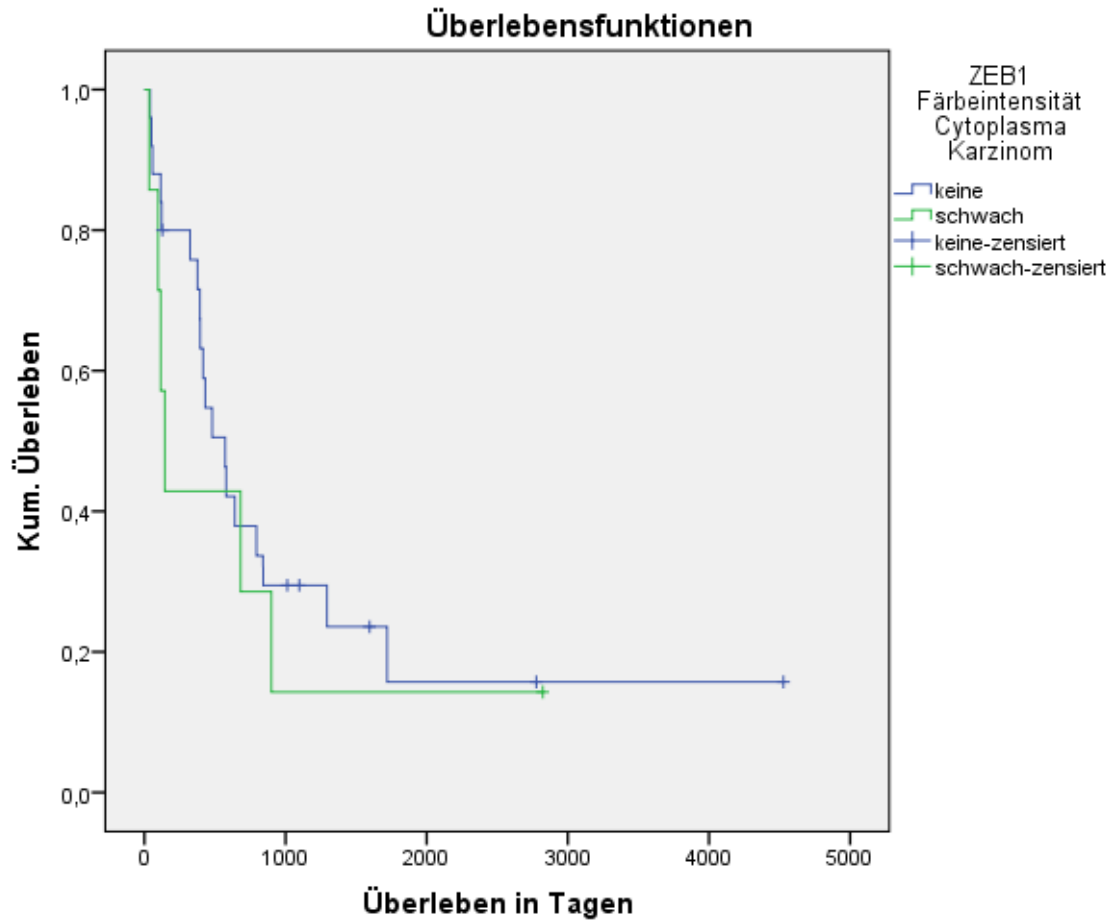


Abb. 47: Kaplan-Meier Überlebensfunktion

Gesamtüberleben in Abhängigkeit des ZEB2-Färbeverhaltens

Auch hier konnte mit $p=0,348$ für die nukleär positiven Fälle kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben festgestellt werden. Allerdings lässt sich aus der Graphik in Abbildung 51 ablesen, dass eine starke ZEB2-Expression im Kern mit einer kurzen Überlebenszeit einhergeht, und dass Langzeitüberlebende vor allem in der Gruppe ohne ZEB2-Expression vorkommen. Ein Zusammenhang zwischen der cytoplasmatischen Färbeintensität in Karzinomanteilen der Tumore und dem Überleben konnte mit einem p-Wert von 0,059 ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Allerdings befinden sich auch hier graphisch dargestellt in Abbildung 52 Langzeitüberlebende vor allem in der Gruppe, in der keine Expression von ZEB2 festgestellt werden konnte.

ZEB2FärbeintensitätNukleärSarkom	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
Keine	14	11	3	21,4%
schwach	4	3	1	25,0%
Mäßig	12	9	3	25,0%
Stark	2	2	0	0,0%
Gesamt	32	25	7	21,9%

Tab. 39: ZEB2-Färbeintensität-Sarkom - Häufigkeiten

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,300	3	,348

Tab. 40: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von ZEB2FärbeintensitätNukleärSarkom.

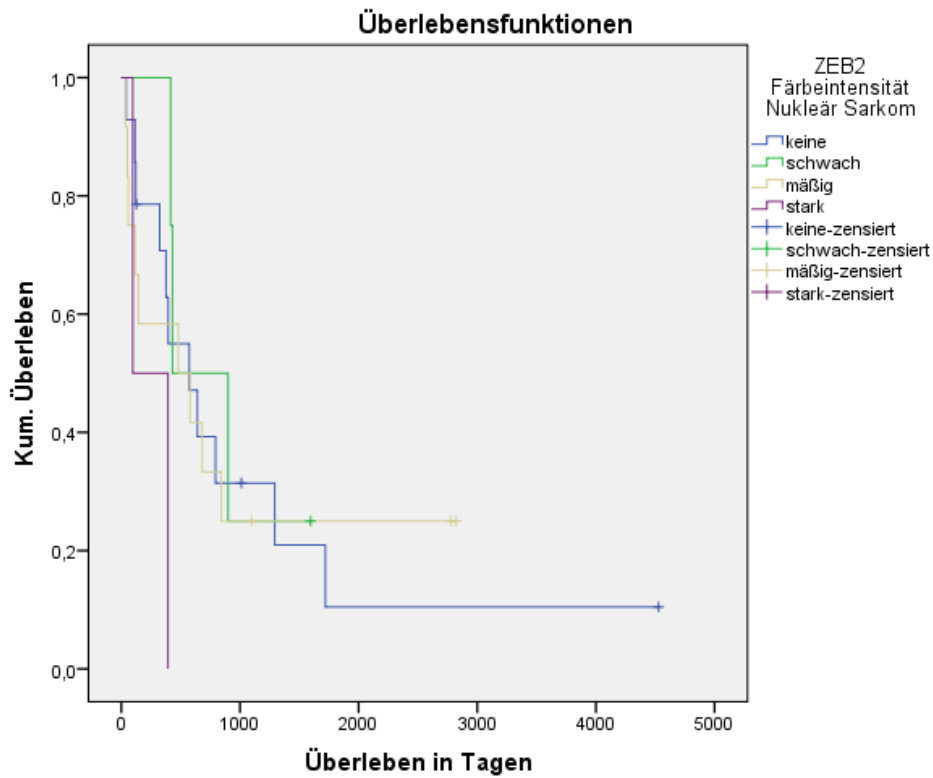


Abb. 48: Kaplan-Meier Überlebensfunktion

ZEB2FärbeintensitätCytoplasmaKarzinom	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
Keine	7	3	4	57,1%
Schwach	24	21	3	12,5%
Mäßig	1	1	0	0,0%
Gesamt	32	25	7	21,9%

Tab. 41: ZEB2-Färbeintensität-Karzinom - Häufigkeiten

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	5,672	2	,059

Tab. 42: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von ZEB2FärbeintensitätCytoplasmaKarzinom.

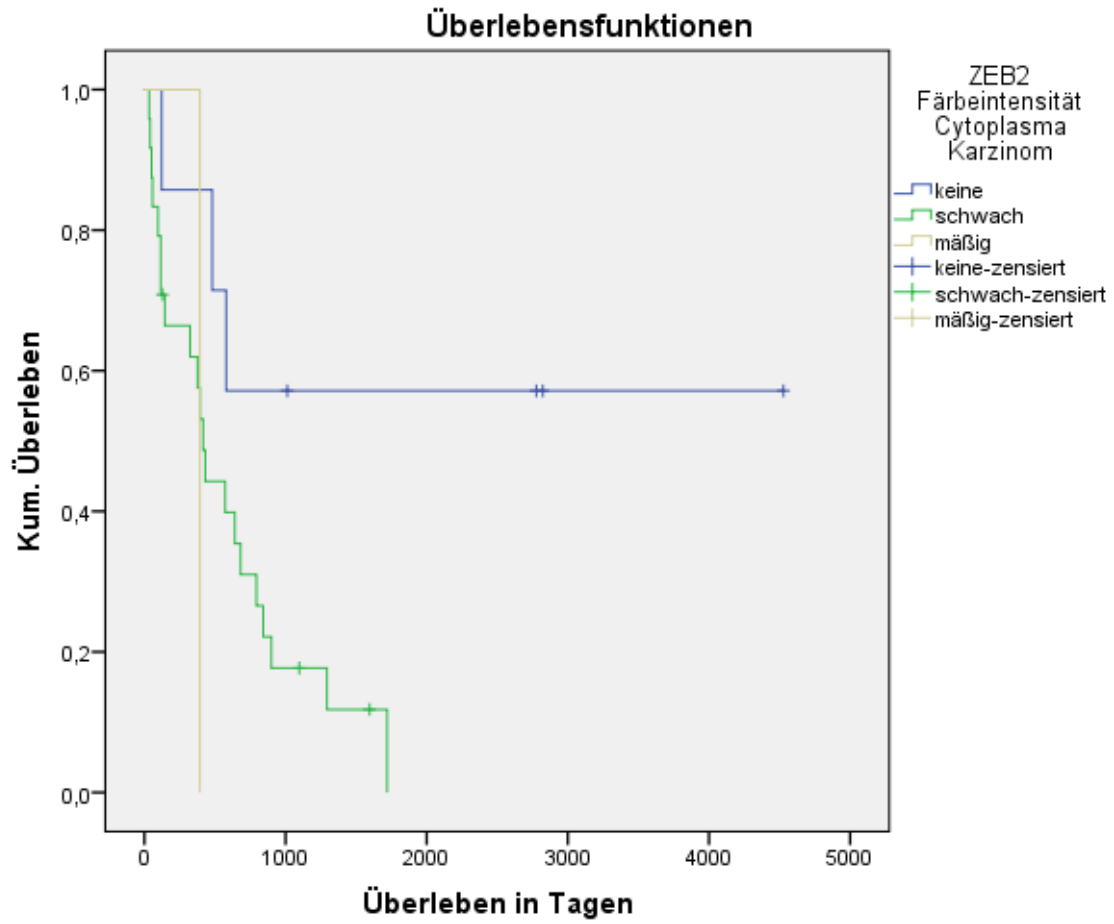


Abb. 49: Kaplan-Meier Überlebensfunktion

Gesamtüberleben in Abhängigkeit des snail-Färbeverhaltens

Die Kaplan-Meier-Überlebensanalysen sowie der Log-rank-Test zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Überleben der Patientinnen und der snail-Expression ($p=0,187$). Hingegen ist in der Kaplan-Meier Überlebensfunktion (Abbildung 53) zu erkennen, dass die Fälle mit einer negativen Expression eine etwas bessere Prognose aufweisen. Auch das Boxplot-Diagramm (Abbildung 54) zeigt, dass die mediane Überlebenszeit bei nicht vorhandener Expression höher ist, als bei Positivität. Der Vergleich der unterschiedlichen Stufen des Remmele-Scores für snail hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeigte ebenfalls mit $p=0,348$ keine signifikanten Unterschiede.

SNAIL-Positivität	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
negativ (0-2)	19	13	6	31,6%
positiv (ab einschließlich 3)	13	12	1	7,7%
Gesamt	32	25	7	21,9%

Tab. 43: Snail-positive Fälle - Häufigkeiten

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,744	1	,187

Tab. 44: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von SNAIL-Positivität.

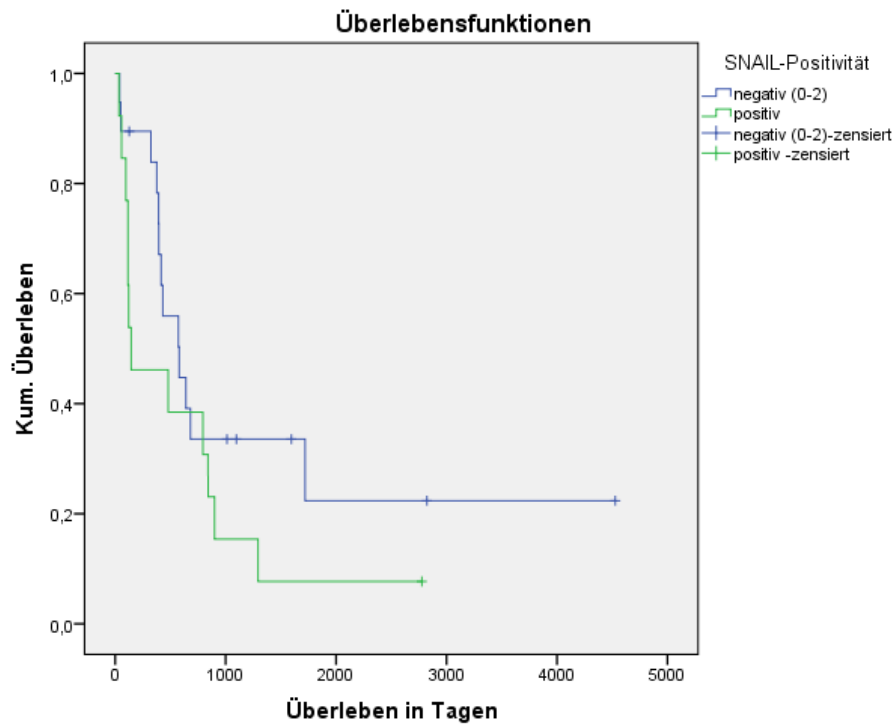


Abb. 50: Kaplan-Meier Überlebensfunktion

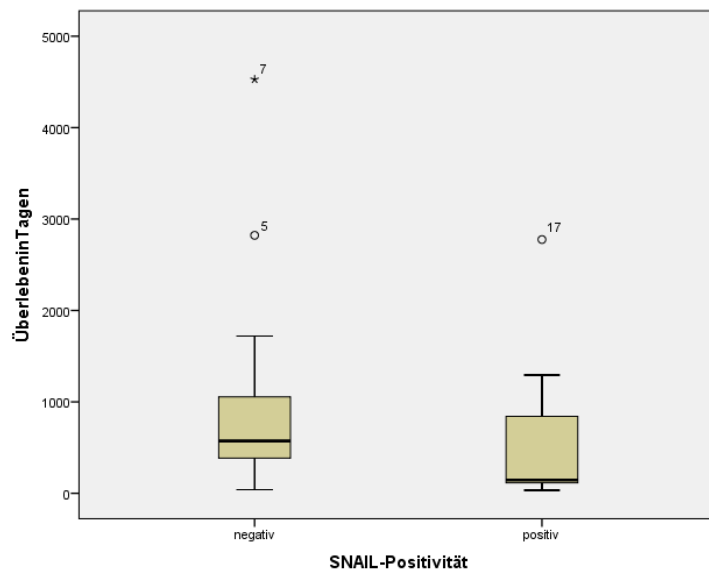


Abb. 51: Boxplot-Diagramm der Überlebensanalyse;
Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

SNAIL Remmele-Score	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
keine Expression	5	3	2	40,0%
geringe Expression (1-3)	14	10	4	28,6%
mäßige Expression (4-8)	9	9	0	0,0%
starke Expression (9-12)	4	3	1	25,0%
Gesamt	32	25	7	21,9%

Tab. 45: Snail-Remmele-Score - Häufigkeiten

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,300	3	,348

Tab. 46: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von SNAILRemmeleScore.

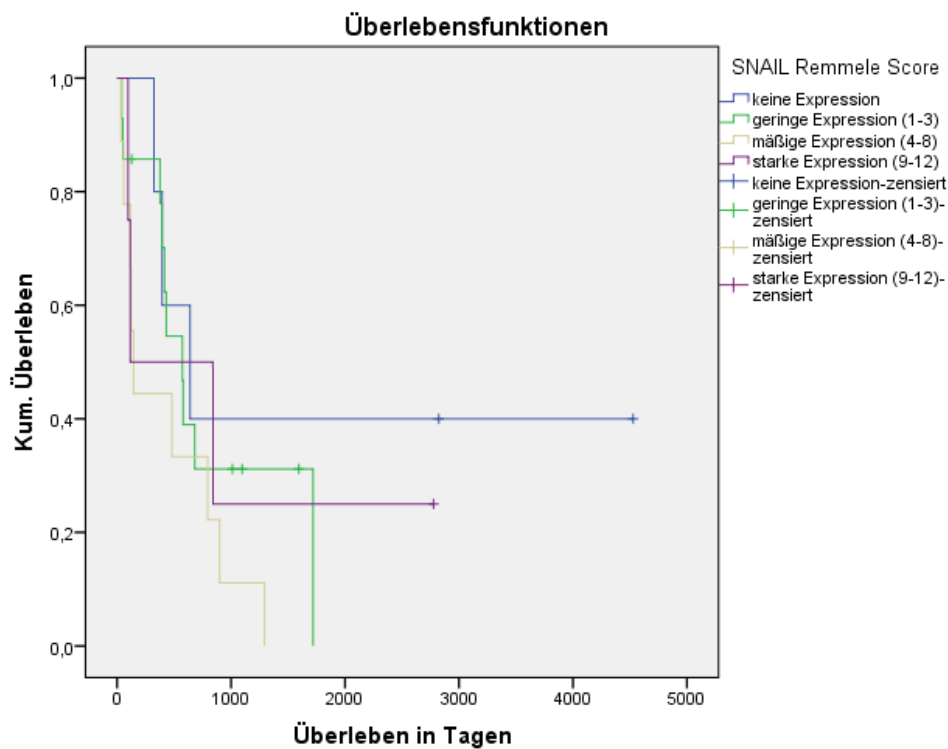


Abb. 52: Kaplan-Meier Überlebensfunktion

Gesamtüberleben in Abhängigkeit des p53-Färbeverhaltens

Die Untersuchung auf Unterschiede im Gesamtüberleben hinsichtlich der positiven Expression von p53 sowie der Höhe des Remmele-Scores, ergab in beiden Fällen mit p-Werten von 0,534 und 0,925 keine statistische Signifikanz. Es sind somit keine Unterschiede im Hinblick auf die Überlebensraten zu verzeichnen.

p53-Positivität	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
negativ (0-2)	17	12	5	29,4%
positiv (ab einschließlich 3)	15	13	2	13,3%
Gesamt	32	25	7	21,9%

Tab. 47: P53-positive Fälle - Häufigkeiten

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,388	1	,534

Tab. 48: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von p53-Positivität.

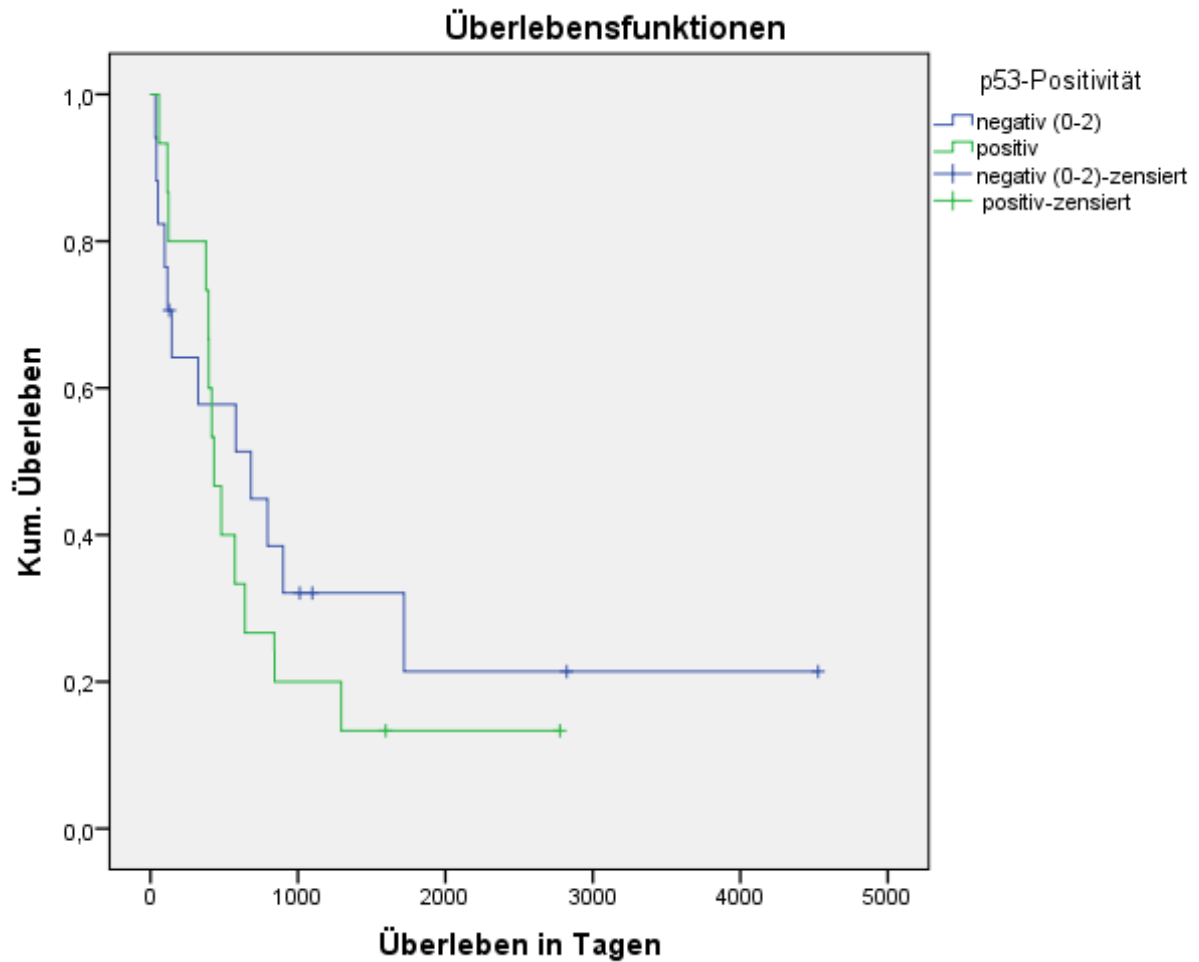


Abb. 53: Kaplan-Meier Überlebensfunktion

p53Remmele-Score	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
0	9	7	2	22,2%
1 (1-3)	10	7	3	30,0%
2 (4-8)	6	5	1	16,7%
3 (9-12)	7	6	1	14,3%
Gesamt	32	25	7	21,9%

Tab. 49: p53-Remmele-Score - Häufigkeiten

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,471	3	,925

Tab. 50: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von p53Remmele-Score.

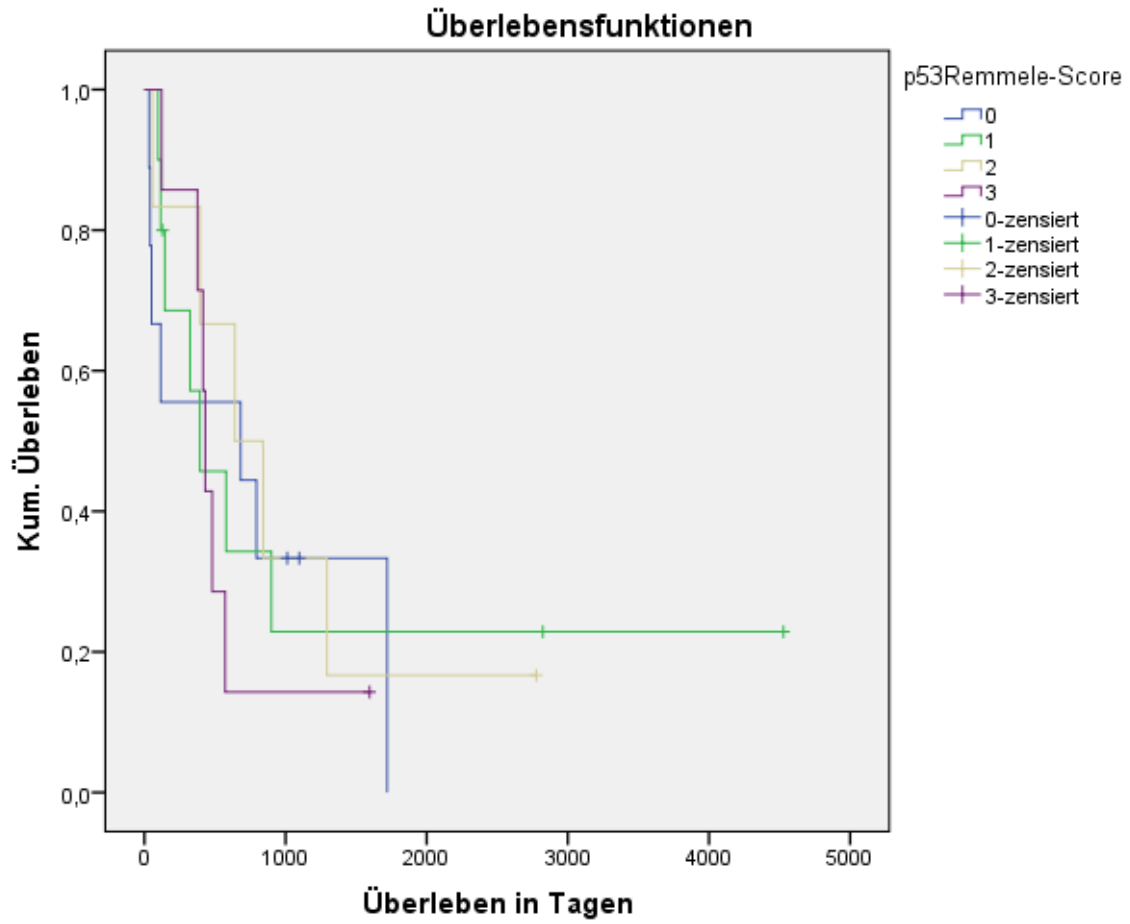


Abb. 54: Kaplan-Meier Überlebensfunktion

4. Diskussion

Karzinom Sarkome beziehungsweise maligne mesodermale Müllersche Mischtumore (MMMT) sind gekennzeichnet durch das gleichzeitige Auftreten von sowohl karzinomatösen als auch sarkomatösen Komponenten im gleichen Malignom. In Abhängigkeit von der Histologie der sarkomatösen Komponente unterscheidet man homologe und heterologe Karzinom Sarkome. Die Frage nach der Entstehung dieser Tumore bietet weiterhin Grundlage zahlreicher Diskussionen, die im Wesentlichen von vier Entstehungstheorien geprägt sind. Vor allem die sogenannte Konversionstheorie stellte dabei die Grundlage der immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit dar. Im Moment findet die genannte Theorie breiten Zuspruch. Zahlreiche Studien kommen zu dem Ergebnis, dass die sarkomatöse Komponente aus der karzinomatösen entstanden ist¹⁶². Hierbei wird vermutet, dass eine sogenannte Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) stattgefunden hat.

Die Kollisionstheorie, bei der die zwei Komponenten als voneinander unabhängige Neoplasien angesehen werden, kann nahezu ausgeschlossen werden, da das histologische Bild mit zahlreichen sarkomatösen Inseln mitten im Karzinomgewebe dagegen spricht. Darüber hinaus gibt es eine Studie aus dem Jahr 2012, die die gleichzeitige Anwesenheit von Zytokeratin- und Vimentin-positiven Zellen in karzinomatösem Gewebe nachweisen konnte¹⁶³. Dies würde ebenfalls darauf hindeuten, dass es sich bei der sarkomatösen Komponente um eine Art Metaplasie bzw. Transformation des Karzinoms handelt.

Bei der Kompositionstheorie wird vermutet, dass die im Tumor vorkommenden Spindelzellen eine pseudosarkomatöse Reaktion des Stroma auf das Karzinom sind. Diese Theorie kann ebenso widerlegt werden, da es sich bei der sarkomatösen Komponente um ein vollständig ausdifferenziertes, also „echtes“ Sarkom handelt, welches Knorpel, Knochen, Fettgewebe oder Skelettmuskulatur enthalten kann.

Die letzte der vier Theorien, die sogenannte Kombinationstheorie besagt, dass die zwei histologischen Komponenten der Karzinom Sarkome aus einer Stammzelle entstanden sind. Die Plausibilität dieser Theorie kann nicht ausgeschlossen werden, da in einer Studie aus dem Jahr 2011 Gene in uterinen Karzinom Sarkomen nachgewiesen werden konnten, die spezifisch

¹⁶² Stewart CJ et al., 2013. Voutsadakis IA 2012. Lopez-Garcia MA et al., 2010. Horn et al., 2009. McCluggage WG, 2002. Brito PA et al., 1993. Mayall F et al., 1994.

¹⁶³ Kedzia W et al., 2012.

für die Ausbildung des Müller-Gangs sind¹⁶⁴. Andererseits spricht das Vorhandensein epithelialer Antigene in Karzinom- als auch in Sarkomanteilen¹⁶⁵ wiederum gegen diese Theorie.

Wie bereits erwähnt, wird in den letzten Jahren die Konversionstheorie samt stattgefunder Epithelial-Mesenchymaler Transition zunehmend wissenschaftlich anerkannt. Auf die in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren wird nun im Einzelnen näher eingegangen.

Der Zinkfingertranskriptionsfaktor **ZEB1** stellt, über eine Inaktivierung des Adhäsionsproteins E-Cadherin auf transkriptioneller Ebene, einen wichtigen Regulator der EMT dar. Die ZEB1-Expression in Karzinosarkomen des Ovars bzw. Endometriums sowie deren Bedeutung sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Alle immunhistochemischen Färbungen der 47 Fälle zeigten eine Positivität im Zellkern. Diese war allerdings ausschließlich in Sarkomanteilen der Tumore nachweisbar. In sieben Fällen konnte ZEB1 zusätzlich im Cytoplasma nachgewiesen werden. Hier hingegen befanden sich die positiven Zellen in karzinomatösen Tumoranteilen. Die Färbeintensitäten waren in nukleär positiven Zellen überwiegend stark (51,1 % der Fälle), jedoch bei cytoplasmatischer Positivität in allen sieben Fällen maximal schwach. Mittels Kaplan-Meier-Überlebensanalyse und Log-Rank-Test wurde das Gesamtüberleben verglichen mit den unterschiedlichen Färbeintensitäten in Sarkom- und Karzinomanteilen der Tumore. Im Ergebnis zeigte sich in beiden Fällen kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeiten. Wenn man die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch mit aktueller Literatur vergleicht, so müsste eigentlich ein Unterschied erkennbar sein. Eine Studie an Ovarialkarzinomen aus dem Jahr 2013 zeigt, dass die Inhibition von ZEB1 eine EMT verhindern kann sowie mit einer verminderten Zellmigration und somit niedrigeren Metastasierungsrate einhergeht¹⁶⁶. Laut einer Publikation aus dem Jahr 2008 ist eine Überexpression von ZEB1 in Endometriumkarzinomen direkt mit hoher Aggressivität und schlechter Prognose vergesellschaftet¹⁶⁷. Hierbei stellt sich natürlich die Frage, inwieweit man von Endometrium- und Ovarialkarzinomen auf Karzinosarkome schließen kann. Die Studie von Singh et al. bestätigt allerdings auch ein Vorkommen von ZEB1 in Karzi-

¹⁶⁴ Chojamts B et al., 2011.

¹⁶⁵ Kedzia W et al., 2012.

¹⁶⁶ Chen D et al., 2013.

¹⁶⁷ Singh M et al., 2008.

nosarkomen des Uterus. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass der Transkriptionsfaktor vor allem in Tumor-assoziiertem Stroma der Endometriumkarzinome expremiert ist. Dies würde auch unsere Beobachtung über das gehäufte Vorkommen von ZEB1 in den mesenchymalen bzw. sarkomatösen Tumoranteilen untermauern. Eine andere wissenschaftliche Arbeit aus dem Jahr 2006 besagt, dass die sarkomatöse Komponente aggressiver Uterustumoren immer ZEB1 expremiert, für die karzinomatöse Komponente ist die Expression jedoch nur fakultativ der Fall¹⁶⁸. Diese Aussage entspricht genau unseren Ergebnissen. Warum allerdings bei der vorliegenden Arbeit die Analyse der Überlebensdaten im Vergleich mit den unterschiedlichen Färbeintensitäten keinen signifikanten Unterschied ergeben hat, bleibt weiterhin offen. Wenn man die verschiedenen Forschungsarbeiten miteinander vergleicht, so fallen vor allem die stark unterschiedlichen Fallzahlen auf. Da es sich bei Karzinosarkomen an Ovar bzw. Endometrium um sehr seltene Tumoren handelt, war es diesbezüglich schwierig, ein großes Kollektiv zu erstellen. Leider mussten während der laufenden Untersuchungen mehrmals einzelne Fälle aus dem Kollektiv herausgenommen werden. Ursache hierfür war meist die schlechte Darstellung der Tumoranteile. Bei Berechnungen mit relativ kleinen Fallzahlen ist die statistische Variationsbreite der Ergebnisse entsprechend hoch. Etwaige Vertiefungen der bisher greifbaren Ergebnisse könnten also durch eine Erweiterung des Kollektivs erreicht werden.

Wie bei ZEB1 handelt es sich auch bei **ZEB2** um einen sogenannten Zinkfingertranskriptionsfaktor, der über eine Unterdrückung der Transkription wichtiger Zielgene eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der EMT spielt. ZEB2 bindet ebenso wie ZEB1 an die E-Box-Elemente im proximalen Promotorbereich des E-Cadherins und inaktiviert dieses auf transkriptioneller Ebene. So besagt etwa eine Studie aus dem Jahr 2013, dass ZEB2 EMT und damit Invasion und Metastasierung induziert¹⁶⁹. Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, Karzinosarkome des Ovars bzw. Uterus auf die Expression von ZEB2 zu untersuchen und Rückschlüsse aus den immunhistochemischen Ergebnissen bezüglich einer möglich stattgefundenen EMT zu ziehen. Bei der Auswertung des Reaktionsmusters konnten folgende Häufigkeiten beobachtet werden: 21 der 47 ausgewerteten Fälle zeigten sowohl eine positive Reaktion im Kern als auch im Cytoplasma, 15 Fälle waren ausschließlich cytoplasmatisch und sechs Fälle ausschließlich nukleär positiv. Weitere fünf Fälle wurden als komplett nega-

¹⁶⁸ Spoelstra NS et al., 2006.

¹⁶⁹ Nam EH et al., 2013.

tiv eingestuft. Wie bei ZEB1 waren auch hier die positiven nukleären Anteile im Sarkom, die positiven cytoplasmatischen Anteile im Karzinom zu finden. Die Färbeintensitäten konnten, verglichen mit ZEB1, als deutlich weniger stark bewertet werden. Nukleär positive Zellen waren mit einem Anteil von 8,5 % stark, mit 34 % mäßig und mit 12,8 % schwach angefärbt. Der Großteil der Präparate (44,7 %) zeigte dagegen gar keine Positivität im Kern. Im Cytoplasma war die Anfärbung der Zellen maximal mäßig stark ausgeprägt (2,1 %). 74,5 % der Fälle ließen eine schwache Positivität erkennen und 23,4 % wurden der Kategorie „negativ“ zugeteilt. Einer Studie aus dem Jahr 2006 zufolge reguliert ZEB2 in menschlichen Brustkrebszellen die Expression von Vimentin während der EMT und triggert dadurch Zellinvasion und Migration¹⁷⁰. Damals konnte sowohl eine ZEB2- als auch eine Vimentin-Expression nur in invasiven Tumorzellen nachgewiesen werden. Eine weitere Forschungsarbeit aus dem Jahr 2010 besagt, dass ZEB2 nicht ausschließlich im Zellkern maligner Tumorzellen vorkommt, sondern auch in deren Cytoplasma¹⁷¹. In diesen Untersuchungen, die an einer Vielzahl unterschiedlicher Tumore durchgeführt wurden, konnte sogar eine vorherrschende Expression von ZEB2 im Cytoplasma beobachtet werden. In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein gleichzeitiges Vorkommen positiver Zellen in Kern und Cytoplasma am häufigsten beobachtet. Eine rein cytoplasmatische Positivität war allerdings mit 31,9 % das zweithäufigste Reaktionsmuster. Beim Vergleich der Überlebensdaten der unterschiedlichen immunohistochemischen Färbemuster konnte ebenfalls keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Jedoch bestätigen die Kaplan-Meier-Kurven in den Graphiken 51 und 52 eine etwas bessere Prognose für Patientinnen, bei denen keine ZEB2-Expression im Tumorgewebe festzustellen war. Diese Beobachtung deckt sich mit den Aussagen anderer Studien, welche behaupten, dass ein ZEB2-Vorkommen in Tumorzellen mit einer schlechten Prognose bzw. Invasion und Metastasierung verbunden ist^{172 173}. Wie schon bei der Diskussion zu ZEB1 erwähnt, stellt auch hier die niedrige Fallzahl eine mögliche Fehlerquelle bei der statistischen Auswertung dar, was wiederum eine Aufstockung des Kollektivs nahelegt.

¹⁷⁰ Bindels S et al., 2006.

¹⁷¹ Oztas E et al., 2010.

¹⁷² Oztas E et al., 2010.

¹⁷³ Sayan AE et al., 2009.

Snail kann, ebenso wie ZEB1 und ZEB2, als Zinkfingertranskriptionsfaktor die Expression von E-Cadherin unterdrücken. Mesenchymale Gene werden dagegen hochreguliert. Als sogenannter „EMT-Inducer“ scheint der Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei der Einleitung der EMT zu spielen. Insbesondere aus diesem Grund wurde er in die vorliegenden Untersuchungen mit aufgenommen. Eine Studie aus dem Jahr 2013 definiert den EMT-Status über eine verminderte Expression von E-Cadherin bei gleichzeitiger nukleärer Expression von snail¹⁷⁴. Die immunhistochemischen Auswertungen ergaben in 40 von 47 Fällen eine positive Reaktion im Kern der Tumorzellen. Mit Hilfe des Remmele-Scores wurde versucht, diese Beobachtung zu quantifizieren, und es zeigten 20 Fälle eine geringe, 16 Fälle eine mäßige und 4 Fälle eine starke snail-Expression. Als komplett negativ waren 7 einzustufen. Ein Unterschied in der Höhe des Remmele-Scores zwischen homolog und heterolog differenzierter Karzinosarkome konnte mit $p=0,921$ nicht festgestellt werden. Auch bei der Analyse der Überlebensdaten in Abhängigkeit der snail-Positivität ($p=0,187$) und der Höhe des Remmele-Scores ($p=348$) wurden statistisch keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben ermittelt. Jedoch war es möglich, in den Kaplan-Meier-Kurven (Graphik 53 und 55) und im Boxplot-Diagramm (Graphik 54) ein besseres Überleben bei geringerer snail-Expression abzulesen. Dies könnte indirekt die Aussage einer Studie aus dem Jahr 2009 unterstützen, die besagt, dass der Nachweis von snail mit einem höheren Vorkommen von Fernmetastasen vergesellschaftet ist¹⁷⁵. Da in unserem Kollektiv insgesamt nur bei fünf Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Fernmetastasen diagnostiziert wurden, kann über den Zusammenhang von Fernmetastasen und einer snail-Positivität keine ausreichende Antwort gegeben werden. Interessanterweise waren aber genau alle der fünf genannten Patientinnen snail-negativ. Diese Beobachtung überrascht, ist aber mit großer Wahrscheinlichkeit auf die geringe Anzahl ($n=5$) der Patientinnen mit diagnostizierten Fernmetastasen zurückzuführen. Inwiefern snail ein spezifischer Marker für eine stattfindende EMT sein kann, bleibt weiterhin fraglich, da eine Publikation aus dem Jahr 2013 die Beobachtung schildert, dass der Transkriptionsfaktor nicht ausschließlich auf maligne Zellen begrenzt, sondern auch in gesunden Oberflächenepithelien des Ovars exprimiert ist¹⁷⁶.

¹⁷⁴ Tanaka Y et al., 2013.

¹⁷⁵ Polyak K, Weinberg RA. 2009.

¹⁷⁶ Wakahashi S et al., 2013.

Dem **Tumorsuppressor p53** wird eine zentrale Funktion bei der Kontrolle des Zellwachstums zugeschrieben. Er kann eine Inhibition des Zellzyklus (Zellzyklus-Arrest) oder die Transkription von Apoptose-Mediatoren hervorrufen, was somit den Zelluntergang zur Folge hat. Da in ungefähr 55% aller menschlichen Tumore eine p53-Mutation nachgewiesen werden kann und da das Protein eine wichtige Rolle bei der Regulierung der EMT zu spielen scheint, wurde es ebenfalls Gegenstand unserer immunhistochemischen Untersuchungen. Dabei konnte in 76,6 % der Fälle eine nukleäre Färbung von p53 im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Nur ein einzelner Fall zeigte eine cytoplasmatische Reaktion, während die restlichen zehn Fälle überhaupt nicht reagierten. Hinsichtlich der Lokalisation konnte in beiden Tumoranteilen, also sowohl in Karzinom als auch in Sarkom, positive Zellen auffindig gemacht werden. Mit einem p-Wert von 0,026 war es möglich, einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen homologer und heterologer Differenzierung bezüglich der Höhe des p53-Remmele-Scores festzustellen. Dieser war bei heterologer Differenzierung im Durchschnitt höher als bei homologer. Bei der Überlebensanalyse war zwischen den einzelnen Gruppen unterschiedlicher p53-Expression sowie der Höhe des Remmele-Scores kein signifikanter Unterschied auffindig zu machen. Auch die dazugehörigen Graphiken zeigen keine relevanten Differenzen im Gesamtüberleben. Einer im Jahr 2009 veröffentlichten Studie zufolge finden sich p53-positive Zellen sowohl in mesenchymalen als auch in epithelialen Anteilen der Tumore¹⁷⁷. Diese Annahme kann durch die durchgeführten Untersuchungen im Rahmen unserer Arbeit bestätigt werden, da 45,9 % der Präparate eine gleichzeitige Positivität sowohl in Karzinom- als auch in Sarkomanteilen der Malignome aufgewiesen haben. Eine weitere wissenschaftliche Untersuchung hat gezeigt, dass p53 aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert werden kann, wodurch p53 in der eigentlichen Funktion gestört wird¹⁷⁸. Leider war eine Überprüfung dieses Phänomens in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da nur ein Fall aus unserem Kollektiv eine cytoplasmatische Positivität gezeigt hat und dieser wiederum bei der Überlebensanalyse zensiert werden musste. Dass mutiertes p53 zu Tumorprogression und Metastasierung führt, belegt zusätzlich eine Studie aus dem Jahr 2013, in der mutiertes p53 einen Proteinkomplex mit ZEB2 und p63 eingeht und so über eine Hemmung des p63-Proteins eine gesteigerte snail-Aktivität und somit die Einleitung

¹⁷⁷ Horn et al., 2009.

¹⁷⁸ Haupt et al., 1997.

der EMT bedingt¹⁷⁹. Darüber hinaus konnte in derselben Studie eine p53-Mutation in nahezu 96% der untersuchten serösen Ovarialkarzinome festgestellt werden. Diese Beobachtung unterstreicht die zentrale Rolle des p53-Proteins bei Tumorwachstum, Metastasierung und somit auch bei der Epithelial-Mesenchymalen Transition.

In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit und im Hinblick auf die aktuelle Literatur scheint eine stattgefunden EMT bei Karzinosarkomen des Ovars und Uterus sehr wahrscheinlich zu sein. Dass alle vier untersuchten Faktoren in den 47 Präparaten immunhistochemisch nachweisbar waren, dürfte – insbesondere unter Berücksichtigung aktueller Forschungsarbeiten – den Hinweis auf eine stattgefunden Epithelial-Mesenchymale Transition darstellen. So konnte etwa bei allen Präparaten eine nukleäre ZEB1-Positivität festgestellt werden. ZEB2 war nur in fünf Fällen komplett negativ und snail zeigte in 40 von 47 Fällen ebenfalls eine nukleäre Positivität. Auch p53 war mit 76,6% der Fälle in den Zellkernen nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Transkriptionsfaktoren ZEB1, ZEB2, snail und das p53-Protein entscheidende Funktionen bei der Entstehung und Progression von malignen mesodermalen Müllerschen Mischtumoren (MMMT) innehaben. Darüber hinaus sprechen Beobachtungen wie das Vorkommen sowohl epithelialer als auch mesenchymaler Marker in den Sarkomanteilen der Tumore für die Konversionstheorie. Auch der Nachweis von identischen p53-Proteinen in MMMTs und hochmalignen Endometriumkarzinomen¹⁸⁰ ist ein Hinweis auf eine stattgefunden metaplastische Umwandlung des Karzinomgewebes. Die karzinomatöse Komponente scheint im Hinblick auf Aggressivität und Prognose außerdem der dominante Teil der Karzinosarkome zu sein¹⁸¹. Es wurde zudem festgestellt, dass Metastasen in bis zu 94% aller Fälle rein karzinomatös oder karzinosarkomatös, aber nur selten rein sarkomatös sind¹⁸². In der Summe ist deshalb zu resümieren, dass die genannten Argumente – in Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit – das Zutreffen der Konversionstheorie noch wahrscheinlicher machen. Weiterführende Ergebnisse könnten im Rahmen molekularpathologischer Untersuchungen und eventuell unter Einbezug breiterer Patientenkollektive erbracht werden.

¹⁷⁹ Hu J et al., 2013.

¹⁸⁰ Taylor NP et al., 2006.

¹⁸¹ Taylor NP et al., 2006.

¹⁸² Uterine Sarkome und Mischtumoren, Köhler und Evert, 2009, S.179-184.

5. Zusammenfassung

Karzinom Sarkome oder maligne mesodermale Müllersche Mischtumoren (MMMT) sind sehr seltene, hochmaligne Tumoren der Frau, die vor allem im Corpus, seltener in der Cervix uteri, und in den Ovarien auftreten. Bei 2-3% der Uterusmalignomen und weniger als 1% der Ovarialtumoren handelt es sich um Karzinom Sarkome. Die Bezeichnung Mischtumor erklärt sich durch das gleichzeitige Auftreten von karzinomatösen und sarkomatösen Anteilen im gleichen Tumor. In Abhängigkeit von der sarkomatösen Komponente unterscheidet man zwischen homologen und heterologen Karzinom Sarkomen. Der heterologe Typ besteht – neben entartetem Uterus- bzw. Ovarialgewebe – zusätzlich aus Knorpel, Knochen, Fettgewebe oder Skelettmuskulatur. Die Prognose eines diagnostizierten Karzinom Sarkoms ist schlecht und geht mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 30-40% für das uterine und unter 10% für das ovarielle Karzinom Sarkom einher. Viele Aspekte dieser Tumore sind bis heute ungeklärt. Vor allem die Frage nach der Entstehung der Karzinom Sarkome ist weiterhin Gegenstand vielfacher Diskussionen. Jedoch gibt es mittlerweile zahlreiche Hinweise, die das Zutreffen der sogenannten Konversionstheorie vermuten lassen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand immunhistochemischer Methoden die Gültigkeit dieser Theorie samt der damit verbundenen Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) untersucht werden. Bei der EMT handelt es sich um einen Prozess, bei dem Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften übergehen, was somit einer Phänotyptransition gleich kommt. Hinsichtlich der Entstehung der Karzinom Sarkome bedeutet dies, dass die sarkomatöse Komponente aus der karzinomatösen entstanden ist. Ziel dieser Arbeit war es, die an der EMT beteiligten Transkriptionsfaktoren ZEB1, ZEB2, snail sowie das p53-Protein in ihrem Expressionsverhalten speziell bei Karzinom Sarkomen zu untersuchen. Hierzu wurden Gewebeproben von 47 – in den Jahren 1988 bis 2005 gesammelten – Fällen immunhistochemisch angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Das mittlere Erkrankungsalter der Patientinnen betrug 69 Jahre. Bei 30 Fällen handelte es sich jeweils um ein Malignom des Ovars, in den restlichen 17 Fällen war der Tumor uterin lokalisiert. Bezüglich der Differenzierung konnten 24 Malignome in homologe und 23 Malignome in heterologe Karzinom Sarkome eingestuft werden. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zeigte bei allen Präparaten eine nukleäre ZEB1-Positivität in den sarkomatösen Tumoranteilen. Diese waren zu 51% stark angefärbt. Weitere 7 Fälle wiesen eine schwache cytoplasmatische Reaktion auf, die allerdings nur in den Karzinomkomponenten zu beobachten war. ZEB2 zeigte in 45% der Fälle sowohl

nukleäre als auch cytoplasmatische, in 32% der Fälle eine rein cytoplasmatische und in 13% der Fälle eine rein nukleäre Positivität. Wie bei ZEB1 waren auch hier die positiven nukleären Anteile im Sarkom, die positiven cytoplasmatischen Anteile im Karzinom zu finden, allerdings mussten die Färbintensitäten deutlich schwächer eingestuft werden (lediglich 9% stark nukleär positiv, cytoplasmatisch maximal mäßig positiv in 13% der Fälle). Der Transkriptionsfaktor snail zeigte ausschließlich im Kern eine Positivität (85% der Fälle) und nicht im Cytoplasma der Tumorzellen. Jedoch konnte man die angefärbten Zellen sowohl in Karzinom- als auch in Sarkomkomponenten der Tumore finden. Anhand des Remmele-Scores wurden 20 Fälle mit geringer, 16 mit mäßiger und 4 mit starker snail-Expression nachgewiesen. Der Tumorsuppressor p53 war in 77% der Fälle ebenfalls in den Zellkernen der Karzinom- und Sarkomanteile zu finden. Nur ein Fall zeigte eine schwach positive Reaktion im Cytoplasma. Auch hier konnte mit Hilfe des Remmele-Scores in 11 Fällen eine geringe, in 16 eine mäßige und in 10 eine starke Expression ermittelt werden. Ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,026$) zwischen homologer und heterologer Differenzierung bezüglich der Höhe des p53-Remmele-Scores wurde zusätzlich festgestellt. Dieser war bei heterologer Differenzierung im Durchschnitt höher als bei homologer. Die Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere die immunhistochemische Nachweisbarkeit der untersuchten Faktoren, deuten darauf hin, dass ZEB1, ZEB2, snail sowie p53 bei der Entstehung und Progression von Karzinosarkomen durchaus von Bedeutung sind. Eine stattgefunden Epithelial-Mesenchymale Transition scheint somit wahrscheinlich zu sein, was die Gültigkeit der Konversionstheorie unterstützt. Es wäre denkbar, dass weiterführende Ergebnisse unter Einbezug breiterer Patientenkollektive und im Rahmen molekularpathologischer Untersuchungen erbracht werden könnten.

6. Literaturverzeichnis

- 1) **Barrallo-Gimeno A, Nieto MA.** The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 2005; 132(14): 3151-3161.
- 2) **Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herberos A.** The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000; 2(2):84-89.
- 3) **Beckmann MW, Niederacher D, Massenkeil G, Tutschek B, Beckmann A, Schenke G, Schnürch HG, Bender HG.** Expression Analysis of epidermal Growth Factor Receptor and HER-2/neu: No Advantage of Prediction of Recurrence or Survival in Breast Cancer Patients. *Oncology*. 1996; 53, 441-447.
- 4) **Bindels S, Mestdagt M, Vandewalle C, Jacobs N, Volders L, Noël A, van Roy F, Berx G, Foidart JM, Gilles C.** Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene*. 2006; 25(36):4975-4985.
- 5) **Blaustein A.** Pathology of the female genital tract. Malignant Mixed Mullerian Tumors. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin 1977; 331-340.
- 6) **Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A.** The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci*. 2003; 116(3):499-511.
- 7) **Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, Nieto MA.** Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J*. 2006; 25(23):5603-5613.
- 8) **Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T.** Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs*. 2005; 179(1-2):56-65.
- 9) **Brito PA, Silverberg SG, Orenstein JM.** Carcinosarcoma (malignant mixed müllerian (mesodermal) tumor) of the female genital tract: immunohistochemical and ultrastructural analysis of 28 cases. *Hum Pathol*. 1993; 24(2):132-142.
- 10) **Brustmann H.** Ovarian carcinosarcoma associated with bilateral tubal intraepithelial carcinoma: a case report. *Int J Gynecol Pathol* 2013; 32:384-389.
- 11) **Burges A, Schmalfeldt B.** Ovarialkarzinom. Diagnostik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 108. 2011; 38:635-641.
- 12) **Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA.** The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000; 2(2):76-83.
- 13) **Castro Alves C, Rosivatz E, Schott C, Hollweck R, Becker I, Sarbia M, Carneiro F, Becker KF.** Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin. *J Pathol*. 2007; 211(5): 507-515.
- 14) **Cawley S, Bekiranov S, Ng HH, Kapranov P, Sekinger EA, Kampa D, Piccolboni A, Sementchenko V, Cheng J, Williams AJ, Wheeler R, Wong B, Drenkow J, Yamana M, Patel S, Brubaker S, Tammanna H, Helt G, Struhl K, Gingeras TR.** Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell*. 2004; 116(4):499-509.

- 15) **Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, et al.** The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* 2009; 138:1083–1095.
- 16) **Chang CJ, Chao CH, Xia W, Yang JY, Xiong Y, Li CW, Yu WH, Rehman SK, Hsu JL, Lee HH, Liu M, Chen CT, Yu D, Hung MC.** p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol* 2011; 13:317–323.
- 17) **Chang J, Sharpe JC, A'Hern RP, Fisher C, Blake P, Shepard J, Gore ME.** Carcinosarcoma of the ovary: Incidence, prognosis, treatment and survival of the patients. *Ann Oncol.* 1995. 6(8): 775-778.
- 18) **Chen D, Wang J, Zhang Y, Chen J, Yang C, Cao W, Zhang H, Liu Y, Dou J.** Effect of Down-Regulated Transcriptional Repressor ZEB1 on the Epithelial-Mesenchymal Transition of Ovarian Cancer Cells. *Int J Gynecol Cancer.* 2013; 23(8):1357-1366.
- 19) **Choijamts B, Jimi S, Kondo T, Naganuma Y, Matsumoto T, Kuroki M, Iwasaki H, Emoto M.** CD133+ cancer stem cell-like cells derived from uterine carcinosarcoma (malignant mixed Müllerian tumor). *Stem Cells.* 2011; 29(10):1485-1495.
- 20) **Cho SB, Park CM, Park SW, Kim SH, Kim KA, Cha SH, Chung IJ, Kim YW, Yoon YK, Kim JS.** Malignant mixed mullerian tumor of the ovary. *Eur Radiol,* 2001; 11(7):1147-1150.
- 21) **Christofori G.** Snail1 links transcriptional control with epigenetic regulation. *EMBO J.* 2010; 29(11):1787-1789.
- 22) **Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F.** The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell.* 2001; 7(6):1267-1278.
- 23) **Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A.** The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest.* 2002; 109(8):987-991.
- 24) **Costa MJ, Vogelsan J, Young LJ.** p53 gene mutation in female genital tract carcinosarcomas (malignant mixed müllerian tumors): a clinicopathologic study of 74 cases. *Mod Pathol.* 1994; 7(6):619-627.
- 25) **Dillner NB, Sanders MM.** Transcriptional activation by the zinc-finger homeodomain protein delta EF1 in estrogen signaling cascades. *DNA Cell Biol.* 2004; 23(1):25-34.
- 26) **DiSilvestro PA, Gajewski WH, Ludwig ME, Kourea H, Sung J, Granai CO.** Malignant mixed mesodermal tumors of the ovary. *Obstet Gynecol,* 1995; 86: 780-782.
- 27) **Francí C, Gallén M, Alameda F, Baró T, Iglesias M, Virtanen I, García de Herreros A.** Snail1 protein in the stroma as a new putative prognosis marker for colon tumours. *PLoS One.* 2009; 4(5):e5595.
- 28) **Funahashi J, Sekido R, Murai K, Kamachi Y, Kondoh H.** Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in post-gastrulation embryogenesis. *Development.* 1993; 119(2):433-446.
- 29) **Garg G, Shah JP, Kumar S, Bryant CS, Munkarah A, Morris RT.** Ovarian and uterine carcinosarcomas: a comparative analysis of prognostic variables and survival outcomes. *Int J Gynecol Cancer.* 2010; 20(5):888-894.
- 30) **Gavert N, Ben-Ze'ev A.** Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med.* 2008; 14(5):199-209.

- 31) **Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, Ben-Ze'ev A.** L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol.* 2005; 168(4):633-642.
- 32) **Gohring UJ, Scharl A, Ahr A.** Der Stellenwert der immunhistochemischen Bestimmung von Rezeptoren, Gewebsproteasen, Tumorsuppressorproteinen und Proliferationsmarkern als Prognoseindikatoren beim primären Mammakarzinom. *Geburts- hilfe und Frauenheilkunde.* 1996; 56 (4), 177-183.
- 33) **Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ.** The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008; 10(5):593-601.
- 34) **Grünert S, Jechlinger M, Beug H.** Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(8):657-665.
- 35) **Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG, Baulida J.** Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem.* 2002; 277(42):39209-39216.
- 36) **Günthert AR.** Sarcomas and mixed mesodermal tumors of the uterus. *Ther Umsch.* 2011; 68(10):559-564.
- 37) **Hanker LC, Kaufmann M.** Seltene gynäkologische Tumoren. *Onkologe* 15. 2009; 261-269.
- 38) **Hantschmann P.** Seltene Uterusmalignome. *Journal Onkologie* 8, 2008.
- 39) **Harris MA, Delap LM, Sengupta PS, Wilkinson PM, Welch RS, Swindell R, Shanks JH, Wilson G, Slade RJ, Reynolds K, Jayson GC.** Carcinosarcoma of the ovary. *Br J Cancer* 88, 2003; 654-657.
- 40) **Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M.** Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 1997; 387(6630): 296-299.
- 41) **Hermeking H.** p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* 2007; 12:414-418.
- 42) **Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC.** p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991; 253(5015):49-53.
- 43) **Horn LC, Dallacker M, Bilek K.** Carcinosarcomas (malignant mixed Mullerian tumors) of the uterus. Morphology, pathogenetic aspects and prognostic factors. *Pathologe.* 2009; 30(4):292-301.
- 44) **Horn LC, Schierle K, Schmidt D, Ulrich U, Liebmann A, Wittekind C.** Current TNM/FIGO classification for cervical and endometrial cancer as well as malignant mixed müllerian tumors. *Pathologe,* 2011; 32(3):239-243.
- 45) **Horst D.** Plasticity of WNT signaling activity in colorectal cancer. *Pathologe.* 2012; 33 Suppl 2:194-197.
- 46) **Horst D, Reu S, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A.** The intratumoral distribution of nuclear beta-catenin is a prognostic marker in colon cancer. *Cancer.* 2009; 115(10):2063-2070.
- 47) **Hu J, Liu Z, Wang X.** Does TP53 mutation promote ovarian cancer metastasis to omentum by regulating lipid metabolism? *Med Hypotheses.* 2013; 81(4):515-520.
- 48) **Hugo HJ, Kokkinos MI, Blick T, Ackland ML, Thompson EW, Newgreen DF.** Defining the E-cadherin repressor interactome in epithelial-mesenchymal transition: the PMC42 model as a case study. *Cells Tissues Organs.* 2011; 193(1-2):23-40.

- 49) **Kalluri R, Weinberg RA.** The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119(6):1420-1428.
- 50) **Kedzia W, Pruski D, Iwaniec K, Przybylski M, Friebe Z, Rajpert-Kedzia H.** Carcinosarcoma (malignant mixed mesodermal tumor) of the uterus: clinicoimmunohistochemical and histogenetic characteristics. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012; 50(4):513-518.
- 51) **Kim T, Veronese A, Pichiorri F, Lee TJ, Jeon YJ, Volinia S, Pineau P, Marchio A, Palatini J, Suh SS, Alder H, Liu CG, Dejean A, Croce CM.** p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J Exp Med.* 2011; 208(5):875-883.
- 52) **Köhler G, Evert M.** Uterine Sarkome und Mischtumoren. *Handbuch und Bildatlas zur Diagnostik und Therapie.* Walter de Gruyter Berlin 2009; 158-184.
- 53) **Kurman R.J., Carcangiu M.L., Herrington C.S., Young R.H.** WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, Volume 6. IARC 2014.
- 54) **Lane DP.** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992; 358(6381):15-16.
- 55) **Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Ling MT, Kwok WK, Wang XH, Wong YC, Guan XY, Man K, Chau KL, Fan ST.** Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(18):5369-5376.
- 56) **Lee TK, Man K, Poon RT, Lo CM, Yuen AP, Ng IO, Ng KT, Leonard W, Fan ST.** Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2006; 66(20):9948-9956.
- 57) **Lopez-Garcia MA, Palacios J.** Pathologic and molecular features of uterine carcinosarcomas. *Semin. Diagn. Pathol.* 2010; 27; 274-286.
- 58) **Mano MS, Rosa DD, Azambuja E, Ismael G, Braga S, D'Hondt V, Piccart M, Awada A.** Current management of ovarian carcinosarkoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2007; 17: 316-324.
- 59) **Mayall F, Ruddy K, Campbell F, Goddard H.** Histopathology, p53 immunostaining suggests that uterine carcinosarcomas are monoclonal. 1994; 24(3):211-214.
- 60) **McCluggage WG.** Uterine carcinosarcomas (malignant mixed Mullerian tumors) are metaplastic carcinomas. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2002; 12; 687-690.
- 61) **McCluggage WG.** Malignant biphasic uterine tumours: carcinosarcomas or metaplastic carcinomas? *J. Clin. Pathol.* 2002; 55; 321-325.
- 62) **Medici D, Hay ED, Olsen BR.** Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol Biol Cell.* 2008; 19(11):4875-4887.
- 63) **Mejlvang J, Kriajevska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Berx G, Mellon JK, Tulchinsky E.** Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(11):4615-4624.
- 64) **Miska EA.** MicroRNAs--keeping cells in formation. *Nat Cell Biol.* 2008; 10(5):501-502.
- 65) **Moll UM, Schramm LM.** p53-An Acrobat in Tumorigenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 1998; 1:23-37.
- 66) **Morton JP, Timpson P, Karim SA, et al.** Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:246-251.

- 67) **Murray SA, Gridley T.** Snail1 gene function during early embryo patterning in mice. *Cell Cycle*. 2006; 5(22):2566-2570.
- 68) **Nam EH, Lee Y, Zhao XF, Park YK, Lee JW, Kim S.** ZEB2-Sp1 cooperation induces invasion by upregulating cadherin-11 and integrin $\alpha 5$ expression. *Carcinogenesis*. 2013.
- 69) **Nelson WJ, Nusse R.** Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004; 303(5663):1483-1487.
- 70) **Nieto M, Cano A.** The epithelial–mesenchymal transition under control: Global programs to regulate epithelial plasticity. *Seminars in Cancer Biology*. 2012; 22(5-6):361–368.
- 71) **Nollet F, Kools P, van Roy F.** Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*. 2000; 299(3):551-572.
- 72) **Ohashi S, Natsuizaka M, Wong GS, Michaylira CZ, Grugan KD, Stairs DB, Kalabis J, Vega ME, Kalman RA, Nakagawa M, Klein-Szanto AJ, Herlyn M, Diehl JA, Rustgi AK, Nakagawa H.** Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Res*. 2010; 70(10):4174-4184.
- 73) **Olmeda D, Montes A, Moreno-Bueno G, Flores JM, Portillo F, Cano A.** Snai1 and Snai2 collaborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines. *Oncogene*. 2008; 27(34):4690-4701.
- 74) **Oztas E, Avci ME, Ozcan A, Sayan AE, Tulchinsky E, Yagci T.** Novel monoclonal antibodies detect Smad-interacting protein 1 (SIP1) in the cytoplasm of human cells from multiple tumor tissue arrays. *Exp Mol Pathol*. 2010; 89(2):182-189.
- 75) **Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME.** Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene*. 2006; 25(11):1602-1611.
- 76) **Park JY, Kim DY, Suh DS, Kim JH, Kim YM, Kim YT, Nam JH.** Prognostic factors and treatment outcomes of patients with uterine sarcoma: analysis of 127 patients at a single institution, 1989-2007. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008; 134(12):1277-1287.
- 77) **Peinado H, Olmeda D, Cano A.** Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(6):415-428.
- 78) **Peiró S, Escrivà M, Puig I, Barberà MJ, Dave N, Herranz N, Larriba MJ, Takkunen M, Francí C, Muñoz A, Virtanen I, Baulida J, Herreros A.** Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(7): 2077–2084.
- 79) **Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A.** A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem*. 2001; 276(29):27424-27431.
- 80) **Petru E, Jonat W, Fink D, Köchli O.** *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. 3. Auflage. 2011; Springer Verlag, Berlin/Heidelberg; S.58.
- 81) **Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME.** Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene*. 2006; 25(11):1602-1611.
- 82) **Polyak K, Weinberg RA.** Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:265-273.
- 83) **Postigo AA, Dean DC.** ZEB, a vertebrate homolog of *Drosophila* Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation. *EMBO J*. 1997; 16(13):3935-3943.

- 84) **Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL.** Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J.* 2003; 22(10):2453-2462.
- 85) **R&D Systems.** Epithelial to Mesenchymal Transition, 2010.
- 86) **Remmele W, Bässler R, Böcker W, Dallenbach-Hellweg G, Diemel M, Harms , Klöppel G, Müntefering H, Podleck J, Saeger W, Schmid KW, Schmidt D, Vogel M.** Pathologie Bd. 4. Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen; Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen; Tumoren des Kindesalters; Endokrine Organe. 2., neubearbeitete Auflage, Springer Verlag Berlin 1997; 105-106.
- 87) **Remmele W, Stegner HE.** Immunhistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptoren (ERICA) im Mammakarzinomgewebe: Vorschlag zur einheitlichen Bewertung des Untersuchungsbefundes. *Der Frauenarzt* 1987; 41-43.
- 88) **Remmele W, Stegner HE.** Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie.* 1987; 8(3):138-140.
- 89) **Schubert J, Brabletz T.** p53 Spreads out further: suppression of EMT and stemness by activating miR-200c expression. *Cell Res.* 2011; 21(5):705-707.
- 90) **Savagner P.** Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays.* 2001; 23(10):912-923.
- 91) **Sayan AE, Griffiths TR, Pal R, Browne GJ, Ruddick A, Yagci T, Edwards R, Mayer NJ, Qazi H, Goyal S, Fernandez S, Straatman K, Jones GD, Bowman KJ, Colquhoun A, Mellon JK, Kriajevska M, Tulchinsky E.** SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(35):14884-14889.
- 92) **Scottish Hysteroscopy Audit Group.** A Scottish audit of hysteroscopic surgery for menorrhagia: complications and follow up. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 102. 1995; 249-254.
- 93) **Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K.** Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(9):3533-3544.
- 94) **Silverberg SG.** Histopathologic Grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* 19, 2000; 7-15.
- 95) **Singh M, Spoelstra NS, Jean A, Howe E, Torkko KC, Clark HR, Darling DS, Shroyer KR, Horwitz KB, Broaddus RR, Richer JK.** ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease. *Mod Pathol.* 2008; 21(7):912-923.
- 96) **Soini Y, Tuhkanen H, Sironen R, Virtanen I, Kataja V, Auvinen P, Mannermaa A, Kosma VM.** Transcription factors zeb1, twist and snai1 in breast carcinoma. *BMC Cancer.* 2011; 11:73.
- 97) **Soong R, Knowles S, Hammond IG, Michael C, Iacopetta BJ.** p53 protein overexpression and gene mutation in mixed Müllerian tumors of the uterus. *Cancer Detect Prev.* 1999; 23(1):8-12.
- 98) **Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Jung A, Kirchner T, Brabletz T.** Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions during cancer progression. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2007; 91:21-28.
- 99) **Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J, Brabletz T.** The transcriptional

- repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res.* 2008; 68(2):537-544.
- 100) **Spoelstra NS, Manning NG, Higashi Y, Darling D, Singh M, Shroyer KR, Broaddus RR, Horwitz KB, Richer JK.** The transcription factor ZEB1 is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers. *Cancer Res.* 2006; 66(7):3893-3902.
- 101) **Sporn MB.** The war on cancer. *Lancet.* 1996; 347 (9012):1377-1381.
- 102) **Stewart CJ, McCluggage WG.** Epithelial-mesenchymal transition in carcinomas of the female genital tract. *Histopathology.* 2013; 62(1):31-43.
- 103) **Takeichi M.** Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 1991; 251(5000):1451-1455.
- 104) **Tanaka Y, Terai Y, Kawaguchi H, Fujiwara S, Yoo S, Tsunetoh S, Takai M, Kanemura M, Tanabe A, Ohmichi M.** Prognostic impact of EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression in endometrial cancer. *Cancer Biol Ther.* 2013; 14(1):13-19.
- 105) **Taylor NP, Zigelboim I, Huettner PC, Powell MA, Gibb RK, Rader JS, Mutch DG, Edmonston TB, Goodfellow PJ.** DNA mismatch repair and TP53 defects are early events in uterine carcinosarcoma tumorigenesis. *Mod Pathol.* 2006; 19(10):1333-1338.
- 106) **Thiery JP, Sleeman JP.** Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(2):131-142.
- 107) **Tumorzentrum München.** Tumormanual 2010, Maligne Ovarialtumore. 23 und 83-84.
- 108) **Tumorzentrum München.** Tumormanual 2007, Uterusmalignome. 21-23.
- 109) **Usami Y, Satake S, Nakayama F, Matsumoto M, Ohnuma K, Komori T, Semba S, Ito A, Yokozaki H.** Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J Pathol.* 2008; 215(3):330-339.
- 110) **Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Berx G.** SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(20):6566-6578.
- 111) **Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA.** Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 2004; 18(10):1131-1143.
- 112) **Verschueren K, Remacle JE, Collart C, Kraft H, Baker BS, Tylzanowski P, Nelles L, Wuytens G, Su MT, Bodmer R, Smith JC, Huylebroeck D.** SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem.* 1999; 274 (29): 20489-20498.
- 113) **Voutsadakis IA.** Epithelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of uterine malignant mixed Müllerian tumours: the role of ubiquitin proteasome system and therapeutic opportunities. *Clin Transl Oncol.* 2012; 14(4):243-253.
- 114) **Wakahashi S, Sudo T, Oka N, Ueno S, Yamaguchi S, Fujiwara K, Ohbayashi C, Nishimura R.** VAV1 represses E-cadherin expression through the transactivation of Snail and Slug: a potential mechanism for aberrant epithelial to mesenchymal transition in human epithelial ovarian cancer. *Transl Res.* 2013; 162(3):181-190.
- 115) **Wang SP, Wang WL, Chang YL, Wu CT, Chao YC, Kao SH, Yuan A, Lin CW, Yang SC, Chan WK, Li KC, Hong TM, Yang PC.** p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol.* 2009; (6):694-704.
- 116) **Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA.** Twist, a master regulator of morphogene-

- sis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004; 117(7):927-939.
- 117) **Yang J, Weinberg RA.** Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 2008; 14(6):818-829.
- 118) **Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, Weiss SJ.** Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem*. 2005; 280(12):11740-11748.
- 119) **Yoshida J, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi A, Osada R, Ohira S, Shiozawa T, Konishi I.** Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1, and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression. *Med Mol Morphol*. 2009; 42(2):82-91.
- 120) <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/getpic-fra.cfm?id=002993>
- 121) <http://www2.uni-jena.de/ufk/cdVorlesung/enmm0007ak.jpg>
- 122) <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/getpic-fra.cfm?id=003676>
- 123) <http://peir.net/> PEIR Bild Nr. 402711
- 124) <http://www.springermedizin.de/seroese-tumoren-des-ovars/5163492.html>

Eidesstattliche Versicherung

Filser, Carolin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) in Karzinosarkomen des Ovars und Endometriums: Immunhistochemische Untersuchungen mit Korrelation zum Überleben

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.

München, 19.9.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand