

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

Einfluss immunmodulatorischer Faktoren im frühen und späten Endometriumkarzinom

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

vorgelegt von

Amelie Elisabeth Birk

aus

Tübingen

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Doris Mayr Prof. Dr. Ralph Mocikat
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. Dr.med Ulrich Andergassen Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl
Dekan:	Prof. Dr.med.dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	16.05.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1. Einführung.....	7
1.1 Bedeutung des Endometriumkarzinoms	7
1.1.1 Epidemiologie.....	7
1.1.2 Histologie, Pathogenese und molekulare Klassifikation	8
1.1.3 Diagnostik	12
1.1.4 Therapie.....	14
1.1.5 Risikofaktoren/ Komorbiditäten, Prävention/Screening	16
1.2 Ansatz der Arbeit	19
1.2.1 Charakterisierung von neoangiogenetischen und hormonellen Faktoren in Endometriumkarzinomen	19
1.2.2 Circulating Tumor Cells – Markergene der Metastasierung	20
1.3 Methodischer Ansatz	21
1.3.1 Immunhistochemische Untersuchung von Primärtumorgewebe	21
1.3.2 Detektion möglicher Markergene der Metastasierung.....	22
1.3.3 Potentielle targets in Endometriumkarzinomen.....	24
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	29
2. Material und Methoden	31
2.1 Immunhistochemische Untersuchung auf Oberflächen-marker.....	31
2.1.1 Kollektivanalyse der Tumorpräparate	31
2.1.2 Spezifische Antikörper gegen LHCGR und VEGFR-2	37
2.1.3 Methodik der immunhistochemischen Untersuchung.....	2
2.2 Real-Time PCR	2
2.2.1 Kulturmedien und Subkultivierung	3
2.2.2 Isolation von Stromazellen aus gesundem Endometrium	5
2.2.3 RNA Isolierung	6
2.2.4 Reverse Transkription	7

2.2.5	Real-Time PCR	8
2.2.6	Auswertung	11
3.	Ergebnisse	12
3.1	Immunhistochemische Untersuchung an Primärtumor-gewebe	12
3.1.1	Deskriptive Statistik der VEGFR2 und LHCGR- Expression im Kollektiv 12	
3.1.2	Alter bei Diagnose	12
3.1.3	Tumorausdehnung	13
3.1.4	Nodalstatus	14
3.1.5	Metastasenstatus	15
3.1.6	FIGO-Klassifikation	15
3.1.7	Grading	16
3.1.8	Hormonrezeptorstatus	17
3.1.9	Progressionsstatus	20
3.1.10	Lokalrezidiv	21
3.1.11	Überleben	21
3.2	Detektion möglicher Markergene in der Metastasierung	24
3.2.1	RNA Isolierung	24
3.2.2	Real-Time PCR	25
3.3	Fazit	30
4.	Diskussion.....	31
4.1	Charakterisierung von neoangiogenetischen und hormonellen Faktoren in Endometriumkarzinomen	31
4.1.1	Individuelle Risikogruppierungen und molekulare targets	36
4.2	Circulating Tumor Cells – Markergene der Metastasierung.....	37
4.2.1	Klinische Implikationen zur Detektion von CTCs im Endometriumkarzinom.....	39
5.	Zusammenfassung	40
6.	Anhang	42
6.1	Abkürzungsverzeichnis	42
6.2	Bezugsquellenverzeichnis	43
6.3	Quellenverzeichnis	46
6.1	Abbildungsverzeichnis	56

6.2	Tabellenverzeichnis	56
6.3	Graphenverzeichnis.....	58
7.	Eidesstaatliche Versicherung	59
8.	Curriculum vitae.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9.	Danksagung	60

1. Einführung

1.1 Bedeutung des Endometriumkarzinoms

1.1.1 Epidemiologie

Das Endometriumkarzinom stellt in Deutschland das zweithäufigste geschlechtsspezifische Malignom der Frau dar. Im Jahr 2014 wurden bundesweit 10.860 Neuerkrankungen verzeichnet [1]. In Deutschland macht es 4,8% aller Tumorerkrankungen aus. Die vergleichsweise gute Prognose der Erkrankung spiegelt sich in der relativ geringen Anzahl der Sterbefälle wider. Mit etwa 2.600 Todesfällen ist es nur für etwa 2,5% aller durch Malignome verursachten Todesfälle verantwortlich und liegt damit statistisch auf Platz 9. Das relative 5-Jahres-Überleben wird in Deutschland mit 79% angegeben. Das Lebenszeitrisiko ein Endometriumkarzinom zu entwickeln liegt in Deutschland bei 2,1%. Mit dem höheren Lebensalter steigt das Risiko zu erkranken. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren. Für Deutschland lässt sich eine Abnahme der Inzidenz für 2018 prognostizieren [1].

Epidemiologisch zeigen sich regionale Unterschiede für das Endometriumkarzinom: Weltweit nimmt das Corpuskarzinom mit einer Inzidenz von 142.000 Neuerkrankungen im Jahr den 7. Platz unter den Malignomerkrankungen ein. Jährlich versterben 42.000 Frauen an dieser Tumorentität [2]. In den Industrienationen stellt das Endometriumkarzinom die häufigste Krebserkrankung des weiblichen Genitaltrakts dar und hat damit, anders als in den Entwicklungsländern, das Zervixkarzinom abgelöst [3]. In Deutschland gibt es kaum regionale Unterschiede in Neuerkrankungs- und Sterberaten. Allerdings zeigen sich im internationalen Vergleich deutliche Unterschiede: 2012 zeigte sich die höchste Inzidenz in Kanada, gefolgt von Nord- und Westeuropa. Dass sich gerade in den entwickelten Ländern höhere Zahlen der Neuerkrankungen zeigen, könnte an der höheren Prävalenz des metabolischen Syndroms und Übergewicht liegen [4-7]. Auch die stetig steigende Lebenserwartung ist in diesem Zusammenhang ein weiterer wichtiger Aspekt, da die Inzidenz der Erkrankung kontinuierlich mit der Lebenserwartung zunimmt [8]. So wird auch global betrachtet für das Endometriumkarzinom eine Zunahme der Inzidenz erwartet. In den USA wird neusten Hochrechnungen zufolge für das Jahr 2030 eine Zunahme der standardisierten Erkrankungsrate auf 42,13 pro 100 000 Personen prognostiziert [9].

	2013	2014	Prognose für 2018
Neuerkrankungen	10.740	10.680	10 600
Rohe Erkrankungsrate [n / 100 000 Personen]	26,1	25,9	25,5
Standardisierte Erkrankungsrate [n / 100 000 Personen, altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung]	16,1	15,9	15,3
Mittleres Erkrankungsalter [Median]	69	69	
Sterbefälle [n]	2.579	2.472	
Rohe Sterberate (je 100 000 Personen)	6,3	6,0	
Standardisierte Sterberate [n / 100 000 Personen, altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung]	3,1	2,9	
5-Jahres-Prävalenz [n]	44.000	45 600	
Absolute 5-Jahres- Überlebensrate (2013- 2014) [%]	70 (68- 72)		
Relative 5-Jahres- Überlebensrate (2013- 2014) [%]	79 (77- 81)		

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C54-C55 nach GEKID „Krebs in Deutschland“ [1]

1.1.2 Histologie, Pathogenese und molekulare Klassifikation

In den vergangenen Jahrzehnten hat sich eine grobe pathogenetische Einteilung des Endometriumkarzinoms in zwei wesentliche Subtypen je nach Hormonrezeptorexpression, Differenzierung und histologische Charakteristika etabliert [10]. Der hormonelle Einfluss spielt in der Entstehung der Typ I Endometriumkarzinome eine entscheidende Rolle, so erhöht die langfristige Stimulation des Endometriums durch Östrogen ohne Gestageneinwirkung bei nicht hysterektomierten Frauen das Risiko der Karzinogenese deutlich [11]. Etwa 60-70% der Endometriumkarzinome werden dem Typ I zugerechnet [10]. Dieser Subtyp wird als gut differenziertes, diploides, endometrioides Karzinom mit positivem Hormonrezeptorstatus und guter Prognose charakterisiert. Die Typ II-Tumoren dagegen stehen nicht unter hormoneller Regulation. Sie zeichnen sich durch ein nicht-endometrioides Wachstum und eine schlechtere Prognose aus. Entsprechend sind sie schlecht differenziert, aneuploid, tragen sehr häufig die p53-Mutation, haben einen negativen Hormonrezeptorstatus und eine höhere Tendenz zur Ausbildung von Metastasen [12].

	Typ I	Typ II
Histologie	Endometrioid	Nicht endometrioid (z.B. serös, klarzellig, karzinosarkomatös, undifferenziert)
Grading	G1, G2	G3
Hormonrezeptor-expression	Positiv	Negativ
Myometrane Tumorinvasion	Oberflächlich	Tief
Lymphogene Metastasierung	Selten	Häufig
Menopausenstatus	Postmenopausal	Prä-/Perimenopausal
Assoziiertes klinisches Erscheinungsbild	Metabolisches Syndrom, Übergewicht, Hyperlipidämie, Hyperglykämie, Hyperöstrogenismus	Kein spezifisches Erscheinungsbild beschrieben
Genetische Alterationen	KRAS, PIK3CA pathway, FGFR2	p53, Her2neu
Genomstabilität	Diploid	Aneuploid
Präkanzerose	Atypische Hyperplasie	SEIC
Prognose	Günstig (5-Jahres-Überleben: 85%)	Schlecht (5-Jahres-Überleben 55%)

Tabelle 2: Gegenüberstellung der dualistischen Einteilung nach Bokhman (1983) modifiziert

Die histologische Aufarbeitung ist essentiell für die Diagnosesicherung [8]. Typ I Karzinome werden histologisch als „endometrioid“ beschrieben. Diese Begrifflichkeit steht für ein Tumorwachstum in Drüsenstrukturen, ähnlich dem gesunden Endometrium während der Proliferation [13] ohne stromales Gewebe zwischen den Drüsenformationen. Ein endometrioides Karzinom liegt nach WHO-Definition vor, wenn weniger als 10% der entarteten Zellen andersartig, wie beispielsweise serös, klarzellig, muzinös oder plattenepithelial differenziert sind. Handelt es sich dabei um mehr als 10% spricht man von Mischkarzinomen [8, 13, 14]. Innerhalb der endometrioiden Tumoren unterscheidet man als häufigste Formen das sekretorische Karzinom, welches das sekretorische Endometrium mit zahlreichen Glykogenvakuolen nachahmt, von dem villoglandulären Karzinom, welches ein papilläres Wachstum mit blanden Nuclei zeigt [13]. Außerdem wird häufig ein plattenepitheliales Wachstumsmuster beobachtet. Ein höherer Anteil an zu Plattenepithel entdifferenzierten Gewebe spricht für eine höhere Aggressivität des Malignoms. Bei Typ II Endometriumkarzinomen handelt es sich in der Regel um hochgradig dedifferenzierte Läsionen. Darunter findet sich eine große Bandbreite an unterschiedlichen histologischen

Subklassifikationen, wie das seröse und das klarzellige Karzinom [15]. Mit etwa 5% aller Endometriumkarzinome ist das seröse Karzinom eine sehr seltene (etwa 5% aller Endometriumkarzinome), aber dennoch die aggressivste Form. Histopathologisch wegweisend sind papilläre Strukturen und pleomorphe Tumorzellen mit hoher mitotischer Aktivität, Nekrosen und myometrialer bzw. vasaler Infiltrationstendenz. [14, 16]. Unter den endometrioiden Typ I Tumoren finden sich aber auch in 10-20% der Fälle höhergradige Tumoren. Bei unklarer Zuordnung eines Präparats zu einem Subtyp kann es sinnvoll sein, eine immunhistochemische Anfärbung bekannter alterierter Antigene (vgl. Tabelle 2) anzufertigen. Das gilt zum Beispiel zur Unterscheidung zwischen endometrioiden und serösen Endometriumkarzinomen, die sich in Therapie und Prognose deutlich unterscheiden [12].

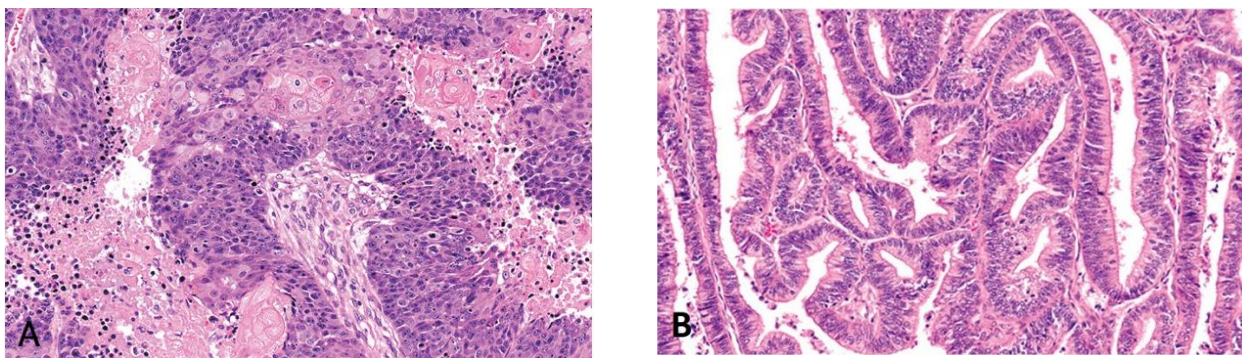


Abbildung 1 A: G3 Endometriumkarzinom mit soliden trabekulären Strukturen, nukleären Atypien und nekrotischen Anteilen; B: Gut differenziertes endometrioides Karzinom mit weniger als 5% solidem Tumoranteil [17]

Die atypische Endometriumhyperplasie ist die Vorläuferläsion des endometrioiden Adenokarzinoms. Histologisch wird sie durch nicht-invasive Proliferationen des Endometriums und eine zahlenmäßige Zunahme unregelmäßig geformter Drüsen beschrieben [17]. Nach der WHO-Klassifikation von 2014 erfolgt keine Unterscheidung in einfach und komplexe atypische Endometriumhyperplasien mehr [18].

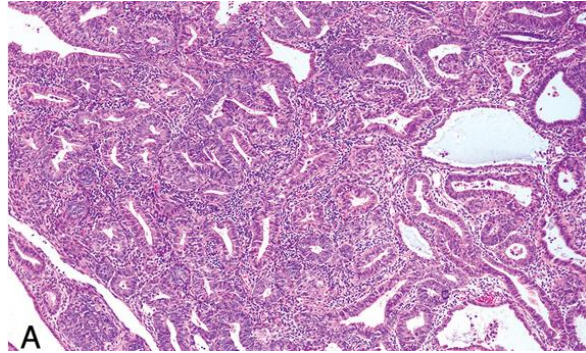


Abbildung 2: A: Atypische endometrioide Hyperplasie- gestörte Architektur mit glandulären Neuformationen, welche die stromalen Grenzen überschreiten [19]

Interessanterweise finden sich in diesen Vorstufen bereits Mutationen in PTEN, die häufig gemeinsam mit weiteren Mutationen des Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase-Signawegs (PI3K/AKT) auftreten [19]. Der PI3K-Signalweg ist beteiligt an der Steuerung von Zellstoffwechsel und -proliferation. Das Enzym PI3K katalysiert die Phosphorylierung der Membranlipide PIP_2 zu PIP_3 . PIP_3 kann anschließend das Protoonkogen Akt durch Bindung aktivieren. Da es sich dabei um eine Serin/Threonin-Kinase handelt, werden durch die aktivierte Akt konsekutiv weitere Kaskaden in der Zelle angestoßen, wie die Proliferation und Proteintranslation oder die Apoptosehemmung. Das Tumorsupressorgen PTEN ist der direkte Gegenspieler der Akt, indem es PIP_3 zu PIP_2 dephosphoryliert verhindert es die Wirkung von Akt [20]. Es konnte gezeigt werden, dass der PI3K/Akt-Signalweg durch VEGF aktiviert wird und so das Überleben der endothelialen Zellen reguliert [21]. Bei mehr als 90% der Patientinnen mit Typ-I-Karzinomen finden sich Mutationen innerhalb dieses Signalwegs [19, 22]. Andere häufig mutierte Gene in Typ I Tumoren betreffen das Onkogen KRAS (in 20% der Tumore), FGFR2 (in 12% der Tumore), ARID1A, ARID5B, CTNNB1, PIK3CA und PIK3R1. Bei etwa 40% der endometrioiden Endometriumkarzinomen findet sich eine Mikrosatelliteninstabilität, das heißt es kommt durch fehlerhafte Reparaturmechanismen zu einer Längenveränderung kurzer repetitiver Sequenzen der DNA. Sie treten weitaus seltener bei Typ II-Läsionen auf [23].

Das seröse endometriale intraepitheliale Karzinom (SEIC) als non-invasive Vorläuferläsion des Typ II Endometriumkarzinoms. Es entspricht biologisch aber einem Oberflächenkarzinom, weil es in 50% der Fälle mit invasiven Tumoren außerhalb der Gebärmutter oder auch mit einer peritonealen Metastasierung einhergehen kann [2, 24]. Das Oberflächen- und Drüsenepithel weicht hochgradig atypischen Zellen. Molekulargenetisch konnte im SEIC ein ähnliches Muster an Mutationen gezeigt werden wie im serösen Endometriumkarzinom, das dem Typ II zugeordnet wird. Häufige Mutationen finden sich im Tumorsupressorgen p53 und in PPP2R1. In serösen Karzinomen finden sich besonders hohe Mutationsraten von p53, was zu einer ungünstigen Prognose führt. PTEN ist in Typ II Karzinomen deutlich seltener mutiert.

[23]. Der Heterogenität der Mutationsmuster in Endometriumkarzinomen kann nur schwer mit dem dualistischen Modell nach Bokhman entgegnet werden. Das Next-Generation-Sequencing hat in den letzten Jahren neue Möglichkeiten aufgeworfen Pools an genetischen Mutationen einer Tumorentität zu untersuchen und anhand einer molekularen Analyse zuverlässigere prognostische Aussagen zu treffen. Nach Analysen des Cancer Genome Atlas von 2013 [22] wurde daher vorgeschlagen das bisher duale System zu überarbeiten und stattdessen vier molekulare Subgruppen zu bilden: Bei den ersten drei Gruppen handelt es sich histologisch um endometrioides Karzinome, die weniger Mutationen in p53 und dafür mehr Mutationen in KRAS und dem PI3K-Signalweg tragen. Die erste Gruppe (POLE ultramutated) trägt Mutationen in dem Gen für POLE, das für einen Teil einer DNA-Polymerase kodiert. Sie hat die höchste Mutationsfrequenz und eine exzellente Prognose. Die zweite Gruppe weist eine Mikrosatelliteninstabilität und viele Mutationen bei intermediärer Prognose auf. Dagegen umfasst Gruppe 3 die Eigenschaften genetische Mikrosatellitenstabilität und geringe CNVs bei ebenfalls intermediärer Prognose. In der vierten Gruppe finden sich alle serösen Tumoren und endometrioides Karzinome mit schlechter Differenzierung (10%), schlechter Prognose, geringer Mutationsfrequenz, aber hoher Anzahl an CNVs und p53 Mutationen in über 90% der Fälle [22]. Vor mehreren Jahrzehnten wurde bereits von einer Koinzidenz von Endometrium- und Ovarialkarzinomen berichtet [25, 26]. Tatsächlich konnten Kanoth et al. 2013 weitreichende molekulare Ähnlichkeiten zwischen dem serösen Endometriumkarzinom und Ovarialkarzinomen und hochgradigen triple-negativen duktalen Brustkrebsformen zeigen [22]. Ein weiteres mit Endometriumkarzinomen assoziiertes Syndrom stellt das autosomal dominant vererbte HNPCC-Syndrom dar. Multiple Mikrosatelliteninstabilität verursacht hier neben rechtsseitigem Kolonkrebs auch Endometriumkarzinome [17].

1.1.3 Diagnostik

Die überwiegende Zahl der Endometriumkarzinome (>75%) wird in Stadium T1 durch postmenopausale Blutungen symptomatisch apparent: Das Kardinalsymptom ist die pathologische vaginale Blutung. Sie tritt im Falle des entarteten Endometriums als postmenopausale Blutung auf oder bei Frauen vor der Menopause in Form von Metrorrhagien. Postmenopausale Blutungen sind in etwa 10% der Fälle durch ein Endometriumkarzinom verursacht und sollten daher immer diagnostisch abgeklärt werden [17]. Dafür soll zunächst eine gynäkologische Untersuchung erfolgen, um den Uterus als Ursprung der Blutung zu verifizieren und eine mögliche Ausdehnung des Karzinoms über den Uterus hinaus auszuschließen. Daran wird eine vaginale Sonographie angeschlossen, mit der andere pathologische Prozesse (z.B. in Ovar und Tuben) untersucht und das Endometrium beurteilt werden kann. Ein schmales Kavum und eine Dicke des Endometriums von <3mm schließen eine maligne Veränderung weitestgehend aus [27]. Bei einer Dicke > 5mm wird die weiterführende Diagnostik mit Hysteroskopie und fraktionierter Abrasio empfohlen [2]. Die diagnostische Aussagekraft der Endometriumdicke > 5mm ist aber insbesondere bei

postmenopausalen Frauen unter Hormonersatztherapie und bei prämenopausalen Frauen deutlich in Frage zu stellen. [17]. Die Diagnosestellung erfolgt histologisch aus den im Rahmen der Hysteroskopie gewonnenen Proben. Bestätigt sich der Malignomverdacht, schließen sich Staging des Tumors und anschließend Therapie an.

1.1.3.1 Grading/ Staging/ TNM

In Deutschland hat sich die klinische Staging-Klassifikation der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) von 1988 in der überarbeiteten Version aus dem Jahr 2017 etabliert. Sie entspricht in großen Teilen der TNM-Klassifikation und richtet sich vorrangig nach operativen Kriterien, dem Ausmaß der pathologisch erhobenen myometrialen Durchdringung sowie der lokalen Ausbreitung (T), möglicher Lymphknoteninfiltration (N) und Fernmetastasierung (M). Die Stadieneinteilung erfolgt intraoperativ im Rahmen einer abdominalen Exploration, Hysterektomie, bilateraler Ovarexstirpation sowie pelviner und paraaortaler Lymphonodektomie [2, 28]. Diese Strategie wurde beibehalten, da Bildgebung und klinische Parameter als präoperative Staging-Parameter alleine in 20% der Fälle nicht suffizient sind. Zusätzlich wird prätherapeutisch für die Metastasensuche ein Thoraxröntgenbild und die abdominelle Sonographie [2] mit Untersuchung auf einen möglichen Harnstau, sowie optional die Durchführung einer Zytoskopie und Rektoskopie vorgenommen, um ein FIGO Stadium IVA auszuschließen [2].

Im Rahmen der histologischen Diagnosesicherung wird zur Abschätzung der Pathogenität ein histologisches Grading am Präparat vorgenommen. Dazu wird der prozentuale Anteil gut differenzierter glandulärer und unreifer solider Tumoranteile am Gesamttumor abgeschätzt und schließlich eine zytologische Beurteilung von Kernatypien vorgenommen [29]. Seröse und klarzellige Tumoren sind definitionsgemäß als schlecht differenziert (G3) einzustufen. Bei endometrioiden und muzinösen Tumoren gelten diejenigen Tumoren als gut differenziert (G1), welche einen Anteil von <5% solider, nicht plattenepithelialer Areale aufweisen. Bei einem Anteil zwischen 5 und 50% solider, nicht plattenepithelialer Areale handelt es sich um eine mäßiggradige Differenzierung (G2), bei über 50% solider und nicht-plattenepithelialer Anteile um ein schlecht differenziertes Malignom (G3) [2]. Das histologische Grading ist vorrangig von Bedeutung für die Beurteilung der Aggressivität endometrioider Adenokarzinome. Seröse und klarzellige Tumoren dagegen gelten per definitionem als hochgradige Läsionen [24, 30]. Die FIGO-Klassifikation berücksichtigt das Grading nicht in ihrer Stadieneinteilung, stattdessen geht es als zusätzlicher prognostischer Faktor in die Therapieentscheidung ein [2].

	FIGO	TNM-Klassifikation
Primärtumor kann nicht beurteilt werden		TX
Kein Anhalt für Primärtumor		T0
Carcinoma in situ		Tis
Tumor begrenzt auf Corpus uteri	I	T1
Tumor begrenzt auf Endometrium oder weniger als die Hälfte des Myometriums infiltrierend	IA	T1a
Tumor infiltriert mehr als die Hälfte des Myometriums	IB	T1b
Tumor infiltriert Zervix, bleibt aber auf den Uterus begrenzt	II	T2
Lokale/regionale Ausbreitung wie nachfolgend beschrieben	III	T3 und/oder N1
Tumor befällt Serosa und/oder Adnexe (direkte Ausbreitung oder Metastasen)	IIIA	T3a
Vaginal- oder Parametriumbefall (direkt oder Metastasen)	IIIB	T3b
Metastasen in pelvinen und/oder paraaortalen Lymphknoten	IIIC	N1
Metastasen in Beckenlymphknoten	IIIC1	
Metastasen in paraaortalen Lymphknoten	IIIC2	
Tumor infiltriert Blasen- und/oder Rektumschleimhaut	IVA	T4
Fernmetastasen	IV B	M1

Tabelle 3: TNM und FIGO Classification of Malignant Tumors der UICC 2017 [31]

1.1.4 Therapie

1.1.4.1 Operative Therapie

Das chirurgische Staging ermöglicht einerseits die stadiengerechte Therapie im Anschluss und ist gleichzeitig die erste therapeutische Maßnahme für die meisten Patientinnen. Es beinhaltet die Hysterektomie, beidseitige Adnexexstirpation, Zytologien aus dem Peritoneum und die paraaortale und pelvine Lymphonodektomie. Im Falle der zervikalen ggf. parametranen Tumordinfiltration (T2) wird die erweitert radikale Hysterektomie nach Wertheim-Meiges empfohlen. Auch Patientinnen mit weit fortgeschrittenen Tumoren profitieren von einer operativen Entfernung der Gebärmutter, da sie im Sinne eines Tumordebulkings einer Kompression des umliegenden Gewebes reduziert und Blutungen des entarteten Gewebes vorbeugt [2]. Im histopathologisch bestätigten Stadium pT1a des endometrioiden Karzinoms bei gut bis mäßig differenzierten Zellen (\leq G2) kann auf die Lymphonodektomie verzichtet werden, da in diesem Stadium eine Lymphknoteninfiltration extrem selten ist [32]. In allen anderen Fällen wird unabhängig von der Tumorhistologie die systematische Lymphonodektomie von mindestens 15 pelvinen und 10 paraaortalen Lymphknoten durchgeführt. Für den Fall, dass die präoperativ im Rahmen der Hysteroskopie gewonnenen Proben ein seröses oder klarzelliges Karzinom ergeben haben oder sich intraoperativ ein

Stadium cT3a darstellt, wird die Operation um eine Omentektomie und multiple Biopsien aus dem Peritonealraum erweitert. [2, 8]. Das laparoskopische Vorgehen konnte verglichen mit der Laparotomie als gleichwertig eingestuft werden. Es birgt den Vorteil als minimalinvasive Variante die operationsassoziierte Morbidität zu verringern [33, 34].

Wenn Komorbidität einer operativen Strategie im Wege steht, kann alternativ eine primäre Strahlentherapie, meistens in Form einer Tele-Brachytherapie, erwogen werden [8].

1.1.4.2 Strahlen-, Chemo- und Hormontherapie

In etwa 55% der Endometriumkarzinomen handelt es sich um Tumoren der Stadien pT1b G1-G2 oder pT2a-b G1 mit niedrigem Rezidivrisiko [12]. Für sie ist ein ausschließlich chirurgisches Therapiekonzept wie oben dargestellt ausreichend. In den übrigen Fällen stehen zusätzliche adjuvante Therapieoptionen in Form von Strahlentherapie, Chemotherapie und endokrinologischer Therapie zur Verfügung.

Eine systemische Chemotherapie kann bei Patientinnen mit Typ II Endometriumkarzinom oder Patientinnen mit einem Typ I Endometriumkarzinom G3 in den Stadien T1b oder T2 ohne nodalen Befall adjuvant durchgeführt werden. Eine starke Empfehlung zur adjuvanten Chemotherapie findet sich in der Leitlinie ab der Tumorausdehnung T3 bzw. sobald lymphonadeler Befall oder Fernmetastasierung besteht. Therapeutisch können hierzu die Präparate Carboplatin und Paclitaxel kombiniert werden [2].

Über Einsatz und Bedeutung der adjuvanten Strahlentherapie wurde in den letzten Jahren viel diskutiert. Sie kann vor allem in den frühen Stadien pT1 und pT2 postoperativ das Risiko von lokoregionären Rezidiven deutlich verringern, allerdings hat ihr Einsatz keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben gezeigt [30, 35]. Daher ist sie leitliniengerecht nur bei Patientinnen mit hohem Lokalrezidivrisiko indiziert, wie dem pT1a Stadium und schlechter Differenzierung (G3) oder ab G2 im Stadium pT2 [2, 8]. Die vaginale Brachytherapie und die extern applizierte Teletherapie werden häufig kombiniert. Die prospektiv-randomisierte PORTEC-2-Studie [36] konnte zeigen, dass die Erfolge hinsichtlich lokaler Rezidivraten, der Bildung von Fernmetastasen und des Gesamtüberlebens bei vaginaler Brachytherapie und externer Teletherapie vergleichbar sind, aber die externe Bestrahlung deutlich mehr Nebenwirkungen generiert. Daher wurde vorgeschlagen, der vaginalen Brachytherapie als adjuvante Therapie bei Patientinnen mit intermediären bis hohem Risiko den Vorrang zu geben [36-38].

Adjuvante Hochdosis- Gestagentherapien wurden wegen des relativ geringen Nebenwirkungsprofils intensiv beforscht und konnten bisher keinen therapeutischen Effekt zeigen [2]. Allerdings sind sie bei progesteronrezeptorpositiven Karzinomen palliativ im Fall von chirurgisch nicht mehr resezierbaren Rezidiven oder Metastasen indiziert und können den

Krankheitsprogress günstig beeinflussen [39]. Die Gestagentherapie kann außerdem noch bei prämenopausalen Frauen mit bestehendem Kinderwunsch und Vorstufenläsionen des Endometriumkarzinoms erwogen werden [2, 17, 40].

1.1.5 Risikofaktoren/ Komorbiditäten, Prävention/Screening

Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung des Typ I Endometriumkarzinoms gilt die längerfristige Exposition des Gewebes gegenüber endogenen und exogenen Östrogenen ohne Progesteronschutz. Die alleinige Östrogengabe zur Milderung perimenopausaler Beschwerden erhöht das Risiko der Karzinomentwicklung um das Zwei- bis Zwanzigfache in Abhängigkeit von der Einnahmedauer [41, 42]. Außerdem beeinflussen hohe Spiegel körpereigener Östrogene die endometriale Karzinogenese, wie sie bei Infertilität, Nulliparität, früher Menarche, später Menopause, Polyzystischem Ovarialsyndrom (PCO) und selten bei östrogenproduzierenden Neoplasien vorkommen [2, 24, 28]. Im gesunden Endometrium bewirken hohe Östrogenspiegel in der Proliferationsphase des Menstruationszyklus das Wachstum der Functionalis. Nach erfolgter Ovulation steigt der Progesteronspiegel und bewirkt die Differenzierung des Endometriums. 14 Tage später kommt es durch erneuten Progesteronabfall zum Abbluten der aufgebauten Schleimhaut [43]. Ein pathologischer Östrogeneinfluss führt zur Erhöhung der mitotischen Aktivität endometrialer Zellen und steigert damit das Risiko für DNA-Replikationsfehler und somatische Mutationen. Gleichzeitig wird die Apoptose-Aktivität gehemmt und die Angiogenese stimuliert [44, 45]. Ein weiterer Risikofaktor für die Karzinogenese stellt das PCO-Syndrom dar, welches über gesteigerte Androgenüberproduktion eine reaktiv überhöhte Östrogensynthese bewirkt. Die eigentliche Ursache des PCO-Syndroms wird in einem gestörten Insulinstoffwechsel vermutet. Dieser kann wiederum selbst Risikofaktor für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms sein: Bei fast 50% der Endometriumkarzinom - Patientinnen finden sich exzessiver Fettkonsum und Übergewicht ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) [7]. Das führt bei prämenopausalen Frauen zu peripherer Insulinresistenz, ovariellen Androgenexzessen und einer chronischen Progesterondefizienz. Bei postmenopausalen Frauen bewirken diese metabolischen Faktoren eine extraglanduläre Konversion der Androgene zu hohen Konzentrationen an bioverfügbaren Östrogenen [24]. Metabolisches Syndrom und die assoziierte Klinik sind folglich speziell in den entwickelten Nationen relevante Faktoren der endometrialen Malignomformation. Ein BMI über 25 kg/m^2 verdoppelt das Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken [46]. Da das Endometriumkarzinom vor allem postmenopausale Frauen betrifft, erhöht das erreichte Alter von ≥ 55 Jahre das Risiko für die Entwicklung eines Endometriumkarzinoms [2, 10]. Weiterhin erkranken Frauen mit einer positiven Brustkrebsanamnese häufiger an einem Karzinom des corpus uteri. Dafür verantwortlich sind einerseits ähnliche Risikofaktoren für beide Tumorentitäten und andererseits die Behandlung von Brustkrebs mit Tamoxifen. Tamoxifen ist ein selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator, der antagonistisch an der Mamma, aber agonistisch am Endometrium wirkt [47]. Tamoxifeneinnahme erhöht das Risiko an einem

Endometriumkarzinom zu erkranken um das Dreifache [24]. Ein familiär hereditäres Auftreten von Endometriumkarzinomen ist selten, kann allerdings etwa im Rahmen des HNPCC-Syndroms auftreten [17, 29].

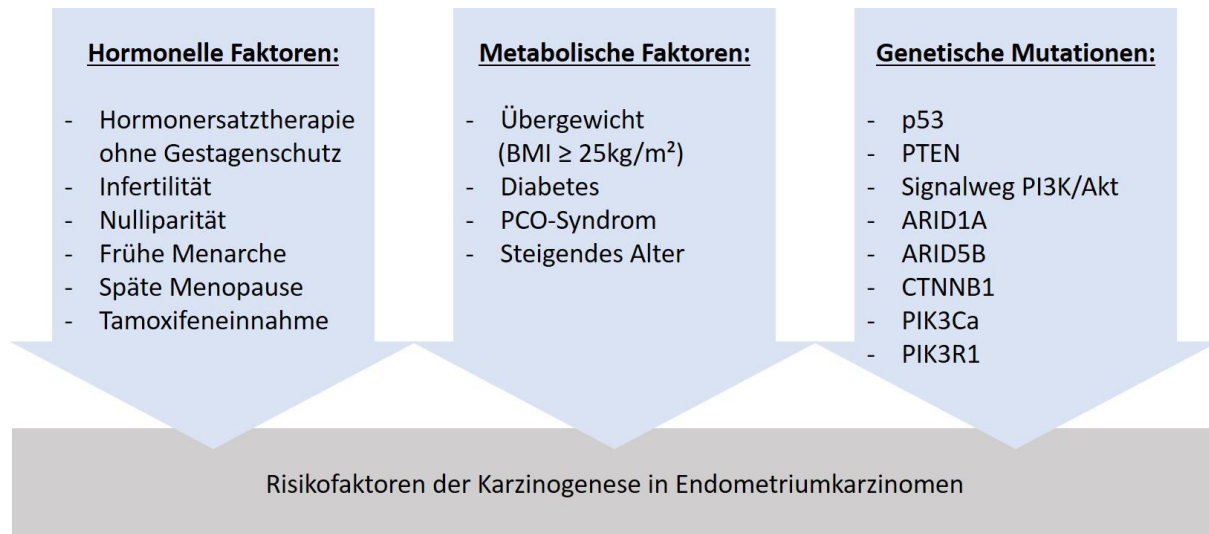


Abbildung 3: Schematische Darstellung häufiger Risikofaktoren im endometrioiden Karzinom

Reduziert wird das Erkrankungsrisiko durch die Einnahme kombinierter oraler Kontrazeptiva, Nutzung von Depot Medroxyprogesteron-Acetat und Intrauterinepessaren mit Progesteron-Freisetzung. Offenbar hat das Rauchen einen ähnlichen risikoreduzierenden Einfluss. Positive Effekte auf die Prävention haben lebenslange Gewichtskontrolle und sportliche Aktivität [24, 41]. Bisher gibt es keine Hinweise, welche ein generelles Screening auf Endometriumkarzinome in der Allgemeinbevölkerung unterstützen würden [8].

1.1.5.1 Prognostische Faktoren/ Überleben

Das geschätzte kumulative Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken liegt in Europa bei 0,96%, während das korrespondierende Risiko daran zu versterben 0,23% beträgt [48]. Das Stadium der Erkrankung hat dabei erhebliche prognostische Bedeutung: Während das 5-Jahres-Überleben für die FIGO Stadien I und II zwischen 74 und 91% liegt, kann für das Stadium III noch ein 5-Jahres-Überleben von 57-66% und für das Stadium IV nur noch von 20-26% verzeichnet werden [12]. Etwa 25% der Patientinnen in allen Stadien erleiden im Laufe ihrer Erkrankung Lokalrezidiven bzw. Fernmetastasen. Davon betreffen 17% Lokalrezidive der Vagina, 32% das Becken und 51% stellen sich als Fernmetastasen dar [2]. Die lymphogene Metastasierung erfolgt vornehmlich entlang der paraaortalen und pelvinen Lymphknoten, während die hämatogene Metastasierung sich am häufigsten in Knochen und Lunge manifestiert [17]. Ohne Metastasierung wird für 90% der Patientinnen ein progressionsfreies Überleben für die weiteren 5 Jahre erwartet, jedoch verringert das Vorliegen von pelvinen Lymphknotenmetastasen diesen Wert auf 60-70%, für festgestellte paraaortale

Lymphknoteninfiltrationen liegt der Schätzwert nur noch bei 30-40% [12]. Die meisten Patientinnen mit Endometriumkarzinomen haben bereits ein fortgeschrittenes Alter erreicht und leiden an erheblichen Komorbiditäten, an denen viele versterben. Prognostische Faktoren für das Überleben sind neben dem Stadium der Erkrankung und der myometranen Tumorinvasion das Tumorgrading, Lymph- und Gefäßinfiltrationen, Alter der Patientin, Komorbiditäten und postoperative Komplikationen [35, 49-51].

FIGO-Klassifikation	IA	IB	II	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVB
5-Jahresüberleben [%]	91.1	85.4	74.2	66.2	49.9	57.3	25.5	20.1

Tabelle 4: 5-Jahres-Überleben bei Erkrankung an einem Endometriumkarzinom in Abhängigkeit des FIGO-Stadiums nach Creasman et al. (2006) [52]

Etwa 5-25% der Hochrisiko-Endometriumkarzinome sind assoziiert mit Keimbahnmutationen und sind häufig durch einen sehr frühen Krankheitsausbruch vor dem 40. Lebensjahr charakterisiert. Daher sollte eine genetische Testung und Beratung für Patientinnen mit Manifestation vor dem 50. Lebensjahr in Erwägung gezogen werden. Das gilt auch für Patientinnen, die unter dem HNPCC/Lynch-Syndrom leiden, das seinerseits mit der Entwicklung von Endometriumkarzinomen assoziiert ist [52] (siehe dazu auch 1.1.2).

1.2 Ansatz der Arbeit

1.2.1 Charakterisierung von neoangiogenetischen und hormonellen Faktoren in Endometriumkarzinomen

Die aktuell gebräuchliche TNM- und FIGO- Klassifikation, sowie das Grading-System für Endometriumkarzinome sind bisher in ihrer prognostischen Aussagekraft, z.B. auch im Hinblick auf das Metastasierungspotential, eingeschränkt [53, 54]. Entstehung und Wachstum von Karzinomen unterliegt regulierenden Faktoren. In der Kenntnis der pathogenetischen Signalmechanismen liegt das Fundament für Risikoabschätzung, prognostische Beurteilung eines Malignoms und seine effiziente Therapie. Die Expression von Hormonrezeptoren im Endometriumkarzinom hat sich als prognostischer Marker etabliert [10, 55]. Eine alleinige Unterteilung in östrogenabhängige und -unabhängige Typen kann der Heterogenität der Tumoren allerdings nicht ausreichend Rechnung tragen. Es hat sich gezeigt, dass Progesteron und die Expression seines Rezeptors positiv prognostisch sind [56]. Interessant ist daher die Frage, ob auch andere Moleküle der Signalkaskade als Marker für eine Risikoeinschätzung verwendet werden können. Zur Annäherung an diese Fragestellung wird die Expression des Rezeptors LHCGR für die Hormone LH und hCG in der vorliegenden Arbeit untersucht. Vorangegangene Forschungsarbeiten deuteten bereits Implikationen von LHCGR auf das Tumorwachstum an: Der Rezeptor war im malignen Gewebe des Endometriums stärker exprimiert als im gesunden Endometrium [57, 58], konnte sogar in einen Kausalzusammenhang mit der Zellproliferation gebracht werden [59] und korrelierte mit dem Grading des Tumors [60]. Der Bindungspartner von LHCGR humanes Choriogonadotropin (hCG) scheint darüber hinaus proangiogene Funktionen inne zu haben [61] und könnte daher insbesondere im späten Endometriumkarzinom die Tumorprogression beeinflussen. Ein anderer proangiogener Faktor mit möglicher Relevanz in der Entstehung von Endometriumkarzinomen ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Seine Bindung an den VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) vermittelt die Neovaskularisierung in physiologischen und pathologischen Prozessen [21]. Forciertes Tumorwachstum und Metastasenformation setzen eine stärkere Gewebepерfusion im Bereich der Neoplasie voraus, um den erhöhten Bedarf an notwendigen Metaboliten zu decken [62]. Im Fall einer VEGFR2-vermittelten Gefäßneubildung könnte die Überexpression des Rezeptors Rückschlüsse auf eine vermehrte Aggressivität des Tumorwachstums und Einfluss auf die Risikoabschätzung der Tumorerkrankung haben.

Die Expression der beiden Moleküle soll dann auch mit den Steroidhormonrezeptoren ER α , ER β , PR-A und PR-B des Tumors und mit dem Vorkommen von Glycodelin A verglichen werden, um Rückschlüsse auf das Zusammenspiel dieser Faktoren ziehen zu können. Aus der Korrelation zwischen Rezeptorexpression und den klinischen Daten der Patientinnen kann ein möglicher Zusammenhang dieser Faktoren mit speziellen Charakteristika, wie der Aggressivität des Karzinoms detektiert werden. Entsprechend können in einem zweiten Schritt

Risiko- und Subgruppen erstellt werden. Die Einteilung in Risikogruppen kann dann zeigen, ob sich in Zusammenschau der erhobenen Charakteristika und klinischen Daten Gruppen von Patienten bilden lassen, die von einer endokrinen Therapie bzw. einer Blockade der Neovaskularisation profitieren könnten.

1.2.2 Circulating Tumor Cells – Markergene der Metastasierung

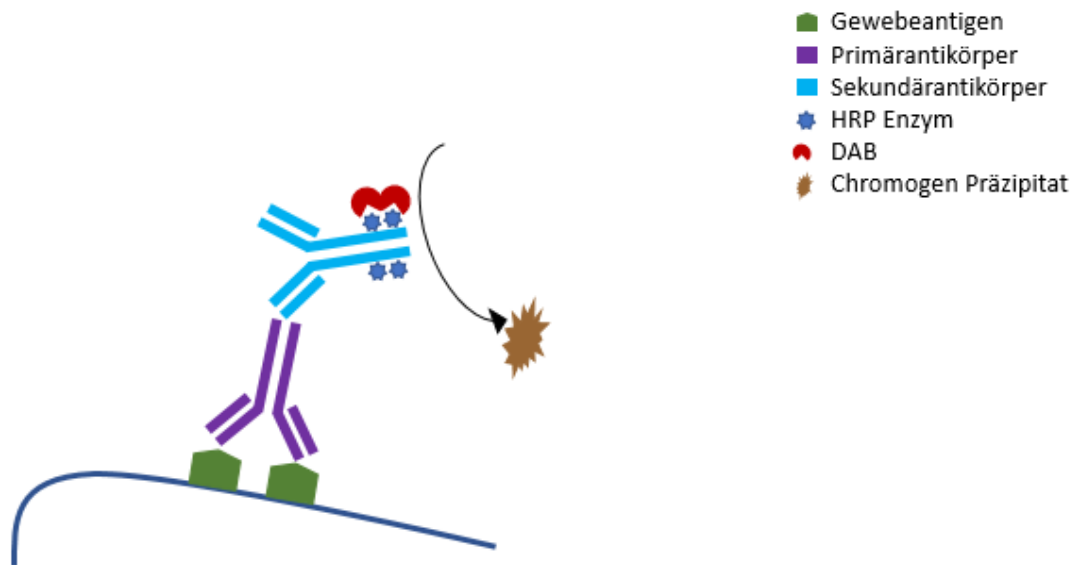
Unabhängig vom Stadium der Erkrankung treten bei etwa 25% der Patientinnen mit Endometriumkarzinom Lokalrezidive und Metastasen auf [2]. Das Staging berücksichtigt sowohl die myometrane Infiltrationstiefe, als auch Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasierung (siehe 1.2.2). Der Lymphknotenstatus hat prognostische Aussagekraft für Patientinnen mit operablen Tumoren. Trotzdem zeigen 6-7% der Patientinnen mit Lokalbefund ohne Lymphknotenbefall im Anschluss an die primär operative Versorgung Fernmetastasen. Bei Patientinnen des Stadiums FIGO I gibt es bisher keine Evidenz, dass die Entscheidung für eine Lymphadenektomie einen Einfluss auf die Lokalrezidivrate oder das Überleben hat [32]. Daher wird angenommen, dass die hämatogene Metastasierung in Endometriumkarzinomen auch unabhängig von der lymphogenen Metastasierung abläuft. Allgemein hin akzeptiert ist die Theorie, dass die Filialisierung eines Primärtumors durch Abspaltung einzelner Tumorzellen von dem soliden Primärtumor erfolgt, die über Lymph- und Blutgefäße in den Körperkreislauf gelangen. Diese zirkulierenden Tumorzellen (Circulating Tumor Cells, CTCs) können sich im Gewebe ansiedeln und ausgehend von einer singulären Zelle eine Metastase formieren [63]. Schon im Jahr 1869 konnte Thomas Ashworth zeigen, dass bei einem Patienten mit metastasierter Tumorerkrankung post mortem Tumorresiduen im Blut nachweisbar waren. Das Vorhandensein von CTCs im Blut hat sich als unabhängiger prognostischer Faktor in verschiedenen metastasierten Karzinomen erwiesen [64]. Im Mammakarzinom liefert die Kombination aus Bestimmung der CTCs klinisch-pathologischen Staging und Bestimmung der CTCs bezüglich der Metastasierung deutlich bessere prognostische Validität [65], während die gebräuchlichen Tumormarker diesbezüglich nicht genutzt werden können. Interessanterweise konnte auch in nicht-metastasierten Tumoren gezeigt werden, dass sich der Nachweis einer einzigen oder mehrerer CTCs negativ prognostisch auswirkte [66]. Die Rolle von CTCs im Endometriumkarzinom muss dagegen noch definiert werden. Der dargestellte Stand der Forschung deutet allerdings darauf hin, dass die Bestimmung von CTCs in Endometriumkarzinomen nützlich sein könnte, um eine frühe hämatogene Metastasierung zu detektieren [67] und könnte damit eine essentielle Rolle im Therapieregime spielen. Um die CTCs in Patientenblutproben zu bestimmen, bedarf es aufgrund der geringen Zellzahl einer sehr sensitiven Methode, z.B. über immunomagnetische Anreicherung und Anfärbung von spezifischen Oberflächenmarker in epithelialen Zellen (CellSearch® System, Veridex) [68]. CTCs können aber auch über eine Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Grundlage hierfür ist die Überlegung, dass Tumorzellen aufgrund ihrer epithelialen Abstammung ein anderes

genetisches Expressionsmuster aufweisen, als die umgebenden Blutzellen, die ihrerseits mesenchymalen Ursprungs sind [69]. Der Einsatz der PCR ist kosteneffizienter und in den meisten Kliniklaboratorien einfach durchführbar. Für diesen Ansatz muss jedoch zunächst ein Set an Markergenen der Tumorzellen im Endometrium etabliert werden, um zuverlässig zwischen Tumor- und Blutzellen unterscheiden zu können [70-72]. Daher wurde in dieser Arbeit eine Auswahl möglicher Markergene auf seine Expression in Endometriumkarzinomen im Vergleich zur Expression im gesunden Gewebe untersucht.

1.3 Methodischer Ansatz

1.3.1 Immunhistochemische Untersuchung von Primärtumorgewebe

Durch die Kenntnis der spezifischen Eigenschaften bei der Neovaskularisierung im Endometriumkarzinom könnten sich möglicherweise neue Marker für die Risikoeinschätzung und Therapieansätze in der frühen und späten Krankheitsphase ergeben. Dazu wurde ein Kollektiv an in Paraffin eingebetteten Tumorblöcken aus der Sammlung der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München gebildet und immunhistochemisch auf die Expression folgender Marker untersucht: Des VEGF-Rezeptors 2, an den unterschiedliche VEGF-Moleküle binden und des Luteinisierenden Hormon-Rezeptors (LHCGR), der die Hormone LH und hCG bindet. Die immunhistochemische Untersuchung ermöglicht das präzise Detektieren von Antigenen im Gewebe. Dazu werden Affinität und Spezifität immunologischer Reaktionen genutzt: Die Antigenbindungsstelle eines sogenannten primären Antikörpers bindet spezifisch an das Epitop des gesuchten Antigens. Um den dabei entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex schließlich sichtbar zu machen, wird eine Färbereaktion angeschlossen [73]. Bei der indirekten Methode der Anfärbung werden Antigen-Antikörper-Bindung und Färbereaktion in zwei Schritten abgehandelt. Zunächst bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter Antikörper, der Sekundärantikörper aufgetragen, welcher enzymatisch markiert und gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Die enzymatische Reaktion führt zur Umsetzung des Farbstoffs Diaminobenzidin (DAB) und bedingt die farbliche Markierung gesuchter Antigene.

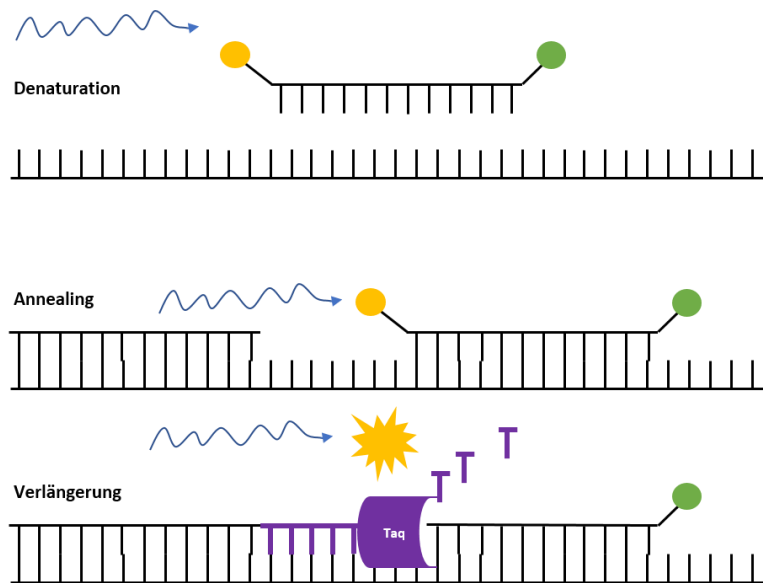


Graphik 2 : Schematische Darstellung der Substrat-Chromogenreaktion mit DAB modifiziert nach [73]

Der braune Farbniederschlag kann anschließend lichtmikroskopisch beurteilt und nach dem IRS-Score klassifiziert werden [74]. Die Daten zur Expression der Steroidhormonrezeptoren (ER α und ER β , sowie PR α und PR-B), sowie zur Expression von Glycodelin im Kollektiv liegen aus vorherigen Untersuchungen bereits vor. Darüber hinaus sind die Histologie, die spezifischen Charakteristika und das Follow-up der Patientinnen gut dokumentiert. Die Expressionmuster der Rezeptoren sollen anschließend miteinander sowie mit den Tumor- und Patientendaten korreliert und statistisch ausgewertet werden.

1.3.2 Detektion möglicher Markergene der Metastasierung

Um Genexpressionsmuster in Tumorzellen quantifizierbar zu machen, wurde in dieser Arbeit als methodischer Ansatz eine Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR) gewählt. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgt über eine Fluoreszenzmessung, bei der die Fluoreszenz proportional zur Amplifikation des Gens erhöht ist. An die Messung schließt sich eine Auswertung an, die im vorliegenden Fall als relative Quantifizierung erfolgte: Die Amplifikation des untersuchten Gens wurde hierbei in Relation zu einer Referenzprobe gesetzt. Bei der Referenzprobe handelt es sich um ein ubiquitär hoch exprimiertes Gen, wie z.B. 18S, das gemeinsam mit den untersuchten Genen während der PCR amplifiziert wird. Die untersuchten Gene werden in ihrer Expression relativ zum Referenzgen beurteilt und nur dann als erhöht eingeschätzt, wenn sie den durch die Referenzprobe festgelegten Schwellenwert der Expression überschreiten bzw. schneller erreichen. Der Wert CT beschreibt die Zahl der PCR-Zyklen, die zum Erreichen dieses Schwellenwertes nötig ist.



Graphik 3: Schematische Darstellung der Real-Time PCR unter Verwendung einer Taq-Man-Sonde modifiziert nach Navarro, Serrano-Heras [75]

Im Gewebe hoch exprimierte Gene benötigen weniger Repetitionszyklen, um den Schwellenwert zu erreichen, niedrig exprimierte DNA-Sequenzen müssen dagegen mehr Zyklen durchlaufen. Ein niedriger CT-Wert entspricht folglich einer hohen Genexpression. Unter Berücksichtigung, dass der CT-Wert des untersuchten Gens durch den CT-Wert des Referenzgens normalisiert wird, ergibt sich die Zuordnung ΔCT . Der Wert, der den ΔCT -Wert einer untersuchten Probe wiederum relativ zur Referenzprobe beschreibt ist der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert, auf dessen Grundlage die rechnerische Auswertung nach Livak et al. [76] dann erfolgen kann. Ein Wert >1 entspricht dann einer Hochregulierung, während ein Wert <1 für eine geringere Expression im Vergleich zur Kontrolle spricht. Für die Fluoreszenzmarkierung ist ein sogenanntes Reporter-Molekül notwendig, bei dem es sich um einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff handelt, der während der PCR in die entstehende DNA eingebaut wird. Für die hoch-sensible Variante der Real-Time PCR, der Taq-Man PCR [77], werden Hydrolyse-Sonden statt den interkalierenden fluoreszenzmarkierten Molekülen eingesetzt. (vgl. 1.2.5). Diese Sonden tragen an einem Ende den „Reporter“ als Fluoreszenzfarbstoff und am anderen Ende den „Quencher“, der über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer die Fluoreszenzreaktion solange unterdrückt, bis die Sonde die gesuchte DNA-Sequenz bindet. Durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wird der Reporter dann entfernt und es entfaltet sich das Fluoreszenz-Molekül. Für diese Arbeit wurde ein Set von Genen für VEGFR-2, LHCGR, GPER, Era, HER2 und MIG7 unter Einsatz der entsprechenden Taq-Man-Primer untersucht und anschließend quantitativ ausgewertet.

1.3.3 Potentielle targets in Endometriumkarzinomen

Die dezidierte Pathogenese des Endometriumkarzinoms ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Im Folgenden werden Aspekte der Krankheitsentstehung mit Relevanz für die Fragestellung der Arbeit dargestellt. Die untersuchten Markermoleküle VEGFR2, LHCGR, ER- α , ER- β , PR-A, PR-B, GPER, HER-2, MIG7, sowie assoziierte Signalwege sollen hier kurz dargestellt und ihre Bedeutung in den Kontext des Endometriumkarzinoms eingeordnet werden.

1.3.3.1 *Vascular Endothelial Growth Receptor 2 (VEGFR2)*

In adultem Gewebe induziert der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) die endotheliale Zellproliferation und -migration mit dem Ziel neue Gefäße zu bilden. Diese Effekte werden durch die Tyrosinrezeptorkinasen, die VEGF-Rezeptoren (VGFR), vermittelt. Bisher sind die VEGF-Rezeptoren 1-3 bekannt, von denen der VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) eine entscheidende Rolle in der physiologischen und vor allem pathologischen Neovaskularisierung spielt. Die Expression der VEGF-Rezeptoren wird durch die Menge der verfügbaren Bindungspartner beeinflusst [21]. Beim VEGFR2 handelt es sich strukturell um eine Rezeptortyrosinkinase die über Ligandenbindung zu Rezeptordimerisierung und konsekutiver Autophosphorylierung führen. Die Rezeptoraktivierung induziert Signalwege, wie die PI3K Kaskade, sowie Tumorwachstum und sorgt für die Migration von endothelialen Zellen. VEGF konnte in verschiedenen Tumorentitäten als prognostischer Faktor identifiziert werden [78-80]. Auf einen Zusammenhang zwischen Prognose und VEGF-Expression konnten Guidi et al. [81] Hinweise aufzeigen. Wang et al. [82], Dai et al. [83] und Piastowska-Ciesielska et al. [84] konnten zeigen, dass VEGF in endometrioiden Malignomen überexprimiert ist, sodass die Rolle von VEGF als neoangiogenetischer Marker der Karzinogenese naheliegt. Es wird vermutet, dass bei Erreichen einer bestimmten Größe von endometrioiden Tumoren eine Gewebhypoxie der Neoplasie eintritt, die zur Ausschüttung von hypoxia-inducible factor (HIF) führt [85] (vgl. Abb X). North et al. [86] zufolge induziert HIF die Überproduktion von VEGF und initiiert damit die gesteigerte Angiogenese, die Rezeptortyrosinkinase-vermittelt zu endothelialer Proliferation, Migration und Vaskularisation führt und damit Tumorprogression und Metastasenbildung ermöglicht. In gesundem endometrialen Gewebe wurde gezeigt, dass VEGF dabei in Wechselwirkung mit Matrixmetalloproteasen (MMPs) [87] tritt.

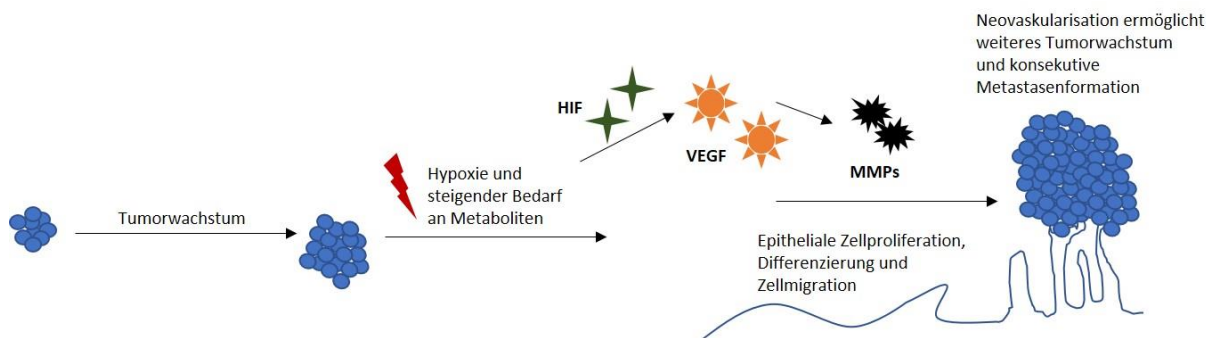


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Rolle von VEGF im endometrioiden Karzinom, modifiziert nach [84]

Die therapeutische Inhibierung der Blutgefäßneubildung könnte das Progressionspotential eines Tumors einschränken und damit die Prognose für den Patienten deutlich verbessern. Die bisher am stärksten etablierte und bereits klinisch angewandte pharmakologische Hemmung von VEGF/VEGFR, ist der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin). In Kombination mit einer Chemotherapie konnte mit dieser Strategie bereits in mehreren unterschiedlichen Tumorentitäten das Überleben verbessert werden, etwa beim Prostatakarzinom, Ovariakarzinom oder Kolorektalen Karzinom [88-90].

1.3.3.2 *Luteinizing Hormone/Choriogonadotropine Receptor (LHCGR) und seine Liganden*

Die Glycoprotein hormone Luteinisierendes Hormon (LH) und humanes Choriongonadotropin (hCG) beeinflussen die Entstehung des Endometriumkarzinoms. Beide Hormone ähneln sich trotz ihrer unterschiedlichen biologischen Funktion in ihrem strukturellen Aufbau: Sie bestehen aus mehreren Untereinheiten, zeigen allerdings verschiedene Glykosylierungsmuster. Sowohl LH als auch hCG binden an den G-Protein gekoppelten Rezeptor Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Rezeptor (LHCGR). Als Ligand hat hCG gegenüber LH eine höhere Bindungsaffinität für LHCGR [91]. Das Hormon hCG erfüllt vor allem während der Schwangerschaft eine Vielzahl biologischer Funktionen, konnte darüber hinaus aber in Tumorzellen als pro-angiogener Faktor identifiziert werden [61]. Im Kontext der Geburtshilfe und der Reproduktionsmedizin zeigte sich sogar ein direkter Einfluss von hCG auf die Expression von VEGF [92, 93] und impliziert damit proangiogene Funktionen von hCG. Im gesunden endometrialen Gewebe finden sich gerade in den endothelialen Zellen reichlich LHCGR-Rezeptoren [94]. In malignen Zellen des Endometriums ist sowohl hCG als auch der LHCGR höher exprimiert als im gesunden Gewebe [57, 58, 95]. Es konnte dargestellt werden, dass LH, hCG und LHCGR im entarteten Gewebe des Endometriums mit der Regulation der Zellproliferation in Zusammenhang stehen [59] und sogar mit dem Grading [96] assoziiert sind. Die genauen molekularen Mechanismen sind bisher allerdings noch nicht geklärt. An primären Gewebeproben von Endometriumkarzinomen, sowie an Endometriumkarzinom-Zelllinien

konnte die Expression von LHCGR, der Zugabe von LH/hCG und der Zellproliferation bzw. Invasivität festgestellt werden [96]. Physiologisch unterliegt die Regulation der LH-Sekretion zum Teil dem hypothalamischen Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH). Patientinnen mit erhöhter Expression von LHCGR im malignen Endometriumgewebe könnten in verschiedenen Erkrankungsstadien von einer Behandlung mit GnRH-Analoga profitieren, welche den LH-Spiegel senken und antiproliferative bzw. apoptoseinduzierende Effekte erzielen könnten [60, 96, 97].

1.3.3.3 Glycodelin A

Ein weiterer Faktor in der Regulation der Angiogenese in Endometriumkarzinomen ist Glycodelin, ein Protein mit lokal immunsuppressiver Potenz [98]. Es existieren unterschiedliche Glycodelin- Isoformen, von denen vor allem Glycodelin A im Endometrium exprimiert wird [99, 100]. Es konnte gezeigt werden, dass Glycodelin die Zellproliferation des malignen Endometriumgewebes reguliert und die morphologische Differenzierung der Zellen induziert [101]. Als Folge eines Anstiegs von Glycodelin nimmt die proliferative Aktivität ab und die Onkogenexpression ist rückläufig, während Tumorsuppressoren vermehrt exprimiert werden [102]: Glycodelin führt zu einer Stagnation des Zellzyklus in der G1-Phase und reguliert die mRNA der tumorsuppressiven CDKs p21, p27 und p16 hoch [103]. Im physiologischen Regelkreis stimuliert das Hormon Progesteron das Vorkommen von Glycodelin im Gewebe [104]. Da insbesondere in der Pathogenese der Typ I Endometriumkarzinome der Östrogeneinfluss ohne Progesteronschutz eine große Rolle spielt [10], kann dieser Risikofaktor möglicherweise durch die mangelhaft induzierte Glycodelin-Expression infolge fehlenden Progesterons erklärt werden. Experimentell konnte an kanzerösen Endometriumzelllinien gezeigt werden, dass bei Aufhebung des Progesteron-induzierten Glycodelin-Einflusses auf das Gewebe die Zellproliferation deutlich zurückging [103]. Im selben Kollektiv wie der hier vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Glycodelin A ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben der Patientinnen ist [98]. Die mittlere Expression von Glycodelin A in den Gewebeproben war mit einer guten Prognose, die starke Expression mit einer schlechten Prognose verbunden.

1.3.3.4 Hormonrezeptoren

Hohe Spiegel an endogenen, sowie exogen zugeführten Östrogenen sind als Risikofaktor für die Karzinogenese des Endometriumkarzinoms bekannt [55]. Dem Hormon Progesteron wird als Gegenspieler dagegen ein protektiver Effekt auf das Endometrium zugeschrieben (vgl. 1.1.5). Endokrine, parakrine und autokrine Effekte der beiden Hormone werden im endometrialen Gewebe über Östrogenrezeptoren (ER) und Progesteronrezeptoren (PR) vermittelt. Ihre Expression, Verteilungsmuster und Interaktion untereinander könnten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Endometriumkarzinoms spielen. Östrogen vermittelt seine genomische Wirkung über die Bindung an die Rezeptoren ER α und ER β . Sie

gehören zur Familie der nukleären Steroidrezeptoren und bewirken eine Alteration der Gentranskription. ER α vermittelt die Wirkung von 17- β -Östradiol, während Progesteron über die Bindung der Progesteronrezeptoren PR-A und PR-B wirkt [105]. Eine verringerte Expression von PR-B in Zelllinien humaner Endometriumkarzinomen ist mit einer geringeren Differenzierung der Tumorzellen assoziiert [106]. Über seine genomische Wirkung hinaus aktiviert Östrogen andere nicht genomische Signalkaskaden, die in Zelladhäsion, Überleben, Proliferation und Tumormorphogenese involviert sind. Diese schnellen Effekte scheinen insbesondere durch zwei Rezeptoren vermittelt zu werden: Einer membranassoziierten Isoform von ER α und dem GPER, einem in der Membran integrierten G-Protein-gekoppeltem Rezeptor [107]. GPER spielt eine maßgebliche Rolle in der durch Östrogen und seine Isoformen stimulierten Zellproliferation in gesundem Gewebe und Tumorgewebe. Revankar et al. [108] beschrieben eine zweite und häufigere Lokalisation des GPER im endoplasmatischen Retikulum, dessen multiple Funktionen im Östrogen-Signalweg noch nicht abschließend bekannt sind. Im gesunden Endometrium wird GPER dynamisch entsprechend des Zyklus exprimiert. Die höchsten Spiegel an GPER werden während der späten Proliferationsphase erreicht. Östrogen stimuliert die GPER-Expression via ER α , während PR-A supprimierend wirkt [109]. In Endometriumkarzinomen konnte ein Zusammenhang der Überexpression von GPER mit tiefer myometraner Infiltration, Metastasenformation, höherem Grading und schlechterem Outcome gezeigt werden [110, 111]. GPER induziert unter anderem über eine Aktivierung der Matrixmetalloprotease die Bindung von Epithelial Growth Factor (EGF) an seinen Rezeptor (EGFR) und initiiert darüber multiple Signalwege, wie den MAPK-, PI3K- und Phospholipase C-Weg. In humanen endometrioiden Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass GPER über den EGFR-MAPK-Signalweg die Proliferation des Tumors induziert [112]. Interessanterweise konnte eine Reduktion der GPER-Expression bei Patientinnen mit PCO-Syndrom beobachtet werden [107], einem bekannten metabolisch assoziierten Risikofaktor des Endometriumkarzinoms.

1.3.3.5 Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)

Bei der Gruppe der Human epidermal growth factor-Rezeptoren (HER) handelt es sich um ligandenaktivierte Transmembranproteine mit extrazellulärer Bindungsdomäne und intrazellulärer Tyrosinkinase-aktivität. Die Ligandenbindung führt erst zu einer Rezeptordimerisierung, gefolgt von einer Phosphorylierung der intrazellulären Domänen und schließlich zur Aktivierung multipler Signalkaskaden. Insofern besitzen die Rezeptoren protoonkogenes Potential. Der Rezeptor HER2 hat innerhalb der Familie die stärkste katalytische Aktivität. Seine Überexpression spielt eine entscheidende Rolle in zahlreichen Tumorentitäten, wie z.B. dem Mamma-, Ovarial-, Ösophagus und Endometriumkarzinomen [113]. Die Bedeutung von HER2 in der Tumorigenese des Endometriumkarzinoms ist nicht abschließend geklärt. Eine Elevation der Rezeptorexpression konnte aber sowohl in frühen Stadien der Malignomentstehung, als auch zu fortgeschrittenen Erkrankungszeitpunkten

gezeigt werden [114, 115]. In der frühen Tumorigenese zeigt sich HER2 in Verbindung mit Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1 und COX-2) erhöht [116] und könnte daher möglicherweise als Marker in der Tumorformation genutzt werden. Je nach dem histologischen Subtyp unterscheidet sich das Expressionsprofil von HER2 in manifesten Tumorstadien des Endometriumkarzinoms. Die höchste Amplifikation und Expression für HER2 wird in der Literatur für seröse Adenokarzinomen angegeben [115, 117]. In endometrioiden Adenokarzinomen vom Typ I ist HER2 insgesamt weniger stark exprimiert bzw. amplifiziert, korreliert aber mit dem Tumorgrading und dem Fortschreiten der Erkrankung [118]. Damit kommt HER2 auch eine Bedeutung als unabhängiger negativ prognostischer Marker in Endometriumkarzinomen zu [115].

1.3.3.6 MIG7

Das Genprodukt MIG-7 scheint in Endometriumkarzinomen die Interaktion des Primärtumors mit dem umliegenden Gewebe zu beeinflussen und könnte daher eine Rolle bei der Filialisierung spielen. Hepatocyte Growth Factor (HGF) ist ein stromales Produkt, das gemeinsam mit seinem Rezeptor, dem Protoonkogen c-Met in verschiedenen Tumorentitäten hochreguliert und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Über diesen Signalweg werden multiple Effekte vermittelt, die für die Metastasenformation fundamental sind, wie etwa Angiogenese, Proliferation und Invasion [119]. Bei der Suche nach Genprodukten, die durch HGF induziert werden, wurde das Transkript MIG-7 in Tumorzelllinien des Endometriumkarzinoms entdeckt. Es handelt sich dabei um ein spezifisches Genprodukt, das nur in kanzerösem Gewebe und nicht in gesundem Gewebe vorkommt. In vitro konnte für ein Endometriumkarzinom gezeigt werden, dass das Antisense-Produkt von MIG-7 die Streuung des Primärtumors inhibiert [120]. MIG-7 könnte daher potentiell als Target einer Therapie zur Prävention der Metastasierung genutzt werden. Darüber hinaus ist die Expression von MIG-7 im Gewebe hochspezifisch für Tumoren und könnte daher zur frühen Detektion von okkulten Tumorzellen genutzt werden [70].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die steigende Inzidenz des Endometriumkarzinoms als eines der häufigsten weiblichen Malignome in den industrialisierten Nationen stellt eine Herausforderung für die Patientenversorgung dar. Die Karzinome des Corpus uteri umfassen eine sehr heterogene Gruppe an Tumoren mit divergierender Prognose und jeweils unterschiedlichen Anforderungen an das therapeutische Management. Bei etwa 20% der als östrogenabhängige Typ I und damit als niedrigmaligne klassifizierten Tumore liegen höhergradige Läsionen vor [24], sodass die dualistische Einteilung nach Bokhman [10] den Herausforderungen in der Therapieentscheidung nicht suffizient begegnen kann. Aber auch die im klinischen Alltag verwendeten FIGO- und TNM-Klassifikationen zeigen Limitationen in ihrer prognostischen Aussagekraft bezüglich dem Auftreten von Lokalrezidiven und der Metastasenformation [53, 54].

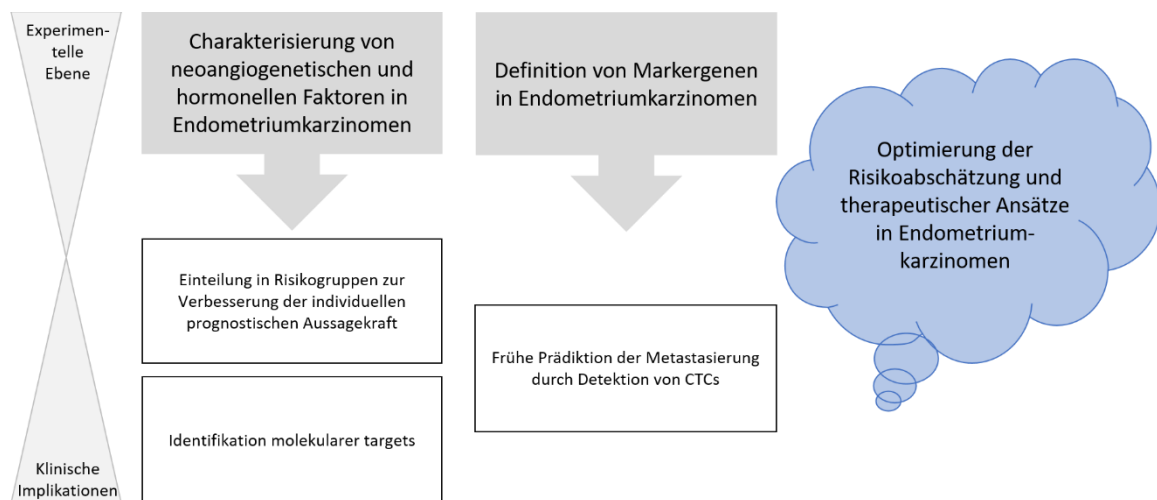


Abbildung 5: Schematische Skizzierung der Zielsetzung in der vorliegenden Arbeit

Eine Charakterisierung der Tumoreigenschaften kann helfen die prognostische Aussagekraft für die betroffene Patientin zu verbessern. Die Kenntnis um die molekulare Charakterisierung des Tumors kann neben einer Einschätzung des Risikos für die Patientin auch eine Hilfe in der Frage nach einem optimierten Therapieregime sein. Die vorliegende Forschungsarbeit soll einen Beitrag zum weiteren histopathologischen Verständnis der Tumorigenese leisten und Ausblick auf mögliche Implikationen zum Einsatz von targeted therapies in Endometriumkarzinomen geben. Lässt sich innerhalb der Patientinnen ein Kollektiv beschreiben, das von dem Einsatz einer endokrinen Therapie bzw. einer Neoangiogenese-hemmenden Therapie profitieren könnte? Dazu sollen Signalstrukturen in Neoangiogenese und hormonellen Kaskaden immunhistochemisch untersucht werden und ihr Einfluss auf Risiko und Prognose der Patientinnen beleuchtet werden.

Darüber hinaus soll die Möglichkeit einer frühzeitigen Detektion der Metastasierung evaluiert werden. Einzelne vom soliden Tumor losgelöste Zellen (CTCs) werden über das Blutgefäßsystem in andere Gewebe geschwemmt und könnten daher in Blutproben nachweisbar sein. Die vorliegende Arbeit soll ein Set an Markergenen bezüglich seiner Eignung als Detektoren für CTCs in einem PCR-basierten System untersuchen. Möglicherweise kann dieser experimentelle Ansatz dann im klinischen Alltag zur frühzeitigen Prädiktion einer Metastasenformierung sein.

2. Material und Methoden

2.1 Immunhistochemische Untersuchung auf Oberflächenmarker

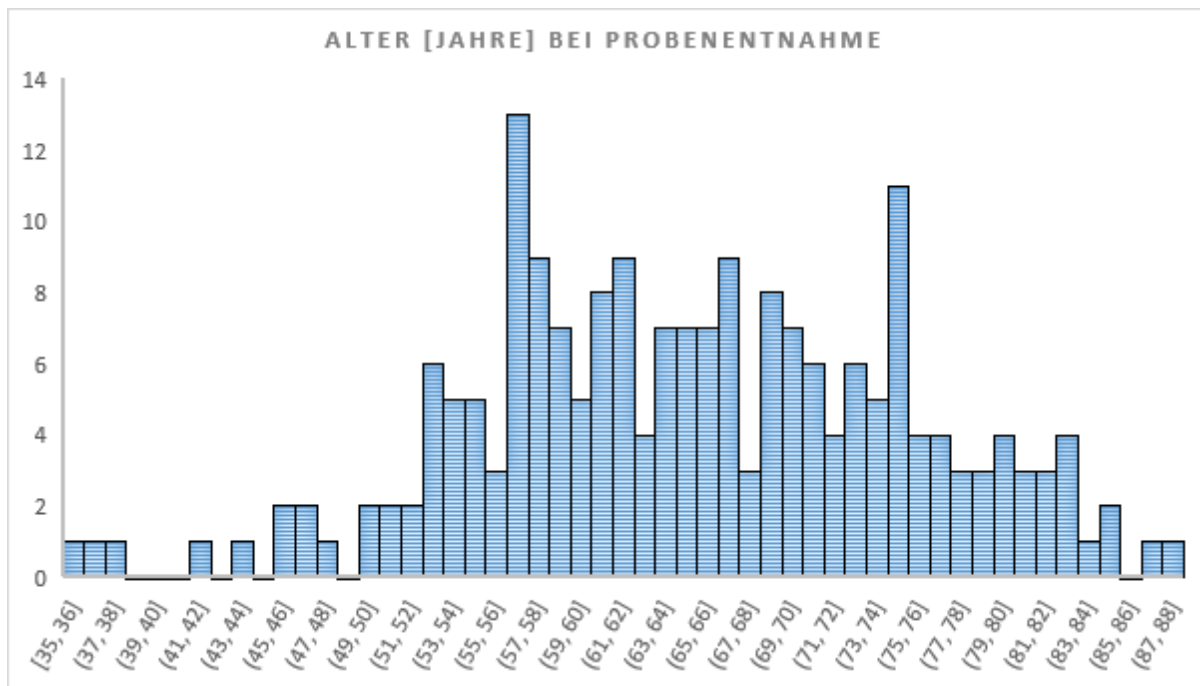
2.1.1 Kollektivanalyse der Tumorpräparate

Die Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München am Campus Innenstadt verfügt über eine große Sammlung an intraoperativ gewonnen Gewebeproben von Endometriumkarzinomen, die mithilfe von Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Untersuchungskollektiv mit 203 Gewebeproben zusammengestellt, welche aus Tumoroperationen an der Frauenklinik im Zeitraum von 1990 bis 2001 entstammen und direkt anschließend an die Probengewinnung durch Pathologen und entsprechend geschulte Frauenärzte histologisch befundet wurden. Zu den Gewebeproben liegen die Informationen zu Geburtsdatum, Diagnosedatum, Follow-up-Untersuchungen und gegebenenfalls zum Todesdatum der Patientinnen vor. Die Daten wurden mit einer Abfrage des Tumorregisters vom 31.03.2015 ergänzt und in unsere Datenbank eingepflegt.

Die archivierten Gewebeproben wurden in das zu untersuchende Panel aufgenommen, wenn es sich histologisch um endometrioiden Adenokarzinome handelte. Die weitere Zusammensetzung des Kollektivs erfolgte zufällig und zeigt daher große Varietät bezüglich der übrigen Eigenschaften von Tumor und Patientin.

2.1.1.1 Altersverteilung

Das Alter der Patientinnen zur Zeit der Tumorentnahme zeigt eine große Bandbreite. Die Patientinnen waren zwischen 35 und 88 Jahren alt. Das Durchschnittsalter betrug 65,3 Jahre. Der Median lag ebenfalls bei 65,3 Jahren. Dass Mittelwert und Median in unserem Patientenkollektiv gleich groß sind spricht für eine Normalverteilung der Daten. Damit deckt sich die Altersverteilung des Kollektivs mit den Häufigkeitsgipfeln, die in der Literatur zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr angegeben wurden [1]. Der Einsatz der Menopause in der kaukasischen Bevölkerung wird auf das mediane Alter von 47,5 Jahren datiert [121]. In unserem Kollektiv finden sich nur insgesamt 9 Patientinnen (4,4%), die bei Diagnosestellung jünger als 47,5 Jahre waren und von denen wir daher einen prämenopausalen Hormonstatus annehmen. Insgesamt betrachtet zeigt sich auch in dem untersuchten Kollektiv, dass es sich beim endometrioiden Adenokarzinom um ein „Karzinom der älteren Frau“ handelt [122]. So waren im vorliegenden Kollektiv 68 Frauen (33,5%) zwischen 60 und 70 Jahren alt.



Graph 1: Diagramm zur Alters-Häufigkeits-Verteilung im vorliegenden Kollektiv [in Jahren]

2.1.1.2 Histologie

Endometrioides Adenokarzinome stellen den häufigsten histologischen Subtyp des Endometriumkarzinoms dar [2]. In der Sammlung der Gewebeproben der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München lagen entsprechend dieser epidemiologischen Beobachtung vorrangig Adenokarzinome vor. Aufgrund der Menge und der besseren Vergleichbarkeit innerhalb des Panels wurden daher in das hier untersuchte Kollektiv ausschließlich endometrioides Adenokarzinome eingeschlossen. Man unterscheidet östrogenabhängige (Typ I) Karzinome von den östrogenunabhängigen (Typ II) Formen.

2.1.1.3 TNM-Klassifikation, FIGO-Klassifikation und Grading der untersuchten Fälle

Da die vorliegenden Proben teilweise vor über 25 Jahren entnommen wurden, unterscheidet sich die damals festgehaltene Tumorklassifizierung der Präparate von den heutigen Standards der Klassifikation. Die Berichte wurden durchgesehen und die Klassifizierung entsprechend der TNM- und FIGO-Klassifikation von 2017 [2, 31] angepasst.

Tumorausdehnung

Die große Mehrheit der Fälle unseres Kollektivs zeigte kleine Tumoren: Bei 166 Patientinnen (82%) befand sich der Tumor zum Zeitpunkt der Operation im T1-Stadium, das heißt auf den corpus uteri begrenzt. 120 der Tumoren (59%) waren lediglich auf das Endometrium begrenzt oder infiltrierten das Myometrium zu weniger als der Hälfte (T1a), während weitere 42 (21%) das Myometrium zu über der Hälfte infiltrierten (T1b). Von 4 Fällen ist die Subklassifikation des

T1 Stadiums nicht weiter bekannt. Lediglich in 15 Fällen (7%) war der Zervixstatus infiltriert im Sinne eines T2 Stadiums. Eine darüberhinausgehende lokale Ausbreitung im Sinne eines Stadiums T3 fand sich bei 17 Patientinnen (8%). 10 Patientinnen zeigten ein T3a, also einen Befall von Serosa des corpus uteri bzw. eine direkte Ausbreitung in die Adnexe. Bei 3 weiteren Patientinnen kam es zum Vaginalbefall bzw. Befall der Parametrien im Sinne von T3b. In 4 Fällen ist eine weitere Subklassifikation des T3 Stadiums nicht erfolgt. Blasen- und/oder Darmschleimhaut im Sinne eines T4 Stadiums waren nur bei 5 Patientinnen (2%) infiltriert.

Tumorausdehnung [n]	T1		T2	T3		T4
	166		15	17		5
	T1a	T1b		T3a	T3b	
	120	42		10	3	
FIGO- Klassifikation [n]	I		II	III		IV
	162		15	19		7
Nodalstatus [n]	NX	N0	N1			
	57	135	11			
Metastasenstatus [n]	MX	M0	M1			
	76	124	3			

Tabelle 5: Tumorcharakteristika nach dem TNM-System von 2017 im Kollektiv

Nodalstatus

Zu 57 der entnommenen Präparate (28%) liegen keine Informationen bezüglich möglicherweise befallener Lymphknoten vor. In den übrigen Fällen wurden mindestens 6 und maximal 59 Lymphknoten entnommen und anschließend auf metastatische Veränderungen untersucht. Bei etwa zwei Dritteln des Gesamtpanels, nämlich 135 der 203 eingeschlossenen Fälle (67%), fanden sich in der pathologischen Betrachtung keine Metastasen in den entnommenen regionären Lymphknoten, sodass in diesen Fällen ein N0-Status vorlag. Dagegen fanden sich bei insgesamt 11 Patientinnen (5%) regionäre Lymphknoten-Metastasen.

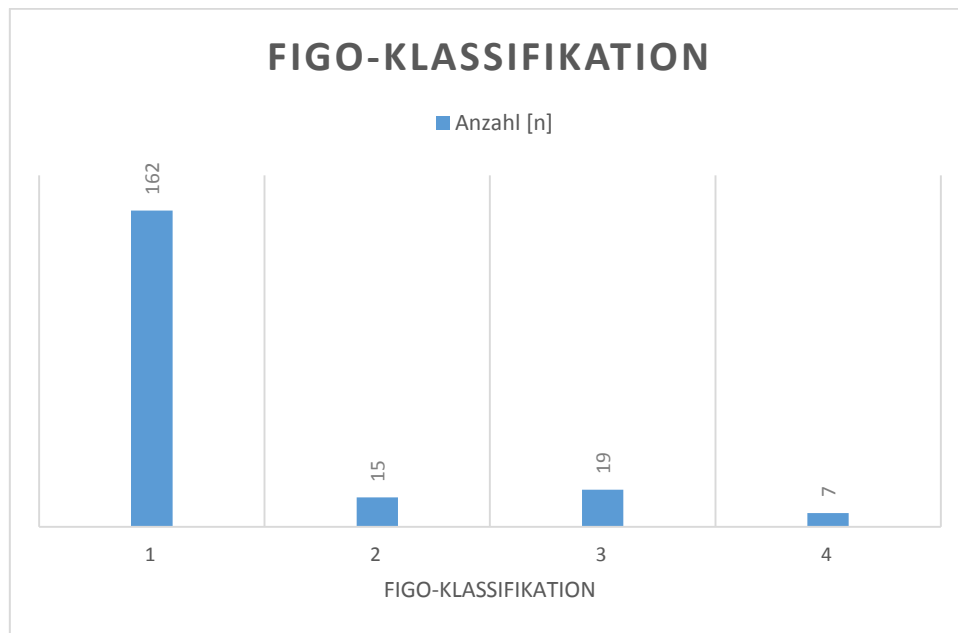
Fernmetastasenstatus

Der Metastasenstatus wurde bei etwa zwei Dritteln der Patienten (n=127) erfasst. Es fanden sich nur bei 3 Patientinnen (1,5%) Fernmetastasen. In 124 Fällen waren keine Fernmetastasen nachweisbar (61%).

FIGO-Klassifikation

Für die klinische FIGO-Klassifikation gilt das operative Staging als verbindlich, zu dessen Voraussetzungen eine abdominelle Exploration, Hysterektomie, beidseitige Adnexektomie

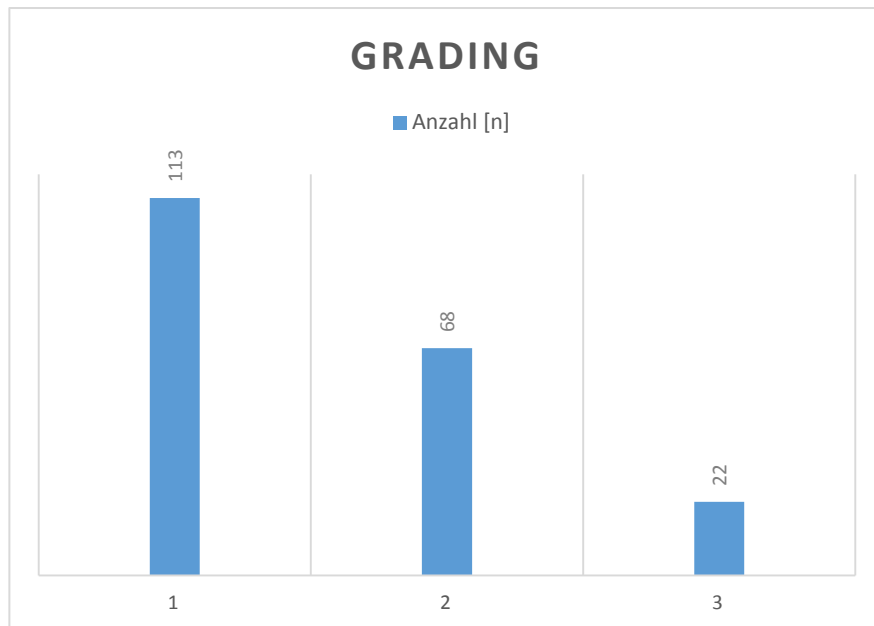
und für die Stadien nach FIGO I und II die pelvine und paraaortale Lymphadenotomie gehört. Entsprechend der FIGO-Klassifikation aus dem Jahr 1998 mit Modifikation von 2010 ergaben sich für unser Kollektiv für mehr als Dreiviertel der betrachteten Fälle (n=162, 80%) das FIGO-Stadium I. 15 weitere Fälle entsprachen dem Stadium II (7%), sowie 19 dem Stadium III (9%). Lediglich 7 der Patientinnen (3%) zeigten eine lokal fortgeschrittene Ausbreitung des Tumors und/oder Fernmetastasen und entsprachen damit dem FIGO-Stadium IV.



Graph 2: Aufteilung der Fälle im untersuchten Kollektiv nach FIGO-Klassifikation von 1998 mit Modifikation von 2010, [n] gesamt=203

Grading

Das Grading der Tumoren wird als separater prognostischer Faktor von der FIGO-Klassifikation erhoben. Im Anschluss an die operative Gewinnung der Tumorpräparate wurden diese histologisch aufgearbeitet und hinsichtlich ihrer Differenzierung von den Pathologen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München eingehend untersucht. Es gelten diejenigen Tumoren als gut differenziert (G1), welche einen Anteil von <5% solider, nicht plattenepithelialer Areale aufweisen. Bei einem Anteil zwischen 5 und 50% solider, nicht plattenepithelialer Areale handelt es sich um eine mäßiggradige Differenzierung (G2), bei über 50% solider und nicht-plattenepithelialer Anteile um ein schlecht differenziertes Malignom (G3) [2]. Von den 203 betrachteten Gewebeproben waren mehr als die Hälfte, 56% (n=113), als gut differenziert mit hoher Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe als G1 eingestuft. Mäßig differenziertes Gewebe (G2) fand sich in 33% (n=68) der Proben, wohingegen nur 11% (n=22) als schlecht differenziert (G3) eingeordnet wurden.



Graph 3: Aufteilung der untersuchten Tumorpräparate entsprechend des Gradings, [n] gesamt=203

Die regelmäßigen Follow-up-Untersuchungen der Patientinnen erlaubten eine Erhebung von Lokalrezidiven. So fanden sich bei 6% der Patientinnen (n=12) Lokalrezidive. Innerhalb der Gruppe von Patientinnen mit Lokalrezidiven wurde 58% (n=7) ein G2-Status für eine mäßig differenzierte Gewebestruktur zugeordnet. Im Gesamtkollektiv hatten nur 33% einen G2-Status. 17% (n=2) der Patientinnen mit Lokalrezidiven wurden in der pathologischen Untersuchung als G3 eingestuft, im Gesamtkollektiv waren es dagegen nur 11%.

2.1.1.4 Rezeptorexpression der Tumorpräparate

Shabani et al. [123] hatten bereits im Jahr 2007 die Patientinnen desselben Kollektivs auf die Expression der Hormonrezeptoren ER α , ER β , PR-A, PR-B immunhistochemisch untersucht. Die Beurteilung erfolgte lichtmikroskopisch und wurde nach dem IRS [74] beurteilt. Tabelle 6 zeigt den Hormonträgerstatus im Kollektiv. Für die Färbung mit ER α wurden bei einem Median der IRS-Werte von 2 als negativ, diejenigen Präparate mit einem IRS von ≥ 3 als positiv bewertet. Dies traf für 92 Präparate zu. 111 andere Fälle zeigten einen negativen Status der ER α -Expression. Bei der Untersuchung der Gewebeprobe auf die Expression von ER β ergab sich für die IRS-Werte ein positiver Status, wenn der IRS-Wert ≥ 1 , sodass 28 der Präparate im Kollektiv einen positiven und 175 einen negativen Trägerstatus für ER β hatten. Für die Untersuchung des Rezeptorstatus von PR-A wurden IRS - Werte von ≥ 4 als positiv klassifiziert, sodass 92 Präparate einen positiven Rezeptorstatus zeigten, während 111 Tumoren für den PR-A – Rezeptor als negativ eingeschätzt wurden. Bei der Betrachtung von PR-B ergab sich durch einen cutoff bei einem IRS von 4 bei 103 Präparaten in positiver Rezeptorstatus, bei 100 anderen ein negativer Status.

Außerdem erfolgte durch Lenhard et al. [98] 2013 eine weitere immunhistochemische Untersuchung des dieser Arbeit zugrundeliegenden Kollektivs auf die Expression der Glykoproteine Glycodelin und seiner immunosuppressiven Isoform Glycodelin A. Die Glycodelin A-Färbung erfolgte dabei mit kommerziell erworbenen polyklonalen Antikörper (Glycodelin A Poly) und einem zuvor entwickelten monoklonalen Antikörper (Glycodelin A Mono) [124]. Die immunhistochemische Untersuchung wurde mithilfe des IRS ausgewertet. Für die Betrachtung der Glycodelin - Rezeptorexpression wurde bei einem Median des IRS von 6 entsprechend auch der der cutoff-Wert von 6 festgelegt, sodass 82 Präparate positiv und 121 negativ waren. Seine Isoform Glycodelin A zeigte als Median der IRS-Färbung ebenfalls den Wert 6, sodass auf dieser Basis 57 Präparate positiv und 142 Fälle negativ für die Rezeptorexpression waren.

Hormonrezeptor	Cutoff nach IRS	Hormonrezeptorstatus	Anzahl [n]	Anteil [%]	n gesamt
ERα	2	Positiv	92	45,3 %	203
		Negativ	111	54,7 %	
ERβ	0	Positiv	28	13,8 %	203
		Negativ	175	86,2 %	
PR-A	3	Positiv	92	45,3 %	203
		Negativ	111	54,7%	
PR-B	4	Positiv	103	50,7 %	203
		negativ	100	49,2 %	
Glycodelin A Mono	6	Positiv	57	28,1 %	203
		Negativ	146	71,9 %	
Glycodelin Poly	6	Positiv	82	40,4 %	203
		Negativ	121	59,6 %	

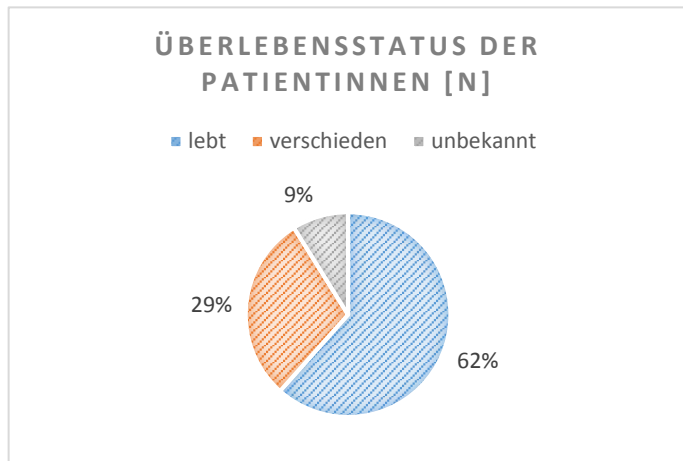
Tabelle 6: Hormonrezeptorstatus für Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) und Progesteronrezeptoren (PR-A und PR-B) der Gewebeproben im untersuchten Kollektiv, [n] gesamt=203

2.1.1.5 Überleben/Todesfälle

Die Daten zu Überleben und Todesfällen entstammen einer Abfrage des Tumorregisters München vom 31.03.2015. Zu diesem Zeitpunkt war der Großteil (62%, n=125) der Patientinnen noch am Leben. Nur etwa ein Drittel (29%, n=60) war zum Zeitpunkt der Datenerfassung bereits verstorben. Zu einer direkten Korrelation zwischen dem Versterben der Patientinnen und ihrem Tumorleiden konnte nicht in einer relevanten Anzahl der Fälle erfasst werden und wurde daher nicht berücksichtigt. Bei einem kleinen Anteil der Patientinnen (9%, n=18) liegen die Informationen zum Überlebensstatus aufgrund von fehlenden Follow-Up- Untersuchungen nicht vor.

Überlebensstatus	Anzahl [n]	Anteil in [%]
Lebt	125	61,2
verstorben	60	29,6
Unbekannt	18	8,9
Gesamt	203	100

Tabelle 7: Überlebensstatus der Patientinnen des untersuchten Tumorkollektivs



Graph 4: Darstellung des Überlebensstatus in Relation zum Gesamtkollektiv

2.1.2 Spezifische Antikörper gegen LHCGR und VEGFR-2

Für den Nachweis des LHCG- und des VEGFR-2- Rezeptors in den Tumorpräparaten des Kollektivs wurden entsprechende Antikörper der Firma Acris Antibodies GmbH genutzt, die explizit zu Forschungszwecken vorgesehen sind. Tabelle 8 gibt einen Überblick über Daten und Eigenschaften der Antikörper. Im Falle des Antikörpers gegen den LHCG-Rezeptors handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper vom IgG-Isotyp, der durch Injektion des aufgereinigten Antigens in die Bauchhöhle eines Kaninchens gewonnen werden. So wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die eine Flüssigkeitsansammlung im Peritonealraum des Tieres nach sich zieht, in der u.a. der gesuchte Antikörper enthalten ist. Er wird schließlich durch Punktion und anschließende Aufreinigung gewonnen [125]. Der monoklonale Antikörper Anti-VEGFR-2 ist dagegen das Produkt eines einzigen Klons von Plasmazellen und damit hochspezifisch für das Epitop des VEGFR-2-Rezeptors, gegen das es konzipiert ist. Zur Herstellung wird eine antigenspezifische Immunreaktion im Wirtstier hervorgerufen und anschließend B-Zellen aus Milz- oder Lymphknotengewebe gewonnen. Im Anschluss werden die gewonnen B-Zellen mit Myelomzellen hybridisiert, das heißt immortalisiert. Von den Hybriden werden dann Antikörper-produzierende Zellen von denjenigen, die keine Produktion aufweisen selektioniert. Anschließend erfolgt die klonale Vermehrung in einem Kulturmedium [73].

Antikörper	Anti-VEGFR-2	Anti-LHCGR
Hersteller	Acris Antibodies GmbH	Acris Antibodies GmbH
Tierspezies	Hase	Hase
Isotyp	IgG	IgG
Klonalität	Monoklonal	Polyklonal
Katalog-Nr.	AM2104PU-M	SP4594
Lot Nr.	131210LVB	39887
Erworbene Menge	0,035 mg/ml	1 mg/ml
Verwendete Konzentration [AK]/[PBS]	1µl / 50µl, entspricht 0,07µg AK pro Schnitt	1µl /800µl, entspricht 0,125 µg AK pro Schnitt
Reaktionsmuster	Zytoplasmatisch, membranständig	Zytoplasmatisch, membranständig

Tabelle 8: Eigenschaften verwendeter Antikörper und deren Konzentrationen

Polyklonal gewonnene Antikörper weisen eine relativ starke Hintergrundfärbung auf, die auf die Proteinbildung während des Entzündungsprozesses zurückzuführen sind. Durch Verdünnung des Antikörpers und durch Anwendung spezieller Färbetechniken versucht man die Hintergrundfärbung zu minimieren. Der Vorteil monoklonal gewonnener Antikörper liegt dagegen in der hohen Homogenität und dem Fehlen unspezifischer Antikörper [73]. Beide in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zeigen ein zytoplasmatisches bzw. membranständiges Reaktionsmuster. Der monoklonale Anti-VEGFR-2-AK wurde in der Verdünnung 1:50 mit PBS verwendet, während der polyklonale Anti-LHCGR-AK aufgrund einer stärker ablaufenden unspezifischen Färbung in der Verdünnung 1:800 mit PBS aufgetragen wurde.

2.1.3 Methodik der immunhistochemischen Untersuchung

Um die Antigenexpression in den kanzerösen Gewebeproben nachzuweisen, wurden die intraoperativ gewonnenen Präparate in Formalin fixiert und in Paraffin eingegossen. Am Mikrotom wurden daraus Gewebeschnitte generiert, die auf Objektträger aufgezogen wurden. Die Gewebeschnitte wurden vorbehandelt und die gesuchten Antigene mit einem spezifischen Antikörper markiert und in einer angeschlossenen Chromogenreaktion mit DAB farblich sichtbar gemacht. Es erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun und die anschließende Eindeckung mit Eukitt. Die Gewebeproben wurden lichtmikroskopisch mittels IRS beurteilt und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

2.1.3.1 Fixierung der Gewebeproben nach intraoperativer Gewinnung

Die im Folgenden detailliert beschriebene Vorbehandlung erfolgte durch die Mitarbeiter/innen der Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe München und wurde in gleicher Weise für die Fragestellung nach beiden Rezeptoren durchgeführt. Die Methodik soll an dieser Stelle

erläutert werden, um den Entstehungsprozess des verwendeten Materials nachvollziehbar zu machen.

Um eine Autolyse durch die körpereigenen Fermente zu vermeiden wurde das Gewebe direkt im Anschluss an die Operation abhängig von ihrer Größe fixiert. Gewebestücke von geringem Ausmaß wurden 24 Stunden fixiert, während große Präparate zunächst für 24 Stunden komplett fixiert wurden und anschließend relevante Gewebestücke präpariert und erneut für 24 Stunden behandelt wurden. Für die Fixation wurde vierprozentiges neutral gepuffertes Formalin verwendet, dabei handelt es sich um die wässrige Lösung von Formaldehyd. Die Formalinmoleküle lagern sich an die Eiweißmoleküle des Präparats an und etablieren dadurch eine stabile Gitterstruktur. Ein großer Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Proteine fast nicht denaturieren und dadurch ein Nachweis von Antigenen nach der Fixation noch möglich ist. Nach Ablauf der benötigten Fixationszeit wurde das Fixationsmittel mit Leitungswasser sorgfältig ausgewaschen. Für den Einbettungsprozess wurde ein Automat verwendet. Die Präparate wurden in einer Reihe von 70%igen und mehreren absoluten Alkoholen getränkt, um ihnen mit diesen organischen Lösungsmitteln das Wasser zu entziehen. Anschließend wurden sie in Xylol gelegt, das die Alkoholreste im Gewebe entfernt und als Intermedium sowohl Wasser als auch Paraffin binden kann. Das auf 60°C erhitzte Paraffin kann sich nun in seiner flüssigen Form an allen Stellen ablagern, an denen sich zuvor Wasser befand. Im Anschluss an den automatisierten Einbettungsprozess wurden die Präparate aus der Kapsel des Automaten entfernt und händisch mit Paraffin in die Form eines Blockes gegossen. Durch Abkühlen erhärtete das Paraffin und ermöglichte die Auslösung aus der Form. In dieser Form konserviert können die Gewebeproben über Jahrzehnte hinweg aufbewahrt werden.

Bevor die so entstandenen Tumorblöcke am Mikrotom geschnitten wurden, wurden sie bei -20°C gelagert. Dadurch wird das Schneiden am Schlittenmikrotom in 2-3 µm dicke Gewebeschnitte erleichtert. Die Gewebeschnitte wurden mithilfe eines auf Raumtemperatur temperierten Wasserbades auf Objektträger aufgezogen. Es wurden „SuperFrost Plus“ Objektträger genutzt, die durch ihre positive Oberflächenladung für eine bessere Haftung des Schnittes sorgen. Anschließend wurden die Schnitte auf dem Objektträger in einem temperierten Wasserbad nochmals neu aufgezogen, um das Gewebe besser zu entfalten. Im Brutschrank wurden die Schnitte über Nacht bei 56-58°C aufgetrocknet, um die Anhaftung des Gewebeschnittes am Objektträger zu optimieren, aber keine Antigenstrukturen dabei zu zerstören.

2.1.3.2 Immunhistochemische Anfärbung

2.1.3.2.1 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Um eine immunchemische Färbung zu ermöglichen, muss zunächst das Paraffin aus den Gewebeschnitten wieder gelöst werden. Zu Beginn wurde das Paraffin mithilfe von Xylol für 20 Minuten aus den Gewebeschnitten gelöst. Durch Schwenken der Schnitte in 100%igem Ethanol wurde das Xylol anschließend wieder entfernt. Das System, das in einem späteren Schritt zur Detektion der Primärantikörper angewendet wird, nutzt eine zugeführte Peroxidase zur Substratumsetzung. Die endogene Peroxidase kann eine unspezifische Färbung des Gewebes verursachen und muss daher inaktiviert werden. Dafür wurden die Proben für 20 Minuten in 3%igem mit Methanol verdünnten H_2O_2 inkubiert und anschließend wieder in absolutem Ethanol geschwenkt. Darauf folgte das Schwenken in der absteigenden Alkoholreihe (in 70%igem und 50%igem Ethanol). Die Schnitte wurden anschließend in destilliertem Wasser gespült, um Ethanolreste zu entfernen. Durch die Formalinfixierung können Antigenepitope der Gewebeproben Änderungen ihrer dreidimensionalen Struktur mit Verlust der Immunreaktivität erfahren, den man als Antigenmaskierung bezeichnet [73]. Um dieser morphologischen Veränderung entgegen zu wirken wurde die Antigendemaskierung, eine Hitzevorbehandlung der Proben in mit destilliertem Wasser verdünnten Natriumcitratpuffer (pH 6) durchgeführt. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurden 18 ml Citronensäure (21,01g 0,1M Citronensäure auf 1l destilliertem Wasser) und 82 ml verdünntem Natriumcitrat (29,41g 0,1M Natriumcitrat auf 1l destilliertem Wasser) mit 900 ml destilliertem Wasser verdünnt. Die Lösung wurde im Dampfkochtopf bis zu ihrem Siedepunkt erhitzt und die Gewebeschnitte für 5 Minuten bei geschlossenem Deckel gekocht. Nach abgelaufener Zeit wurde die Hitzestufe herunterreguliert und die Schnitte für weitere 4 Minuten bei geschlossenem Deckel belassen. Im Anschluss wurde der Dampfkochtopf von der Hitzequelle entfernt, der Deckel geöffnet und die Gewebeproben verblieben für nochmals 20 Minuten in dem heißen Puffer. Um den Puffer auszuwaschen wurden die Schnitte im Anschluss in kaltem destilliertem Wasser und zwei Mal für jeweils 2 Minuten in PBS gewaschen.

2.1.3.2.2 Anfärbung der Antigene VEGFR-2 und LHCGR

Nachdem die Gewebeschnitte wie oben beschrieben vorbehandelt wurden, erfolgte die eigentliche Anfärbung. Im Gewebe vorhandene elektrostatische Ladungen können insbesondere an Membranen und an Fettgewebe unspezifische Färbereaktionen verursachen, man spricht in diesem Fall von einer Hintergrundfärbung. Um diesen Effekt zu verhindern wurden die Ladungen mit einer Blocking-Solution gesättigt, die für fünf Minuten auf den Schnitten belassen wurde.

Es folgte die Inkubation der Schnitte mit den Primärantikörpern Anti-VEGFR-2 bzw. Anti-LHCGR. Für die Färbung des Antigens VEGFR-2 wurde der Anti-VEGFR-2-AK in der

Verdünnung 1:50 mit sterilem PBS erst für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um dann weitere Inkubationsphasen von 16 Stunden bei 4°C und erneuten 15 Minuten bei Raumtemperatur anzuschließen. Für die immunhistochemische Darstellung des Antigens LHCGR wurde der Anti-LHCGR-AK in der Verdünnung 1:800 mit sterilem PBS für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert. Für beide Färbungen wurde die optimale Inkubationszeit zuvor an Probeschnitten getestet (siehe auch 2.1.3.2.4).

Nach erfolgter Inkubation wurden die Schnitte zwei Mal für zwei Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit einem Post-Block Reagenz für 20 Minuten behandelt. Dabei handelt es sich um ein Verstärkungsreagenz. Dann erfolgte erneut die zweimalige Waschung für jeweils zwei Minuten in PBS und schließlich wurde das HRP-Polymer (Horseradish peroxidase) für 30 Minuten aufgetragen. Um überschüssigen HRP zu entfernen wurden die Präparate erneut zwei Mal für zwei Minuten in PBS gewaschen. Direkt anschließend wurde die Substrat-Chromogenreaktion mit DAB durchgeführt, das zu diesem Zweck verdünnt wurde (Ein Tropfen DAB-Chromogen auf 1 ml Substratpuffer). Für die Färbungen des VEGFR-2- und LHCGR-Antigens wurde das DAB jeweils 60 Sekunden auf den Präparaten belassen. Der HRP Polymer-Kit enthält eine aus Meerrettich gewonnene Peroxidase, die den Sekundärantikörper enzymatisch markiert [126]. Durch das DAB wurde die enzymatische Reaktion mit der Meerrettichperoxidase gestartet, die in einem mikroskopisch sichtbaren Farbniederschlag am Ort der Bindung mit dem Primärantikörper resultiert. Um die Substrat-Chromogenreaktion nicht durch endogene Peroxidase zu verfälschen, die vor allem in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten vorkommt [73], wurde die endogene Peroxidase bereits vor Inkubation mit dem Primärantikörper mit H_2O_2 inaktiviert. Die Chromogenreaktion wurde durch einen Waschvorgang in destilliertem Wasser unterbrochen.

2.1.3.2.3 *Gegenfärbung, Dehydrierung und Eindecken*

Zur Beurteilung der Gewebepräparate ist es notwendig auch das übrige Gewebe anzufärben. Dazu wurde die Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer durchgeführt. Die Präparate wurden für zwei Minuten in Hämalaun gelegt und anschließend für fünf Minuten in Leitungswasser, einem alkalischen Milieu, gebläut. Es handelt sich dabei um einen basischen Farbstofflack in saurer Lösung, der einen pH von 4,5 hält. Wegen ihrer negativen Ladung werden mit der Hämalaunfärbung die Nuclei der Zellen besonders stark gefärbt. Es lagern sich dabei die positiv geladenen basischen Farbstoffmoleküle an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA an. Das Zytoplasma dagegen färbt sich nur zartblau. Ab einem pH von 3,0 schwenkt die Farbe des Hämalauns in blau um. Daher wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült. Da der in der Chromogen-Substrat-Reaktion entstandene Farbkomplex in organischen Lösungsmitteln unlöslich ist, konnten die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden. Dazu wurden sie in 70%igem, 96%igem, absolutem Ethanol und schließlich in Xylol geschwenkt. Dieser Schritt ist notwendig, da das

direkt im Anschluss zum Eindecken der Schnitte verwendete Eukitt hydrophob ist. Das Eindeckmedium Eukitt verschließt das Präparat luftdicht und macht es für Jahre haltbar. Darüber hinaus hat es denselben Brechindex wie Glas, was für die Beurteilung unter dem Mikroskop entscheidend ist.

2.1.3.2.4 Kontrollen

Die Verlässlichkeit der Ergebnisse wurde durch das Mitführen von Positivkontrollen bei jedem Färbedurchlauf gewährt. Dabei wurden dieselben Schritte an den Kontrollen durchgeführt wie an den Proben (siehe 2.1.3.1 bis 2.1.3.2.3). Als Kontrollpräparate wurden humane Gewebe gewählt, von denen bereits bekannt war, dass sie das gesuchte Antigen enthalten. Diese Information wurde generiert, indem bei mehreren Testdurchläufen zur Detektion der geeigneten Antikörperkonzentration unterschiedliche Gewebe als potentielle Kontrollpräparate mitgefärbt wurden. Es wurden dann geeignete Präparate ausgewählt. Im Fall, dass bei einem Färbedurchlauf die Positiv-Kontrolle keine erfolgte Chromogenreaktion durch DAB aufgewiesen hätte, wäre von falsch negativen Ergebnissen der Proben auszugehen gewesen. Bei allen durchgeführten Färbungen der Chargen für die VEGFR-2-Antigen und die LHCGR-Antigen Färbung zeigten die Kontrollgewebe adäquate Farbreaktionen.

Darüber hinaus wurden Isotypenkontrollen durchgeführt, die als Systemkontrolle fungieren sollten. Dazu wurden dieselben Kontrollgewebe wie für die Positivkontrollen herangezogen. Statt dem Primär-AK wurde allerdings ein Negativ-Kontrollserum verwendet, das genau wie der Primär-AK aus der Tierspezies Hase gewonnen wurde, sich aber nicht gegen die Spezies Mensch richtet. Das heißt bei Inkubation des humanen Gewebes mit dem Antikörper wurde keine Bindung an Antigene erwartet. Ein positiver Farbausschlag ließe von unspezifischen Bindungen des Detektionssystems ausgehen.

Zu untersuchendes Antigen	Getestete Gewebepreparate für Kontrollen	Verwendetes Gewebepreparat für Positivkontrolle	Verwendetes Gewebepreparat für Isotypenkontrolle
LHCGR	Mamma, Vulva, Vagina	Mamma, Vagina	Mamma
VEGFR-2	Mamma, Plazenta, Vulva	Mamma	Mamma

Tabelle 9: Färbungen und Kontrollen

Im Falle der Färbung auf das LHCGR-Antigen konnte nicht konsequent ein einziges Gewebe als Positivkontrolle verwendet werden, da nicht ausreichend Gewebepreparate der Mamma zur Verfügung standen. Daher wurde in einem Färbeablauf die zu Beginn mit getestete und für valide befundene Positivkontrolle Vagina herangezogen.

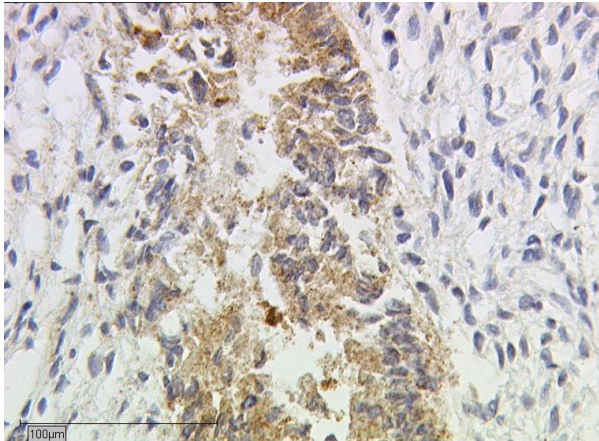


Abbildung 6: Positivkontrolle LHCGR
(Endometrium)

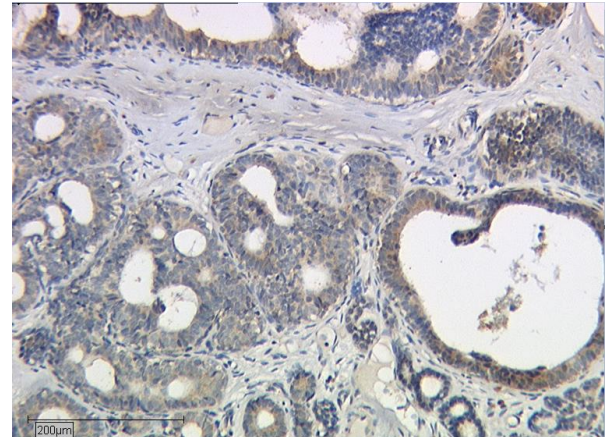


Abbildung 7: Positivkontrolle LHCGR (Mamma)

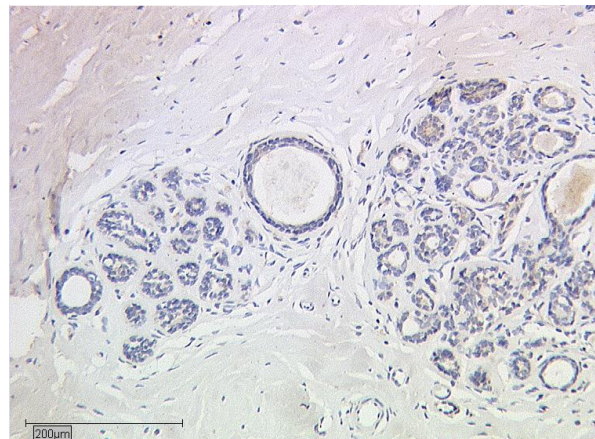


Abbildung 8: Positivkontrolle VEGFR2 (Mamma)

2.1.3.3 *Lichtmikroskopische Auswertung*

Im Anschluss an die Färbung wurden die Gewebeschnitte lichtmikroskopisch (Diaplan, Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar) untersucht. Das Tumorgewebe wurde zu diesem Zweck zunächst bei 10facher und anschließend bei 25facher Vergrößerung betrachtet. Auch die mitgeführten Positivkontrollen wurden auf diese Weise lichtmikroskopisch begutachtet. Die Expression der Antigene in den Schnitten wurde nach dem semiquantitativen IRS Score beurteilt [74]. In der Originalpublikation wurde die Anwendung des IRS für Östrogenrezeptoren in Mammakarzinomen verwendet. Es wird zunächst die Intensität der Färbung mit einem

Zahlenwert von 0-3 bewertet und dann der Anteil der gefärbten Zellen im Schnitt mit einem Zahlenwert von 0-4 beurteilt. Die beiden Werte werden anschließend miteinander multipliziert. Je höher das erhaltene Produkt, desto stärker ist das untersuchte Antigen in der Gewebeprobe exprimiert.

Intensität der Färbung		x	Anteil der gefärbten Zellen	
0	Keine Färbereaktion		0	0% der Zellen
1	Schwache Färbereaktion	1	1-10% der Zellen	
2	Mäßige Färbereaktion	2	11-50% der Zellen	
3	Starke Färbereaktion	3	51-80% der Zellen	
		4	81-100% der Zellen	
= IRS				
0		Keine Expression		
1-3		Geringe Expression		
2-8		Mäßige Expression		
9-12		Starke Expression		

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Auswertung immunhistochemischer Färbungen mithilfe des Immunreactive Scores)

In der Originalpublikation wurde die Anwendung des IRS für Östrogenrezeptoren in Mammakarzinomen verwendet. Es wird zunächst die Intensität der Färbung mit einem Zahlenwert von 0-3 bewertet und dann der Anteil der gefärbten Zellen im Schnitt mit einem Zahlenwert von 0-4 beurteilt. Die beiden Werte werden anschließend miteinander multipliziert. Je höher das erhaltene Produkt, desto stärker ist das untersuchte Antigen in der Gewebeprobe exprimiert. Jeder einzelne Schnitt wurde mindestens zweimalig beurteilt.

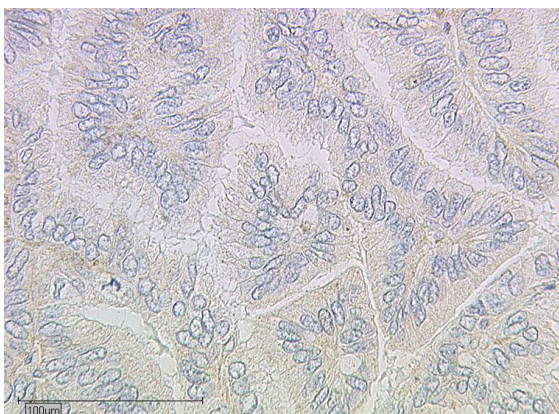


Abbildung 9: VEGFR2 - Färbeintensität 1

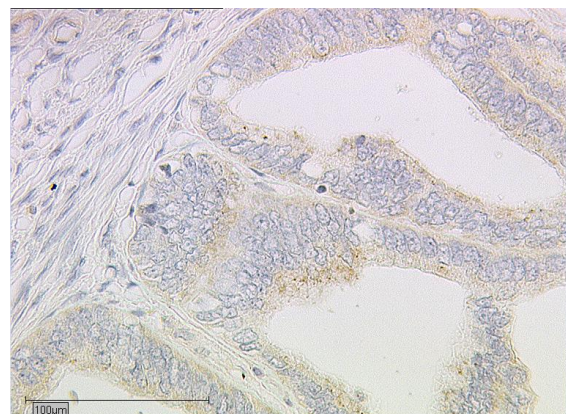


Abbildung 10: VEGFR2 - Färbeintensität 2

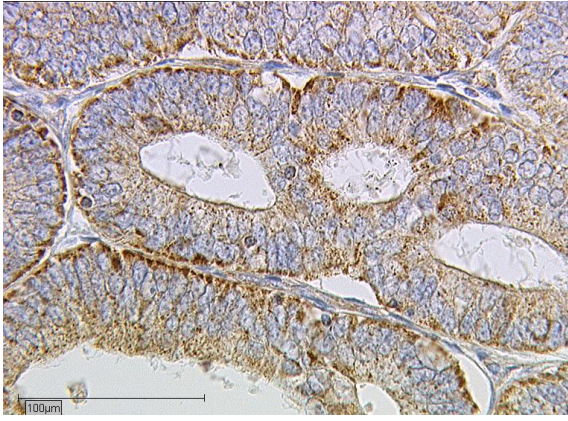


Abbildung 11: VEGFR2 - Färbeintensität 3

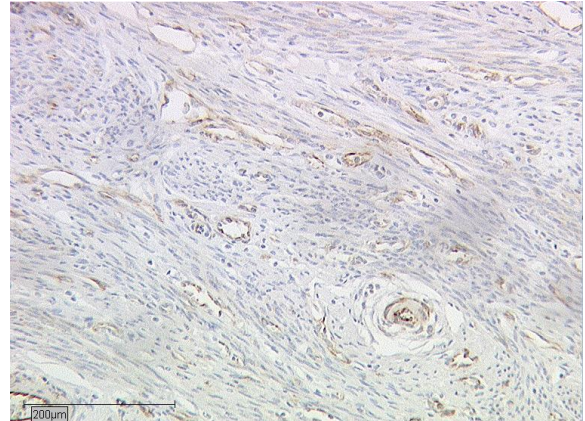


Abbildung 12: VEGFR2 – Endotheliale
Anfärbung

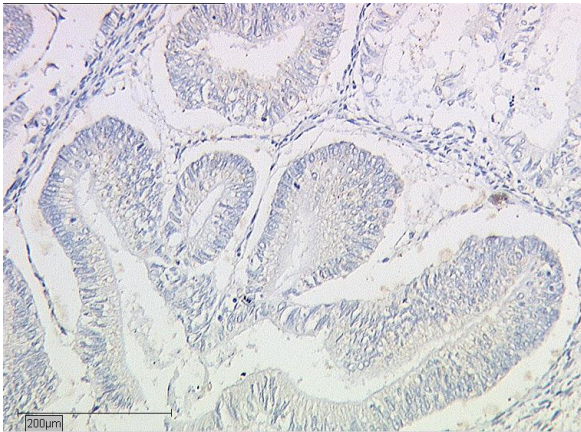


Abbildung 13: LHCGR - Färbeintensität 1

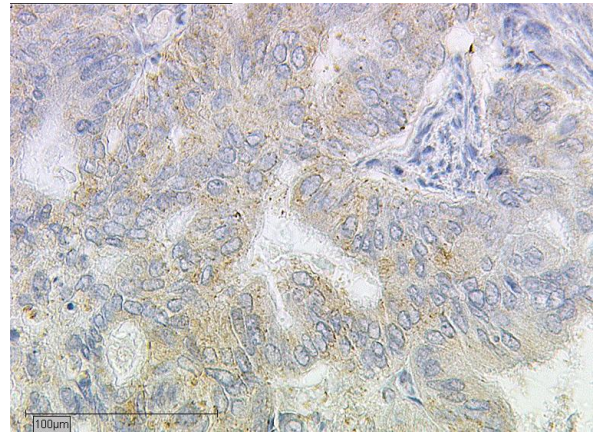


Abbildung 14: LHCGR - Färbeintensität 2

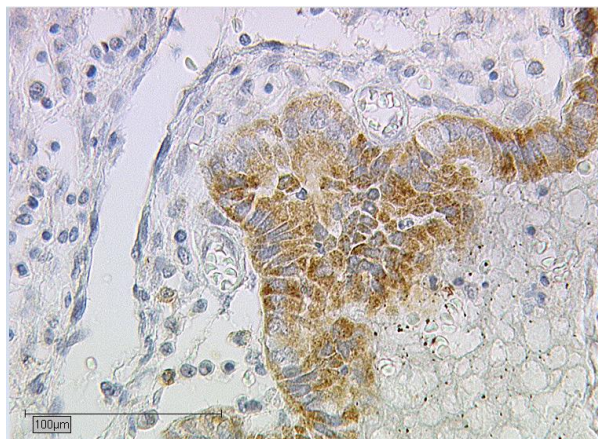


Abbildung 15: LHCGR - Färbeintensität 3

2.1.3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences), SPCC Inc. Headquarters, Chicago, USA, Version 25.0 für Windows.

Für jede untersuchte Fragestellung wurden die Samples auf Normalverteilung getestet und entsprechend des Ergebnisses ein parametrischer Test für normalverteilte Daten bzw. ein nicht-parametrischer Test für nicht-normalverteilte Daten ausgewählt. Die Daten wurden mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf ihre Normalverteilung untersucht, wobei bei einer Signifikanz von $<0,001$ die Daten nicht normalverteilt waren. Eine Normalverteilung ergab sich lediglich in den gruppierten Daten, die das Alter der Patientinnen beschrieben und denjenigen Daten, die sich mit der Überlebenszeit befassten. In diesen beiden Fällen wurde der unverbundene T-Test für die Beschreibung quantitativer Zielgrößen zum Vergleich zweier Variablen genutzt. Für die übrigen Datengruppen wurden zum Vergleich von zwei Variablen für qualitative Zielgrößen der Chi²-Test und für quantitative Zielgrößen der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Um ein Merkmal in mehr als 2 Gruppen zu beschreiben wurde bei den nicht-normalverteilten Daten der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Um Aussagen über das Überleben der Patientinnen zu treffen, wurde eine Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Für Korrelationen wurde der Spearman-Rho-Test herangezogen. Die dargestellten Tests wurden bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

Nicht-parametrische Tests sind weniger sensitiv als die parametrischen Tests. Bei einer sehr großen Fallzahl, wie in diesem Fall von $n = 203$ sind parametrische Tests trotzdem anwendbar, da sie unter dieser Bedingung robust gegenüber Verletzungen der Normalverteilung sind. In der vorliegenden Arbeit wurde dennoch zugunsten einer einheitlicheren und korrekteren statistischen Analyse die Auswahl des richtigen Tests entsprechend der Normalverteilung vorgenommen.

2.2 Real-Time PCR

Um die Expression verschiedener Markergene in endometrioiden Adenokarzinomen zu untersuchen, wurden humane kanzeröse Zelllinien kommerziell erworben und kultiviert. Aus diesen Zelllinien wurde RNA isoliert und über Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die gewonnene cDNA konnte anschließend in die Real-Time PCR eingesetzt werden. Als Referenzgewebe für die Real-Time PCR dienten Gewebeproben gesunden Endometriums, aus denen Stromazellen isoliert wurden und deren RNA auf dieselbe Weise isoliert und in cDNA transkribiert wurde, wie bei den Tumorzelllinien. Für die Untersuchung der Genexpression wurden kommerziell erworbene TaqMan® Primer eingesetzt. Die Auswertung wurde mit der Software des Real-Time PCR-Gerät durchgeführt.

2.2.1 Kulturmedien und Subkultivierung

2.2.1.1 Kulturmedien

Basierend auf Literaturrecherche etablierter Zelllinien zur Forschung an endometrioiden Karzinomen wurden die Linien AN3CA, HEC-1-A, HEC-1-B, KLE, RL-95-2 für diese Arbeit ausgewählt. Die aufgeführten Zelllinien wurden von ATCC (Manassas, VA, USA), Ishikawa von ECACC (Salisbury, UK) käuflich erworben. Die von den Herstellern zur Verfügung gestellten Informationen sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Zelllinien AN3CA, HEC-1-A, HEC-1-B, KLE und RL-95 stammen jeweils von Patientinnen aus Kaukasien, während Ishikawa von einer asiatischen Spenderin gewonnen wurde. Darüber hinaus fällt auf, dass die kaukasischen Spenderinnen zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme für die Zelllinien zwischen 55 und 71 Jahren alt waren, während die Spenderin der Linie Ishikawa deutlich jünger, nämlich 39 Jahre alt war.

Zelllinie	Tumorhistologie	Alter der Spenderin [Jahre]	Ethnische Herkunft der Spenderin	Depositor	Charakteristik der Zelllinie
AN3CA	Adenokarzinom	55	Kaukasisch	CJ Dawe	Isoliert aus metastatischen Läsionen in Lymphknoten
HEC-1-A	Adenokarzinom	71	Kaukasisch	H Kuramoto	Zellen von gut differenzierten Adenokarzinomen (Grad II), exprimiert PDGF und c-fos, tumorigen in Nacktmäusen
HEC-1-B	Adenokarzinom	71	Kaukasisch	H Kuramoto	Stammt von HEC-1-A ab, abgeflachtes Wachstum tumorigen in Nacktmäusen, diploid bis tetraploid
Ishikawa	Adenokarzinom	39	Asiatisch	A Taylor	Kanzerogen in Nacktmäusen, exprimiert ER und PR
KLE	Adenokarzinom	64	Kaukasisch	GR Richardson	Tumorigen in Nacktmäusen, Zellen weisen Mikrovilli und junctionale Komplexe auf, Drüsenformation wurde nicht beobachtet
RL-95	Karzinom	65	Kaukasisch	DL Way	Exprimiert ER, prozessiert α -Keratin, Zellen haben junctionale Komplexe und oberflächliche Mikrovilli

Tabelle 11: Charakteristika der verwendeten Zelllinien endometrioider Adenokarzinome

2.2.1.2 Subkultivierung

Von jeder Zelllinie wurden Subkulturen angelegt, die in Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert wurden. Entsprechend der Herstellerangaben wurde für die Zelllinien AN3CA, HEC-1-A, HEC-1-B und RL-95 das Nährmedium DMEM verwendet und 1% Penicillin / Streptomycin hinzugegeben, um Kontaminationen zu vermeiden. DMEM enthält hohe Konzentrationen an Glukose, Vitaminen und Aminosäuren und ist daher für das Wachstum von Säugetierzellen geeignet. Die Zelllinie KLE dagegen wurde DMEM-F12 mit 10% FCS und 1% Penicillin / Streptomycin kultiviert. In DMEM-Ham's F12 sind zusätzlich Ham's F12. Da hier aber keine Proteine, Lipide oder Wachstumsfaktoren enthalten sind, ist der Zusatz von FCS nötig [127]. Das Nährmedium wurde je nach Wachstumsprogress der Kultur alle 3-7 Tage erneuert und die Kultur nach Bedarf gesplittet, wenn sich ein konfluierender Monolayer auf dem Flaschenboden gebildet hatte, Dazu wurde das in der

Flasche enthaltene Nährmedium abgekippt und die Zellen mit einigen Millilitern PBS gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Flasche abzulösen, wurde für jede Kultur 3 ml Trypsin aufgezogen und über die Zellen gegeben. Die Zellkultur in Trypsin wurde anschließend für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen an der Kulturflasche („shake-off“) löste sich der Zellfilm vom Flaschenboden. Anschließend wurden 7 ml Nährmedium hinzugegeben, um die Enzymwirkung des Trypsins zu stoppen. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Lösung in der Pipette wurden die Zellen mit dem Nährmedium gemischt und 5 ml davon in einer neuen Kulturflasche ausgesät.

2.2.2 Isolation von Stromazellen aus gesundem Endometrium

Um eine Aussage über die veränderte Expression von Genen in kanzerös verändertem Endometrium machen zu können ist ein Vergleich mit der Expression der untersuchten Gene im gesunden Gewebe nötig. Dazu wurden Gewebeproben gesunder prämenopausaler Patientinnen entnommen, die sich im Rahmen einer Fertilitätsdiagnostik in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München vorstellten. Die Patientinnen wurden ausführlich über die Prozedur der Gewebeentnahme und deren Zweck aufgeklärt. Entsprechend der Deklaration von Helsinki 2008 [128] zu den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen gaben sie ihre schriftliche Einwilligung. Das entsprechende Ethikvotum trägt die Kennziffer LMU 148-12.

Alle entnommenen Gewebeproben wurden pathologisch untersucht und nur dann als Referenzgewebe verwendet, falls eine Pathologie eindeutig ausgeschlossen werden konnte. Die Zellisolation aus den Gewebepreparaten wurde nach den bereits etablierten Protokollen von Fernandez-Shaw [129] et al. und Zhang et al. [130] vorgenommen. Das Endometrium wurde steril gewonnen und in DMEM-F12 (10%FCS, 1% P/S) als Medium gewonnen. Entsprechend der Empfehlung [129] wurde das Gewebe entweder direkt aufgearbeitet oder im Medium bei 4°C gekühlt und über Nacht belassen, um am nächsten Tag weiter damit zu verfahren. Initial wurden die entnommenen Präparate mithilfe eines scharfen Skalpell in 2-3 mm große Stücke zerkleinert und anschließend für 2h bei 37°C mit Collagenaselösung (1mg/ml Collagenase in DMEM) inkubiert, um eine enzymatische Digestion zu erreichen. Um unerwünschtes muköses Material und noch bestehende größere Zellverbände zu entfernen, wurde die Suspension in einem 250 µm Filtersieb gefiltert. In einem zweiten Schritt wurden die stromalen Zellen von den glandulären Verbänden getrennt, indem die flüssige Phase des zuvor gewonnenen Filtrats in ein 40 µm Zellsieb gegeben wurde. Die stromalen Zellen konnten das Sieb aufgrund ihrer geringeren Größe passieren, während die glandulären Strukturen im Sieb verblieben. Zur Aufarbeitung der stromalen Zellen wurde das Filtrat für 10 Minuten bei 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abpipettiert und verworfen. Aus den

stromalen Zellen wurde dann nach der Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.3) RNA isoliert. Dazu wurden die Zellpellets zunächst mit 1 ml Trizol LS gelöst und anschließend nach dem erarbeiteten Protokoll für die übrigen Zellkulturen fortgefahren. Da direkt im Anschluss an die Zellisolation eine RNA-Isolierung erfolgte, konnte auf die Kultivierung der endometrioiden Zellen verzichtet werden.

2.2.3 RNA Isolierung

Die RNA aus den verschiedenen Zelllinien und dem Referenzgewebe wurde nach der Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Das fertige Reagenz denaturiert die Proteine und trennt die übrigen Zellbestandteile ab. Durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation kommt es zu einer Phasenbildung, deren oberste Phase die Gesamt-RNA der eingesetzten Zellen enthält. Mit Isopropanol kann die RNA gefällt werden. Daran schließt sich ein Waschvorgang mit Ethanol an. Um die Konzentration der RNA in den gewonnenen Proben zu bestimmen, wurde eine photometrische Messung eingesetzt.

2.2.3.1 RNA-Isolierung nach der Phenol-Chloroform-Methode

Das Nährmedium, in dem die kanzerösen Ziellinien kultiviert wurden, wurde zu Beginn aus den Kulturflaschen abgekippt und die am Boden haftenden Zellverbände mehrfach mit PBS gewaschen. Mit 1-2ml Trizol LS wurden die Zellen abgelöst, mit einem Zellscriper unterstützend mechanisch vom Boden der Zellkulturflaschen entfernt und in einen Falcon-Behälter überführt. Bei Trizol handelt es sich um ein fertiges einphasiges Reagenz, das Phenol und Guanidin-Isothiocyanat kombiniert. Durch diese beiden Reagenzien wurden die Zellen aufgebrochen und die enthaltenen Proteine denaturiert [131].

Die im Folgenden dargestellte Methode wurde einzeln für jede Zellkultur sowie für die stromalen Endometriumzellen der gesunden Spenderinnen gleichermaßen durchgeführt. Pro ml Trizol LS wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt. Das Zelllysat wurde anschließend kräftig durchmischt, gevortext und je 1ml in Eppendorfgefäße umgefüllt. Das Chloroform trennt das zuvor mit Trizol LS erzeugte Homogenat in verschiedene Phasen. Zur Unterstützung der Phasentrennung wurden die Eppendorf-Tubes gekühlt bei 4°C und 12.000xg für 12 Minuten zentrifugiert. So bildeten sich drei Phasen in den Eppendorf-Tubes: Eine rosafarbene organische Phase am Boden der Tubes in der sich die Proteine sammelten; eine mittlere weißliche Interphase und oben aufliegend eine farblose Phase, in welcher die RNA gelöst war. Diese klare obere Phase wurde mit einer Eppendorf-Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurde jeweils 1 ml Isopropanol zugegeben, um die Nukleinsäuren selektiv zu fällen. Die Lösung wurde nochmals gemischt und über Nacht bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Am folgenden Tag wurden die Tubes bei 4°C und 12.000xg für 15 Minuten zentrifugiert, um die RNA zu fällen. Es bildete sich ein teilweise schlecht zu erkennendes Zellpellet am Boden der Tubes, in dem die Gesamt-RNA der Zellen erwartet

wurde. Der klare Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Die Pellets wurden durch Zugabe von 1ml 70%igem Ethanol gewaschen. Dazu wurden die Eppendorf-Tubes erst geschüttelt und anschließend bei 4°C und 12.000xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde erneut möglichst vollständig entfernt und das Pellet anschließend an der Luft getrocknet. Anschließend wurde den Pellets 20 µl Aqua iniectionabile hinzugefügt, in dem die Pellets gelöst wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gewonnene RNA bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.3.2 Photometrische Messung der RNA Konzentration

Zur späteren reversen Transkription war es notwendig die genaue Konzentration der isolierten RNA zu kennen. Dazu wurde ein Photometer verwendet. Das Gerät wurde zunächst mittels einer Leerprobe in Form von 4 µl Wasser kalibriert. Es wurde Wasser gewählt, da es sich dabei auch um das Lösungsmedium der zu untersuchenden RNA handelte. Anschließend wurden jeweils 4 µl der RNA auf den Applikator des Photometers gegeben und die Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Aus der optischen Dichte der Messung bei 260 nm kann die Konzentration der Probe errechnet werden, wobei der Quotient aus den optischen Dichten der Proben bei 260 nm und 280 nm die Reinheit des RNA-Gehalts gegenüber der Verunreinigung durch Proteine angibt. Wenn der Quotient zwischen 1,7 und 2,0 lag, wurden die Proben zur weiteren Verarbeitung akzeptiert.

2.2.4 Reverse Transkription

Mithilfe der Reversen Transkription wurde die Umschreibung der RNA in Erstrang-cDNA vorgenommen. Für diesen Schritt wurde der SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix der Firma invitrogen entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Das Kit enthält bereits die für die Umschreibung benötigten Reagenzien. Bei der im „Enzyme Mix“ des Kits enthaltenen Reversen Transkriptase (RT) handelt es sich um eine Version der M-MLV RT, die eine geringere RNase Aktivität aufweist und hitzebeständiger ist [132], [133]. Das Enzym kann für DNA-Synthesen zwischen 45 und 55°C verwendet werden und zeigt eine höhere Spezifität und DNA-Ausbeute und darüber hinaus mehr transkribierte Produkte in voller Länge [134]. Außerdem ist in dem „Enzyme Kit“ ein rekombinanter RNase-Inhibitor, der verhindert, dass die RNA während der Umschreibung degradiert wird. Im Kit fanden sich zudem Oligo(dT)₂₀-Primer, die relativ spezifisch an das eukaryotische Poly-A-Ende der mRNA binden. Zur besseren Anlagerung der Primer an die Einzelstrang-RNA war im Kit ein „Annealing Buffer“ vorgesehen. Im „Reaction“ Mix des Kits waren die dNTPs und der Puffer MgCl₂ zur Stabilisierung der RT enthalten.

Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 4 µg RNA verwendet. Da aus der photometrischen Bestimmung die RNA-Konzentration der Proben bekannt war, konnte rechnerisch die zu pipettierende Menge bestimmt werden. Die Proben wurden jeweils auf insgesamt 6 µl

aufgefüllt und gevortext. Zur isolierten RNA wurde jeweils 1 µl des des Oligo(dT)₂₀-Primers und 1 µl des „Annealing Buffers“ hinzugegeben. Anschließend wurden die Röhren gevortext und bei 65°C für 5 Minuten inkubiert, um die Doppelstränge aufzubrechen. Nach abgelaufener Zeit wurden die Proben für mindestens 1 Minute auf Eis gelegt und dann im Kurzprogramm des Geräts zentrifugiert. Es wurden 10 µl des „Reaction Mix“ und 2 µl des „Enzyme Mix“ hinzugefügt, kurz gevortext und im Kurzprogramm zentrifugiert bevor die Proben bei 50°C für 50 Minuten inkubiert wurden. Die Röhren wurden für 5 Minuten bei 85°C in den Heizblock eingestellt, um die Reaktion zu beenden. Im Anschluss an die erfolgte Transkription wurde die cDNA entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

2.2.5 Real-Time PCR

Während die bis dahin durchgeführten Schritte mehr vorbereitender Natur waren, stellt die im Folgenden beschriebene Methode das Kernstück der dargestellten Untersuchung auf Markergene dar.

Die Menge eines bestimmten DNA-Abschnitts in einer Probe kann sowohl relativ als auch quantitativ durch die Real-Time PCR bestimmt werden. Dazu erfolgt zunächst eine Amplifikationsreaktion, bei der die DNA-Abschnitte in mehreren nacheinander ablaufenden Zyklen exponentiell vervielfältigt werden. Für die Detektion werden dabei fluoreszierende Partikel in die amplifizierte DNA eingebaut. In jedem Zyklus der PCR werden die Fluoreszenzsignale „in Echtzeit“ gemessen, wodurch letztlich Rückschlüsse auf die ursprünglich in der Lösung enthaltene Menge an DNA möglich ist. In Abhängigkeit von dieser ursprünglichen Anzahl wird ein Schwellenwert erreicht, der auch eine absolute Quantifizierung, als Anzahl der Kopien pro Zyklus, ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurden TaqMan-Sonden verwendet. Es waren also im Reaktionsansatz nicht interkalierende fluoreszenzmarkierte Moleküle enthalten, sondern stattdessen sogenannte Hydrolyse-, oder TaqMan-Sonden. Diese Sonde ist spezifisch für das zu untersuchende Gen und ist an ihrem einem Ende an das „Quencher“-Molekül und am anderen Ende an einen „Reporter“-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Das „Quencher“-Molekül unterdrückt die fluoreszierenden Eigenschaften solange bis die Sonde an die gesuchte Stelle an der DNA bindet. Die zusätzliche 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase das Reporter-Molekül spaltet dann während der Synthese des Gegenstrangs das „Reporter“-Molekül ab und dieses beginnt so zu fluoreszieren. So erreicht die TaqMan-PCR eine deutlich höhere PCR-Effizienz durch die Gen-spezifischen Primer, von 100% ± 1%.

Die dargestellten Reaktionsschritte für jedes Gen und jede Zelllinie wurden vierfach ausgeführt, um eine bessere Verlässlichkeit der Ergebnisse zu ermöglichen. Für die Real-Time PCR wurde eine 96-Well-Platte mit Barcode verwendet. In jede Vertiefung wurden 2µl der hergestellten cDNA gegeben. Dann wurde ein „MasterMix“ für jedes Gen entsprechend der

Anzahl der zu untersuchenden Proben angesetzt. Der verwendete TaqMan PCR Mastermix enthält die DNA Polymerase, die benötigten dNTPs mit dUTPs und Uracil-N-Glykosylase, die bei nachfolgenden Amplifikationen aus PCR-Produkten eine Kontamination minimieren sollen. Darüber hinaus findet sich im MasterMix ein Puffer zur Optimierung der Amplifikationsbedingungen.

Es wurden für jede Reaktion 10µl TaqMan PCR MasterMix, 7µl aqua iniectionabile und 1µl des spezifischen Primers in jeweils ein Eppendorf-Tube pipettiert. Anschließend wurde der angesetzte MasterMix gevortext und im Kurzprogramm zentrifugiert. In jedes Well der vorbereiteten Platte wurden 18 µl des MasterMix zu 2µl der cDNA hinzugegeben. Die so vorbereitete Well-Platte wurde mittels der speziellen Abdeckfolie versiegelt und nochmals bei 300 xg für 1 Minute zentrifugiert, bevor sie in das PCR-Gerät eingelegt wurde. Für den Ablauf der PCR Zyklen wurde folgendes Programm gewählt: Zunächst erfolgte 1 Zyklus bei 95°C für 20 sec, als initiale Denaturierung. Anschließend folgten 40 Zyklen, in denen die Temperatur jeweils abwechselnd 3 sec bei 95°C und 30 sec bei 60°C lag. Am Ende von jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz durch das Gerät gemessen und daraus die relative Genquantifizierung über die enthaltene Software (SDS V.1.3.1) dargestellt (siehe zur Methode der Auswertung 2.2.6). Als Kontrolle wurde das Gen 18S gewählt, da es eine relativ hohe und stabile Genexpression [135] in den untersuchten Geweben aufweist. Als Gewebereferenz wurden stromale Endometriumzellen gesunder Patientinnen herangezogen (siehe 2.2.2), deren Zellen zuvor isoliert wurden. Alle gemessenen Genexpressionslevel der Adenokarzinom-Zelllinien wurden in Relation zu diesem Referenzgewebe betrachtet.

Gen	Name	Chromosomale Lokalisation	Charakterisierung	Funktion
GPER	G-protein coupled estrogen receptor	7p22.3	G-Protein gekoppelter Rezeptor für den Bindungspartner Östrogen	Bindungspartner und Mediator zellulärer Effekte für Östrogen und Östrogenderivate
Genspezifischer Primer: Hs_00173506_m1				
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2	4q12	Vermittelt die VEGF-induzierte endotheliale Proliferation, Zellüberleben, Migration und Morphogenese	Entscheidende Funktion in der Angiogenese und Proliferation
Genspezifischer Primer: Hs_00911700_m1				
MIG7	Migration inducing protein 7	1p22.1	Zellkommunikation	Auftreten in embryonalen/fetalen Zellen und epithelialen Krebszellen
Genspezifischer Primer: Hs_00706358_m1				
LHCGR	Luteinizing hormone/c horiogona dotropin receptor	2q16.3	G-protein gekoppelter Rezeptor	Steroidhormonrezeptor als Regulator in der sexuellen Differenzierung und Sexualfunktionen
Genspezifischer Primer: Hs_00174885_m1				
ESR1	Estrogen receptor 1	6q25	Hormonbindener ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor	Bindungspartner von DNA, Hormonen und Aktivierung der Transkription
Genspezifischer Primer: Hs_01046816_m1				
Her-2	Human epidermal growth factor receptor 2	17q12.3	Proto-Onkogen	Bei Überexpression Entwicklung und Progression aggressiver maligner Tumoren
Genspezifischer Primer: Hs_00170433_m1				
PGR	Progesterone receptor	11q22.1	Steroidrezeptor und Bindungspartner für Progesteron	Mediation der physiologischen Effekte von Progesteron, entscheidend in den reproduktiven Funktionen
Genspezifischer Primer: Hs_174860_m1				

Tabelle 12: Charakterisierung der verwendeten Marker-Gene und Taq-Man Real-Time PCR Primer (Applied BioSystems, Foster City, Kalifornien (USA))

2.2.6 Auswertung

Mit Hilfe der dem PCR-Gerät zugehörigen SDS-Software wurden die während der PCR generierten Fluoreszenzsignale ausgewertet. Das Programm ermittelt die CT-, Δ CT-, $\Delta\Delta$ CT-Werte und bildet daraus in einem zweiten Schritt unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Formel die Werte der relativen Genquantifizierung [76]. Die erzeugten Daten wurden in Microsoft Excel exportiert und Graphen daraus erstellt. Wenn der relative Genexpressionswert (RQ) > 1 war, wurde das untersuchte Gen im Vergleich zum Kontrollgewebe als hochreguliert eingestuft. Wenn der RQ < 1 lag, wurde das Gen dagegen als relativ zum gesunden Endometrium herabreguliert eingeschätzt.

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Untersuchung an Primärtumorgewebe

Im Folgenden werden die spezifischen Tumorcharakteristika und klinischen Daten der Patientinnen in Relation zur Expression der Rezeptoren VEGFR2 und LHCGR dargestellt.

3.1.1 Deskriptive Statistik der VEGFR2 und LHCGR- Expression im Kollektiv

Für die VEGFR2-Expression ergab sich im untersuchten Tumorkollektiv ein Mittelwert des IRS von 4,03, für die LHCGR-Expression ein Mittelwert von 2. Für beide Untersuchungen wurde die Bandbreite der Punktwerte zwischen minimal 0 und maximal 12 vergeben.

	Gesamtanzahl [n]	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	Mittelwert (IRS)	Median (IRS)	Std- Abweichung
VEGFR2	203	0	12	4,03	3	3,265
LHCGR	203	0	12	2,38	2	2,409

Tabelle 13: Kennzahlen der VEGFR2- und LHCGR-Expression im Kollektiv

IRS	0	1	2	3	4	6	8	9	12
VEGFR2 [n]	26	26	32	25	27	20	35	3	9
LHCGR [n]	54	34	40	23	28	8	15	1	0

Tabelle 14: VEGFR2 und LHCGR-Expression nach IRS-Wert

Als Cutoff-Wert für eine positive Expression wurde für VEGFR2 ein Wert von IRS=3 gewählt, da es sich bei diesem Wert um den Median der Punktwerte handelte. Ein IRS von ≤ 3 wurde entsprechend als „keine Expression“ von VEGFR2 gewertet, ein IRS > 3 als „positive Expression“. Für die Untersuchung des LHCGR ergab sich ein Median des IRS von 2, daher wurde ein IRS für eine Tumorprobe von ≤ 2 als „negativ“, ein IRS > 2 als „positiv“ bezüglich des Auftretens des Rezeptors im Gewebe gewertet. Diese vereinfachende Darstellung soll helfen aussagekräftige Ergebnisse zu generieren.

3.1.2 Alter bei Diagnose

Die Daten zur Altersverteilung der Patientinnen waren dem Kolmogorov-Smirnov-Test zufolge normalverteilt. Daher wurde hier für die statistische Analyse der unabhängige T-Test zum Vergleich der Mittelwerte angewendet.

VEGFR2 Status	Anzahl [n]	Mittelwert Alter [y]	Standardabweichung
negativ	108	65,3	1,00
positiv	95	65,3	1,02

Tabelle 15: VEGFR2-Expression bezogen auf das Alter der Patientinnen

Der T-Test für die Mittelwertgleichheit ergab einen p-Wert für p von 0,984 und spricht daher für annähernd gleiche Mittelwerte und daher für keinerlei Unterschied des Alters bei Diagnose bezüglich der Expression von VEGFR2.

LHCGR Status	Anzahl [n]	Mittelwert Alter [y]	Standardabweichung
negativ	127	66,0	10,31
positiv	76	64,2	9,97

Tabelle 16: LHCGR-Expression bezogen auf das Alter der Patientinnen

Für die LHCGR Expression ergaben sich sehr ähnliche Mittelwerte für das Alter bei Diagnose: Der p-Wert ergab $p=0,634$. Der LHCGR-Status hat damit keinen Einfluss auf das Diagnosealter.

3.1.3 Tumorausdehnung

Zwischen der Expression von VEGFR2 und der Tumorausdehnung konnte keine Korrelation gezeigt werden. Die asymptotische Signifikanz nach dem Chi-Quadrat Test nach Pearson betrug für das T-Stadium und die VEGFR2 – Expression $p=0,645$. Darüber hinaus zeigte sich kein Einfluss der VEGFR2 Expression auf die myometrane Infiltrationstiefe bei isolierter Betrachtung der T1-Subklassifikationen bezogen auf den IRS. Der unverbundene T-Test für den Mittelwert-Vergleich der VEGFR2-Expression zwischen Tumoren der Größe $pT<1b$ und $pT>1b$ (die Hälfte des Myometriums überschreitend) ergab einen p-Wert von 0,353 und ist damit nicht signifikant. Die VEGFR2-Expression zeigte weiterhin keinen Zusammenhang mit der Überschreitung der Organgrenze Uterus: Für den Mittelwertvergleich ergab der unverbundene T-Test beim Vergleich des VEGFR2-Status für $pT<2$ und $pT>2$ einen p-Wert von 0,282 und ist damit statistisch nicht signifikant.

	VEGFR2 negativ	VEGFR2 positiv	Gesamt [n]
T1 [n]	86	80	166
T2 [n]	9	6	15
T3 [n]	11	6	17
T4 [n]	2	3	5
Gesamt [n]	108	95	203

Tabelle 17: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit des T-Stadiums

Der LHCGR-Trägerstatus hat keinen Bezug zur Tumorausdehnung: Im Test Chi-Quadrat nach Pearson ergab sich eine asymptotische zweiseitige Signifikanz von $p=0,993$. Die LHCGR-Expression zeigte im unverbunden T-Test keine Korrelation mit der myometranen Infiltrationstiefe ($pT<1b$ versus $pT>1b$) mit $p=0,423$ oder der Organgrenzen-Überschreitung ($pT<2$ versus $pT>2$) mit $p=0,890$.

	LHCGR negativ	LHCGR positiv	Gesamt [n]
T1 [n]	104	62	166
T2 [n]	9	6	15
T3 [n]	11	6	17
T4 [n]	3	2	5
Gesamt [n]	127	76	203

Tabelle 18: LHCGR – Expression in Abhängigkeit des T-Stadiums

3.1.4 Nodalstatus

Es konnte im vorliegenden Kollektiv kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und der VEGFR2- oder LHCGR-Expression gezeigt werden. Die asymptotische Signifikanz im Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigte in der Untersuchung für den positiven VEGFR2-Status einen p-Wert von 0,979 und in derjenigen für den positiven LHCGR-Status einen p-Wert von 0,753.

	VEGFR2 negativ	VEGFR2 positiv	Gesamt [n]
N0 [n]	69	62	166
N1 [n]	6	5	11
NX [n]	33	28	61
Gesamt [n]	108	95	203

Tabelle 19: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus

	LHCGR negativ	LHCGR positiv	Gesamt [n]
N0 [n]	81	50	131
N1 [n]	6	5	11
NX [n]	40	21	61
Gesamt [n]	108	95	203

Tabelle 20: LHCGR – Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus

3.1.5 Metastasenstatus

Es konnte eine Korrelation zwischen der Expression von VEGFR2 und der Metastasierung gezeigt werden. Der Chi-Quadrat Test nach Pearson zeigte eine asymptotische Signifikanz von 0,034. Darüber hinaus zeigte sich auch eine „borderline“-Korrelation der LHCGR-Expression mit der Metastasierung bei einem p-Wert von 0,078. In unserem Kollektiv fanden sich lediglich drei Patientinnen mit einem metastasierten Endometriumkarzinom, während der Metastasenstatus bei 103 Patientinnen nicht erhoben wurde bzw, nicht nachvollziehbar war. Daher ist die Bedeutung dieser deutlich limitiert.

	VEGFR2 negativ	VEGFR2 positiv	Gesamt [n]
M0 [n]	46	51	97
M1 [n]	0	3	3
MX [n]	62	41	103
Gesamt [n]	108	83	203

Tabelle 21: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit des Metastasenstatus

	LHCGR negativ	LHCGR positiv	Gesamt [n]
M0 [n]	62	35	97
M1 [n]	0	3	3
MX [n]	65	38	103
Gesamt [n]	127	76	203

Tabelle 22: LHCGR – Expression in Abhängigkeit des Metastasenstatus

3.1.6 FIGO-Klassifikation

Weder das VEGFR2-Vorkommen, noch der Status des LHCGR in den Tumoren steht in Beziehung zu der FIGO-Stadieneinteilung. Für die Untersuchung einer Korrelation zwischen VEGFR2 mit der FIGO-Klassifikation ergab sich im Chi-Quadrat-Test nach Pearson ein p-Wert von $p=0,141$. Für die Korrelation von LHCGR mit dem FIGO-Stadium wurde ein p-Wert von 0,521 ermittelt.

	VEGFR2 negativ	VEGFR2 positiv	Gesamt [n]
FIGO I [n]	47	56	103
FIGO II [n]	41	26	67
FIGO III [n]	19	13	32
FIGO IV [n]	1	0	1
Gesamt [n]	108	95	203

Tabelle 23: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der FIGO-Klassifikation

	LHCGR negativ	LHCGR positiv	Gesamt [n]
FIGO I [n]	64	39	103
FIGO II [n]	41	26	67
FIGO III [n]	22	10	32
FIGO IV [n]	0	1	1
Gesamt [n]	127	76	203

Tabelle 24: LHCGR – Expression in Abhängigkeit der FIGO-Klassifikation

3.1.7 Grading

Das Grading gilt als prognostischer Faktor unabhängig von der TNM-Klassifikation oder dem FIGO-Staging. Es zeigte sich hier ein leichter Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen und der Expression des VEGFR2. Mit einem p-Wert von 0,067 im Chi-Quadrat-Test nach Pearson lässt sich allerdings nicht von einer statistisch signifikanten Korrelation sprechen. Der p-Wert nahe an der statistischen Signifikanz von $p=0,05$ kann in diesem Zusammenhang jedoch als „borderline“-Signifikanz betrachtet werden. Für den LHCGR-Status und das Grading konnte hingegen bei einem p-Wert von 0,223 keinerlei Bezug zueinander festgestellt werden.

	VEGFR2 negativ	VEGFR2 positiv	Gesamt [n]
G1 [n]	52	61	113
G2 [n]	43	25	68
G3 [n]	13	9	22
Gesamt [n]	108	95	203

Tabelle 25: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit des Gradings

	LHCGR negativ	LHCGR positiv	Gesamt [n]
G1 [n]	66	47	113
G2 [n]	44	24	68
G3 [n]	17	5	22
Gesamt [n]	127	76	203

Tabelle 26: LHCGR – Expression in Abhängigkeit des Gradings

3.1.8 Hormonrezeptorstatus

Die beiden nukleären Steroidrezeptoren ER α und ER β wurden auf ihr Auftreten im Tumorgewebe in Relation zur Expression des Angiogenese-vermittelnden Rezeptors VEGFR2 untersucht. Es zeigt sich, dass in Tumoren, in denen ER α exprimiert war, außerdem sowohl VEGFR2 als auch LHCGR stärker exprimiert war. Der p-Wert entsprach einer statistischen Signifikanz im Chi-Quadrat-Test nach Pearson von $p=0,025$ für die Korrelation mit VEGFR2 und $p=0,056$ für die Korrelation mit LHCGR.

Interessanterweise konnten diese Zusammenhänge für den anderen hier untersuchten Östrogenrezeptor der nukleären Steroidrezeptor-Familie nicht gezeigt werden: Für die ER β - und die VEGFR2-Expression konnte mit einem p-Wert von 0,653 keine statistische Signifikanz erhoben werden. Der ER β korrelierte auch nicht mit der Expression des Bindepartners der Hormone LH bzw. hCG, dem LHCGR ($p= 0,296$).

3.1.8.1 Östrogenrezeptorstatus

	VEGFR2 negativ	VEGFR2 positiv	Gesamt [n]
ERα negativ [n]	67	44	111
ERα positiv [n]	41	51	92
Gesamt [n]	108	95	203
ERβ negativ [n]	92	83	175
ERβ positiv [n]	16	12	28
Gesamt [n]	108	95	203

Tabelle 27: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der Östrogenrezeptoren ER α und ER β

	LHCGR negativ	LHCGR positiv	Gesamt [n]
ERα negativ [n]	76	35	111
ERα positiv [n]	51	41	92
Gesamt [n]	127	76	203
ERβ negativ [n]	107	68	175
ERβ positiv [n]	20	8	28
Gesamt [n]	127	76	203

Tabelle 28: LHCGR – Expression in Abhängigkeit der Östrogenrezeptoren ER α und ER β

3.1.8.2 Progesteronrezeptorstatus

Die Wirkung von Progesteron wird über die Rezeptoren PR-A und PR-B vermittelt, deren Korrelation mit VEGFR2 und LHCGR untersucht wurde. Die Expression von VEGFR2 hing weder mit dem Vorkommen von PR-A ($p=0,789$ im Chi-Quadrat-Test nach Pearson) noch mit demjenigen von PR-B ($p=0,273$ im Chi-Quadrat-Test nach Pearson) zusammen. Die über VEGFR2 vermittelte Vaskularisierung ist also unabhängig von der über PR-A oder PR-B vermittelten Progesteronwirkung.

Es ergab sich aber eine Relation zwischen PR-A und LHCGR-Expression, die eine statistische Signifikanz mit $p= 0,013$ (Chi-Quadrat-Test nach Pearson) zeigte. Damit besteht ein Zusammenhang zwischen diesen beiden hormonell vermittelten Signalwegen. Dieser bestätigte sich allerdings nicht für die Kaskade von PR-B: Mit $p=0,319$ nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson besteht keine Korrelation zwischen PR-B und LHCGR.

	VEGFR2 negativ	VEGFR2 positiv	Gesamt [n]
PR-A negativ [n]	60	51	111
PR-A positiv [n]	48	44	92
Gesamt [n]	108	95	203
PR-B negativ [n]	49	51	100
PR-B positiv [n]	59	44	103
Gesamt [n]	108	95	203

Tabelle 29: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der Progesteronrezeptoren PR-A und PR-B

	LHCGR negativ	LHCGR positiv	Gesamt [n]
PR-A negativ [n]	78	33	111
PR-A positiv [n]	49	43	92
Gesamt [n]	127	76	203
PR-B negativ [n]	66	34	100
PR-B positiv [n]	61	42	103
Gesamt [n]	127	76	203

Tabelle 30: LHCGR – Expression in Abhängigkeit der Progesteronrezeptoren PR-A und PR-B

3.1.8.3 Glycodelin A

Die Expression von VEGFR2 zeigte keinen Zusammenhang mit dem Vorkommen des negativ prognostischen Faktors Glycodelin A in Endometriumkarzinomen. Im vorliegenden Kollektiv lagen die Daten zur Expression von Glycodelin A über die Untersuchung mit einem polyklonalen Antikörper (Glycodelin A Poly) und einen monoklonalen Antikörper (Glycodelin A Mono) vor. Es zeigten sich für VEGFR2 weder unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers gegen Glycodelin A ($p=0,915$) noch unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers gegen Glycodelin A ($p=0,600$) Korrelationen.

Diejenigen Präparate, die bei Untersuchung mit dem monoklonalen Antikörper einen positiven Glycodelin A Status zeigten, korrelierten mit der Expression von LHCGR mit statistischer Signifikanz von $p= 0,018$ nach Chi-Quadrat-Test nach Pearson). Allerdings ergab sich diese Korrelation nicht für die mit dem polyklonalen Antikörper als positiv für Glycodelin A klassifizierten Tumoren ($p=01,65$ im Chi-Quadrat-Test nach Pearson). Unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers wurden 82 Tumoren als „Glycodelin A positiv“ eingeschätzt, während der monoklonale Antikörper nur 57 Tumoren als „positiv“ identifizierte. Es wurden mit dem polyklonalen Ansatz also numerisch mehr Präparate als positiv beurteilt.

	VEGFR2 negativ	VEGFR2 positiv	Gesamt [n]
Glycodelin-A-Mono negativ [n]	76	70	146
Glycodelin-A-Mono positiv [n]	32	25	57
Gesamt [n]	108	95	203
<hr/>			
Glycodelin-Poly negativ [n]	64	57	121
Glycodelin-Poly positiv [n]	44	38	82
Gesamt [n]	108	95	203

Tabelle 31: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der Glycodelinrezeptor-Expression

	LHCGR negativ	LHCGR positiv	Gesamt [n]
Glycodelin-A-Mono negativ [n]	84	62	146
Glycodelin-A-Mono positiv [n]	43	14	57
Gesamt [n]	127	76	203
<hr/>			
Glycodelin-Poly negativ [n]	71	50	121
Glycodelin-Poly positiv [n]	56	26	82
Gesamt [n]	127	76	203

Tabelle 32: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der Glycodelinrezeptor-Expression

3.1.9 Progressionsstatus

Im Kollektiv bestand keine Relation zwischen den untersuchten Markern VEGFR2 und LHCGR und einer Progression des Tumorleidens als Anzeichen einer erhöhten Tumoraggressivität. Insgesamt lagen 28 (13,8 %) Progressionsereignisse vor. Im Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergab sich ein p-Wert von 0,966 für eine mögliche Korrelation von der VEGFR2-Expression mit einem Progressionsereignis. Für die Untersuchung der Beziehung zwischen Progression und LHCGR-Expression ergab sich im Chi-Quadrat-Test nach Pearson ein p-Wert von 0,839.

	VEGFR2 negativ	VEGFR2 positiv	Gesamt [n]
Keine Progression [n]	93	82	175
Progressionsereignis[n]	15	13	28
Gesamt [n]	108	95	203

Tabelle 33: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der Progression

	LHCGR negativ	LHCGR positiv	Gesamt [n]
Keine Progression [n]	109	66	175
Progressionsereignis [n]	18	10	28
Gesamt [n]	127	76	203

Tabelle 34: LHCGR – Expression in Abhängigkeit der Progression

3.1.10 Lokalrezidiv

Weder VEGFR2 noch LHCGR zeigten im vorliegenden Kollektiv eine Korrelation mit dem Auftreten von Lokalrezidiven. Für VEGFR2 ergab sich ein p-Wert von $p=0,335$ (Chi-Quadrat-Test nach Pearson) im vorliegenden Kollektiv, für LHCGR ein p-Wert von $p=0,359$ (Chi-Quadrat-Test nach Pearson). Die Anzahl der Fälle mit Lokalrezidiven im hier zugrundeliegenden Kollektiv ist allerdings auf 12 (5,9%) Tumoren beschränkt, weshalb die Aussagekraft dieser Beobachtung limitiert ist.

	VEGFR2 negativ	VEGFR2 positiv	Gesamt [n]
Kein Lokalrezidiv [n]	100	91	191
Lokalrezidiv [n]	8	4	12
Gesamt [n]	108	95	203

Tabelle 35: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit des Auftretens von Lokalrezidiven

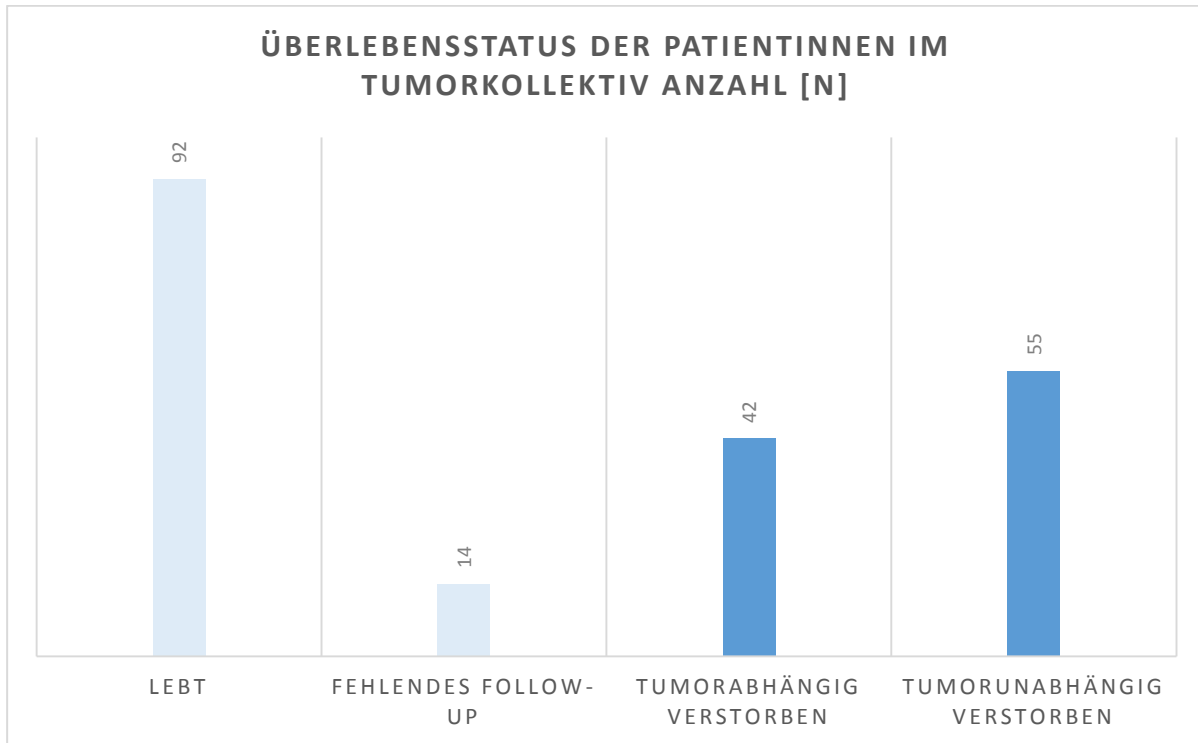
	LHCGR negativ	LHCGR positiv	Gesamt [n]
Kein Lokalrezidiv [n]	118	73	191
Lokalrezidiv [n]	9	3	12
Gesamt [n]	127	76	203

Tabelle 36: LHCGR – Expression in Abhängigkeit des Auftretens von Lokalrezidiven

3.1.11 Überleben

Die Daten zum Überleben wurden basierend auf einer Abfrage des Tumorregisters vom 31.03.2015 erhoben. Die Überlebenszeit ist hier definiert als Zeit zwischen Diagnosestellung

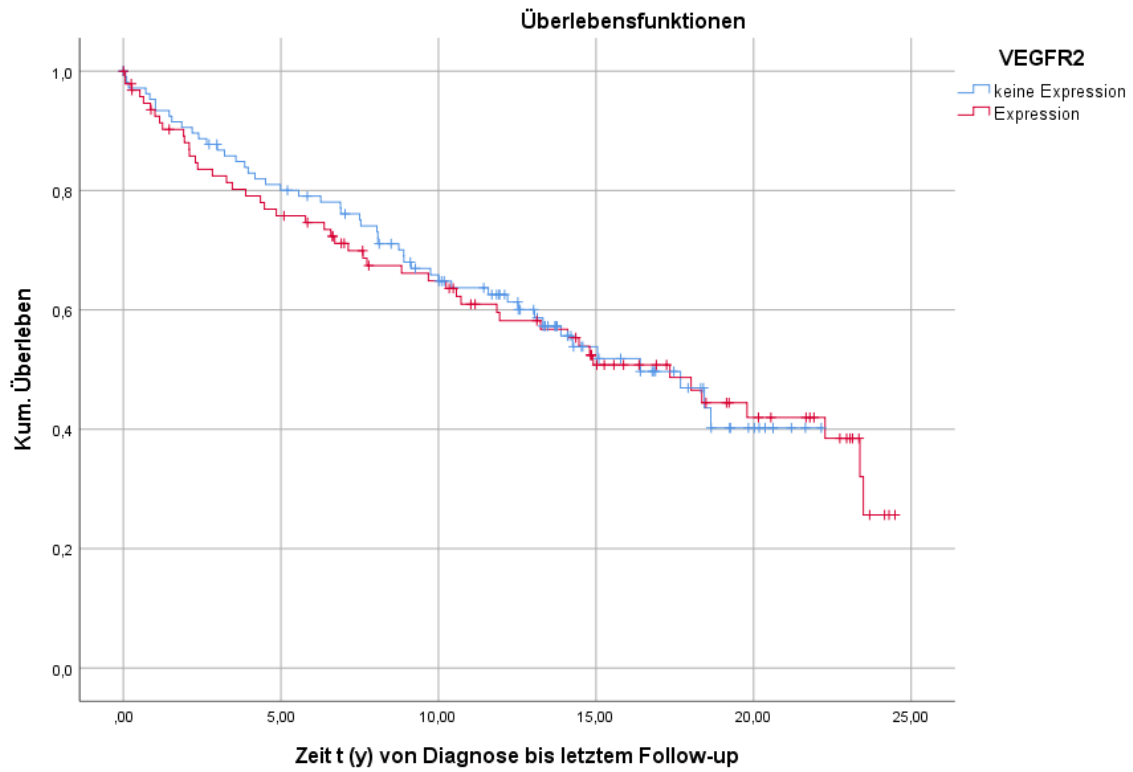
und letztem Follow-up. Zum Zeitpunkt der Abfrage des Tumorregisters waren 97 Patientinnen verstorben. 92 Patientinnen lebten und von 14 weiteren Patientinnen fehlten die Daten zum Follow-Up. Für die statistische Berechnung wurden die Fälle mit fehlendem Follow-up den Überlebenden zugerechnet. Das mittlere Überlebensalter betrug 72,4 Jahre für alle Patientinnen zum Zeitpunkt der Abfrage des Tumorregisters.



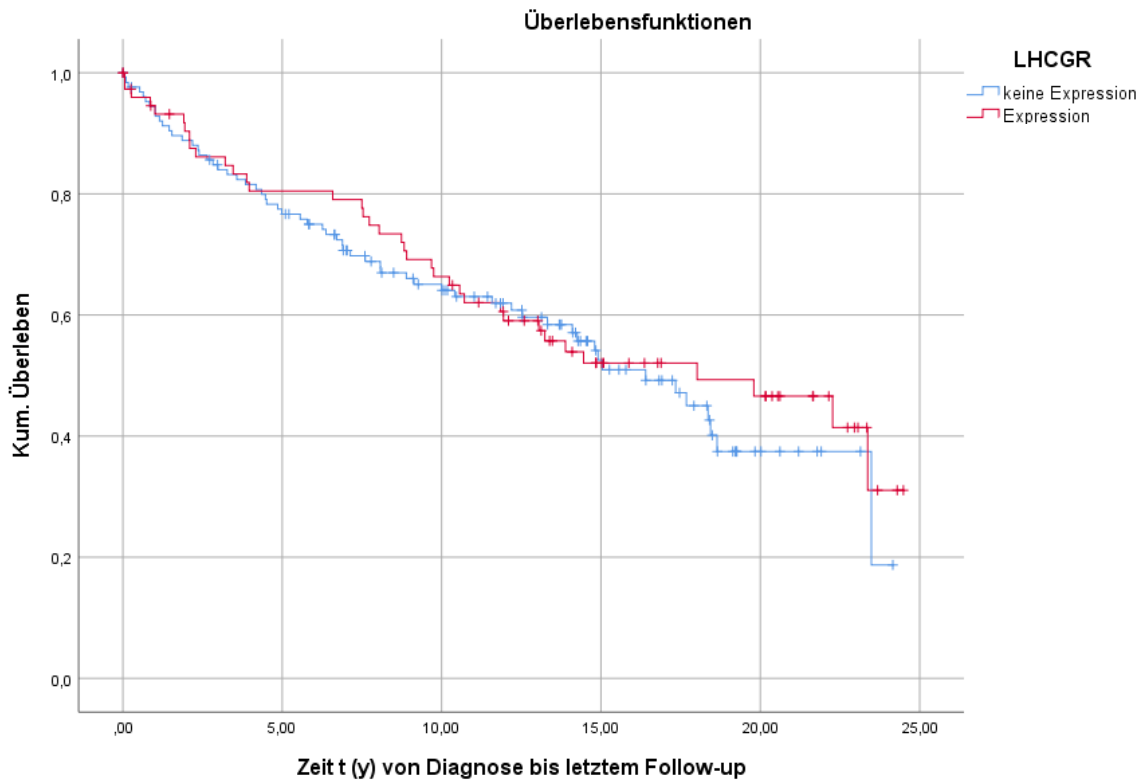
Graph 5: Darstellung des Überlebensstatus der Patientinnen im untersuchten Kollektiv (hell=lebend, dunkel=verstorben)

In unserem Kollektiv gab es insgesamt 42 Ereignisse von tumorabhängigen Todesfällen. 24 (57%) davon zeigten keine Expression des VEGFR2, während 18 (43%) als positiv für eine Expression des VEGFR2 beurteilt wurden. Das mittlere Überleben betrug für alle Patientinnen bis zum Zeitpunkt der Abfrage 10,9 Jahre, für diejenigen mit einem Todesereignis noch 7,6. Für diejenigen deren Tod in Relation zu ihrem Malignom stand betrug die Überlebenszeit im Mittelwert nach Diagnosestellung noch 6 Jahre.

Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt, dass es weder einen Zusammenhang zwischen der Expression von VEGFR2 und dem Gesamtüberleben noch mit der Expression des LHCGR und dem Gesamtüberleben der Patientinnen gibt. Ein IRS, der größer als der Median der erhobenen Werte für jeden Rezeptor war (VEGFR cutoff=3, LHCGR cutoff=2), galt als positive Expression. Der Log-Rank-Test ergab für die Abhängigkeit des Gesamtüberlebens von der VEGFR2-Expression einen p-Wert von 0,865, für die Abhängigkeit des Gesamtüberlebens von der LHCGR-Expression einen p-Wert von 0,578 und zeigt damit für beide Fälle ebenfalls keine Signifikanz.



Graph 6: Graph 5: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben nach Diagnosestellung abhängig vom IRS der VEGFR2-Expression



Graph 7: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben nach Diagnosestellung abhängig vom IRS der LHCGR-Expression

3.2 Detektion möglicher Markergene in der Metastasierung

Im Folgenden werden die Resultate für die Untersuchung der Expression von Markergenen in Endometriumkarzinomen dargestellt. Dazu werden zunächst die Ergebnisse der RNA-Isolierung abgebildet und anschließend das Resultat der RT-PCR erörtert. Zu den Charakteristika der Zelllinien siehe 2.2.1.1 Kulturmedien.

3.2.1 RNA Isolierung

Die RNA-Isolation aus den Zellpellets der endometrioiden Tumorzelllinien erfolgte über die Phenol-Chloroform-Methode. Um die gewonnene RNA anschließend in DNA transkribieren zu können ist es notwendig die enthaltene Konzentration der RNA in der Probe zu kennen, sowie auch eine Aussage über ihre Reinheit zu treffen. Als Maß für die Reinheit gegenüber der Verunreinigung durch Proteine wurde die nachfolgend erläuterte Ratio der Probe gemessen. Beide Werte, Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und Ratio wurden mithilfe der photometrischen Messung erhoben. Die Ratio beschreibt den Quotienten aus den Werten der Absorption bei den Wellenlängen 260 und 280 nm. Tabelle 37 zeigt die jeweils gemessene Konzentration bzw. Ratio in den unterschiedlichen Zelllinien. Es wurden pro Zelllinie zwei Proben an RNA generiert, die anschließend in cDNA transkribiert und in die RT-PCR eingesetzt wurden.

Zelllinie	Datum RNA- Isolierung	RNA-Konzentration [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$]	Ratio
Hec1a (1)	07.08.2015	0,74	1,958
Hec1a (2)	07.08.2015	2,648	2,009
Hec1b (1)	07.08.2015	1,202	1,997
Hec1b (2)	24.07.2015	2,04	2,232
AN3CA (1)	24.07.2017	2,812	1,972
AN3CA (2)	04.05.2015	1,418	2,029
Ishikawa (1)	07.08.2015	2,634	1,975
Ishikawa (2)	07.08.2015	3,828	1,886
KLE (1)	08.07.2015	1,256	1,994
KLE (2)	18.06.2015	2,148	1,971
RL 95 (1)	08.06.2017	0,758	1,934
RL 95 (2)	12.08.2015	4,390	1,760
Gesundes Endometrium (1)	15.07.2015	0,896	1,965
Gesundes Endometrium (2)	31.07.2015	0,396	1,817

Tabelle 37: RNA-Konzentration und Ratio der untersuchten Zelllinien

Die aufgeführten Werte zeigen, dass die RNA jeder Probe in ausreichender Menge und Qualität vorliegen. Es wurden Ratio-Werte zwischen 1,7 und 2,0 für die Weiterverarbeitung

akzeptiert. Da die Zellpellets in 20 µl Aqua inieciabile gelöst waren, konnte die Konzentration falls nötig durch Hinzufügen von Aqua inieciabile bzw. verdampfen an die für die Reverse Transkription notwendige Konzentration angepasst werden.

3.2.2 Real-Time PCR

Eine separate Testung der PCR-Effizienz war im durchgeführten Versuchsansatz nicht nötig. Die von Applied BioSystems bezogenen und hier verwendeten TaqMan-Primer haben den Herstellerangaben zufolge bereits eine PCR-Effizienz von 100%. Die RT-PCR ermöglicht die quantitative Bestimmung der Genexpression über eine Messung des Fluoreszenzanstiegs. Dieser ist umso höher je stärker ein Gen exprimiert wird, das heißt je mehr cDNA und je mehr Template damit für die Reaktion der Real-Time-PCR zur Verfügung steht. Ein schnellerer Fluoreszenzanstieg erreicht auch schneller den Schwellenwert (Threshold), sodass sich bei hoher Genexpression ein kleiner Ct-Wert ergibt. Eine Aussage über eine Überexpression ist allerdings nur im Vergleich zur Expression eines Referenzgens möglich. Als Referenzgen werden im gesunden Gewebe hochexprimierte Gene, sogenannte Housekeeping Genes, verwendet. Nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Formel werden dann die Werte der relativen Genquantifizierung bestimmt. Für einen Wert >1 ist das Gen im Vergleich zum Housekeeping Gene hochreguliert.

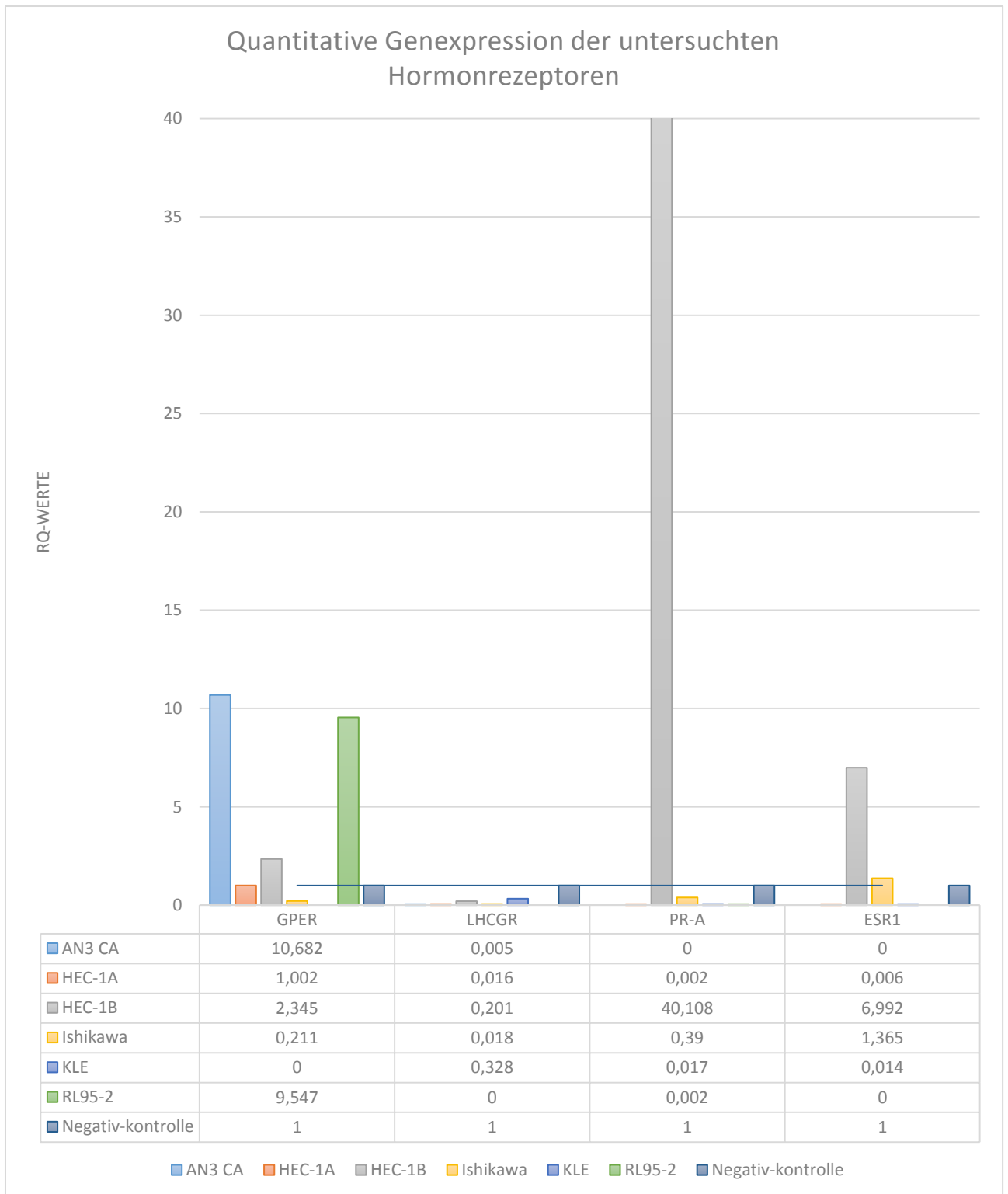
3.2.2.1 Genexpression in den unterschiedlichen Tumorzelllinien

Ziel der Untersuchung war es ein geeignetes Set an Genen zu finden, die in den Tumorzelllinien hoch exprimiert ist und daher für die Detektion von CTCs bei Patientinnen mit endometrioidem Adenokarzinom geeignet sein könnte. Dazu wurde die Real-Time PCR in 6 verschiedenen Zelllinien humaner endometrioider Adenokarzinome und in gesundem Gewebe durchgeführt. Folgend werden die RQ-Werte für die 7 untersuchten Gene dargestellt.

	AN3 CA	Hec-1a	Hec-1b	Ishikawa	KLE	RL95-2	Negativ- kontrolle
GPER	10,682	1,002	2,345	0,211	n.d.	9,547	1,000
Her-2	10,095	68,22	59,618	4,491	78,536	5,297	1,000
LHCGR	0,005	0,016	0,201	0,018	0,328	n.d.	1,000
MIG7	4,513	4,974	8,131	1,781	7,839	0,897	1,000
VEGFR2	0,0019	0,003	0,003	0,01	4,742	0,0003	1,000
PR-A	2,99 x10 ⁻⁴	0,002	40,108	0,390	0,017	0,002	1,000
ERα	1,07 x10 ⁻⁴	0,006	6,992	1,365	0,014	4,07 x10 ⁻⁴	1,000

Tabelle 38: RQ-Werte der untersuchten Gene und Zelllinien [n.d.= not detected]

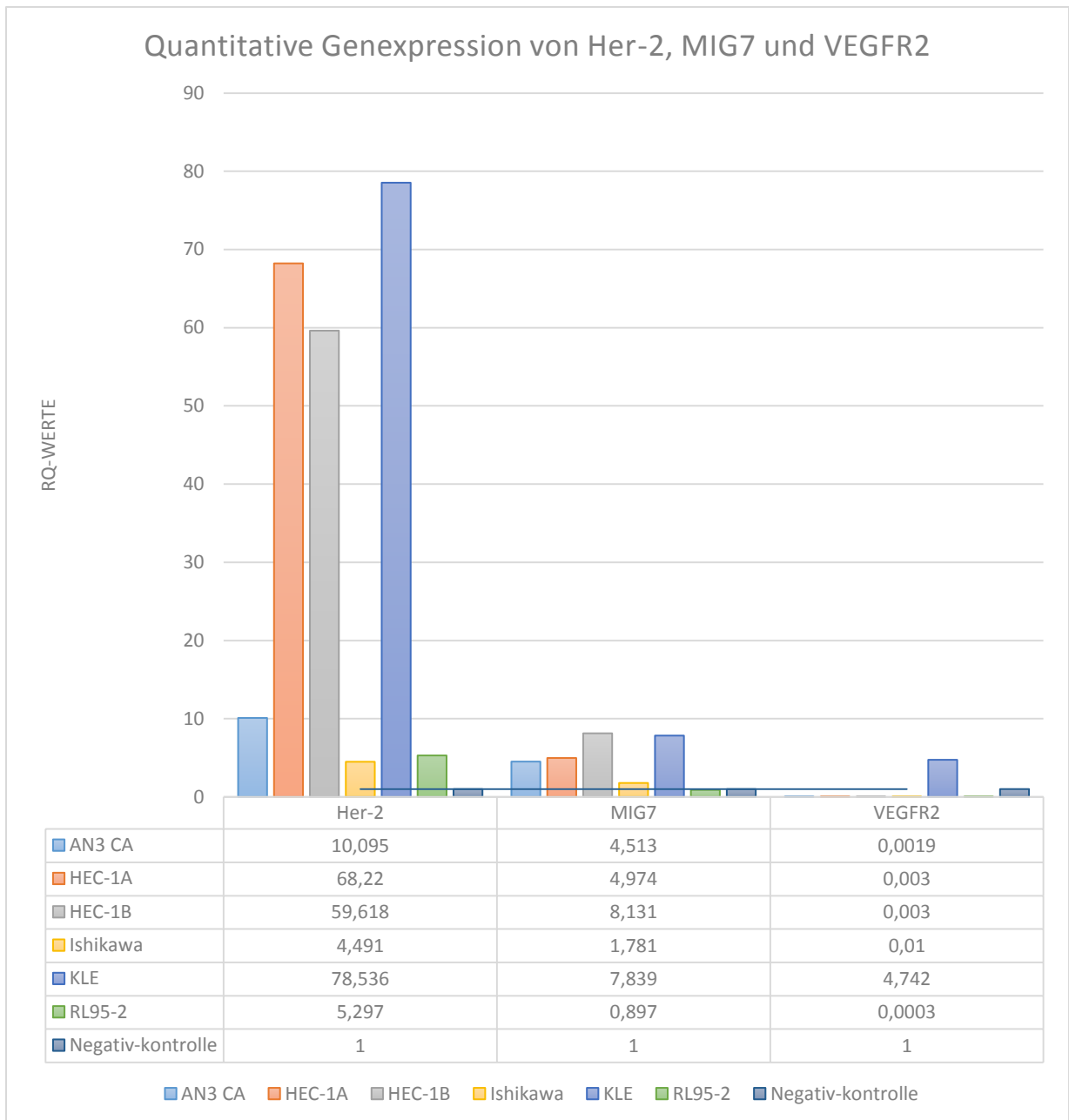
Graph 8 zeigt die Werte für die Hormonrezeptoren GPER, LHCGR, PRA-A und ER α . Graphisch stellt die schwarze Linie den Wert RQ=1 dar, ab dessen Überschreitung eine Hochregulierung der Genexpression angenommen wird. Für LHCGR zeigte sich mit einem RQ<1 in allen Zelllinien eine sehr geringe Expression unterhalb des Schwellenwertes für die Expression im gesunden Gewebe. In den Zellen der Linie RL-95-2 war sie sogar nur so gering, dass nach 40 Zyklen der PCR keine PCR-Produkte über die Fluoreszenz detektiert werden konnte und daher für den RQ-Wert n.d. („not detected“) angegeben wurde. LHCGR ist daher als Markergen für die Detektion von CTCs in Patientinnen geeignet. Für die Untersuchung des Progesteronrezeptor PR-A imponieren ebenfalls sehr niedrige Werte mit RQ deutlich kleiner als 1 für die Expression in den kanzerösen Zelllinien mit Ausnahme einer starken Expression in der Linie Hec-1b. Gegenüber dem Kontrollgewebe war das PCR-Produkt PR-A in den Zellen der Tumorzelllinie Hec-1b über 40fach häufiger vorhanden. Daraus lässt sich auf eine hochregulierte Menge mRNA des Gens PR-A in den Tumorzellen schließen. Diese nur singular in Hec-1b auftretende Überexpression disqualifiziert PR-A als allgemeinen Marker für die CTC-Detektion. Die Gene der Östrogenrezeptoren GPER und ER- α zeigten insgesamt betrachtet eine höhere Expression in den Zelllinien verglichen mit der Expression der beiden zuvor beschriebenen Hormonrezeptorgene: Das PCR-Produkt von ER α zeigte sich in den Linien Hec-1b (RQ=6,992) und Ishikawa (RQ=1,365) geringfügig höher exprimiert als im Vergleichsgewebe. In den übrigen vier Zelllinien war das PCR-Produkt von ER α herabreguliert. Der GPER zeigte eine leichte Hochregulierung in den Tumorzellen von AN3CA (RQ=10,682), RL95-2 (RQ=9,547) und Hec-1b (RQ=2,345). Für die Zelllinie Hec-1a ergab sich ein RQ-Wert von 1,002. GPER war folglich in den Hec-1b- Tumorzelllinien quantitativ vergleichbar exprimiert wie in den gesunden Zellen. In den Ishikawa-Zellen war GPER herunterreguliert (RQ=0,211) und für die Zellen von KLE konnte auch nach 40-PCR-Zyklen kein PCR-Produkt von GPER nachgewiesen werden (RQ=n.d.). Für die beiden hier untersuchten Östrogenrezeptoren lässt sich daher feststellen, dass sie als Teil des gesuchten Markersets für CTCs ungeeignet sind.



Graph 8: Quantitative Genexpression der Hormonrezeptoren in endometrioiden Adenokarzinom-Zelllinien nach QR-Werten

Graph 9 zeigt die quantitative Expression der PCR-Produkte von Her-2, MIG7 und VEGFR2 in den untersuchten Tumorzelllinien. Die eingezogene schwarze Linie gibt den RQ-Wert=1 an, ab dessen Überschreitung ein PCR-Produkt im Vergleich zum Kontrollgewebe als hochreguliert

betrachtet wird. Für VEGFR-2 zeigt sich eine generell sehr geringe Expression mit $QR < 1$ in allen Zelllinien mit Ausnahme von KLE. In diesen Zelllinien war das PCR-Produkt in der fast 5-fachen Menge verglichen mit dem Kontrollgewebe vorhanden. Allerdings ist auch diese Hochregulierung als marginal zu bewerten und eine Eignung von VEGFR2-Genprodukten in der CTC-Detektion daher nicht gegeben. Das Genprodukt von MIG7 ist dagegen in fast allen dargestellten Tumorzellen leichtgradig höher exprimiert als im Kontrollgewebe. In den Tumorzelllinien Hec-1b ($RQ = 8,893$) und KLE ($RQ = 7,893$) ist die Expression am höchsten. Lediglich in der Linie RL95-2 zeigte sich das Genprodukt von MIG7 in nahezu gleicher Menge wie im Kontrollgewebe exprimiert ($RQ = 0,897$). Die Hochregulierung von MIG7 in den Tumorzelllinien AN3CA, Hec-1a, Hec-1b, Ishikawa und KLE ist quantitativ sehr gering, sodass eine Eignung als Markergen eher nicht gegeben ist.



Graph 9: Quantitative Genexpression von Her-2, MIG7 und VEGFR2 in endometrioiden Adenokarzinom-Zelllinien nach QR-Werten

Das Her-2 Genprodukt zeigte sich in allen Tumorzellen stärker exprimiert als im Vergleichsgewebe. In den Tumorzellen von KLE fand sich die stärkste Hochregulierung mit einem RQ von 78,5. Aber auch die Linien Hec-1a (RQ=68,22) und Hec-1b (RQ=59,62) zeigten eine ähnlich hochregulierte Expression. In AN3 CA (RQ=10,1) und RL95-2 (RQ=5,3) fand sich lediglich eine geringfügige Erhöhung. Das Genprodukt von Her-2 könnte daher als Marker zur Detektion von CTCs in einem Set mit anderen Markern genutzt werden. Letztlich handelt es sich bei der Überexpression von Her-2 in den dargestellten Tumorzelllinien allerdings um eine mittelgradig starke Überexpression im Vergleich zum Normalgewebe.

3.3 Fazit

In der immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich eine leichtgradige Korrelation zwischen der Expression von VEGFR2 und dem Differenzierungsgrad (Grading) des Tumors. Außerdem steht die Expression von VEGFR2 mit derjenigen von ER α statistisch signifikant in Zusammenhang. Das Vorkommen von LHCGR korrelierte sowohl mit der Expression des Östrogenrezeptors ER α , als auch unabhängig mit derjenigen des Progesteronrezeptors PR-A. Die LHCGR-Expression zeigte sich des Weiteren statistisch signifikant mit einem positiven Glycodelin A-Status korreliert. In den Kaplan-Meier-Analysen konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression von VEGFR2 oder LHCGR mit dem Gesamtüberleben der Patientinnen beschrieben werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse der Real-Time PCR zeigten, dass von den untersuchten Genen Her-2 als Markergen zur Detektion von CTCs bei Patientinnen mit endometrioiden Adenokarzinom gut geeignet ist. Es erfüllt die Anforderung in allen untersuchten Tumorzelllinien gegenüber dem Kontrollgewebe höher exprimiert zu sein. Die anderen Gene zeigten entweder keine hochregulierte Expression in den Tumorzellen (LHCGR), eine quantitativ zu geringfügig hochregulierte Expression im Vergleich zum gesunden Gewebe (GPER, MIG7, VEGFR2) oder eine nur in einzelnen Zelllinien eine Hochregulierung (PR-A, ER α , VEGFR2)

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung von neoangiogenetischen und hormonellen Faktoren in Endometriumkarzinomen

Die detaillierte Kenntnis der Charakteristika von Endometriumkarzinomen hat direkte Implikationen für die Einschätzung der individuellen Prognose und die Therapieentscheidung. Es sind bereits unterschiedliche hormonelle Marker und Signalmoleküle bekannt, die einer näheren Klassifikation der Tumoren dienen und teilweise bereits in den gängigen Tumorklassifikationen wieder zu finden sind. Eine spezifische Betrachtung distinkter Hormonrezeptoren und Rezeptoren der Neoangiogenese und ihres Zusammenspiels stellt einen weiteren solchen Ansatzpunkt dar. Die Immunhistochemie zur Darstellung der Rezeptorexpression bietet hierfür ein schnelles, kostengünstiges und vielfältig verfügbares Verfahren.

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Panel mit 203 Gewebeproben von endometrioiden Adenokarzinomen immunhistochemisch gegen die Rezeptoren LHCGR und VEGFR2 angefärbt und anschließend lichtmikroskopisch nach dem IRS ausgewertet (siehe 2.1.3.7). Der ermittelte Wert wurde anschließend in Relation zu den Tumorcharakteristika TNM-Klassifikation, Grading und der Expression der weiteren Hormonrezeptoren ER α , ER β , PR-A, PR-B und Glycodelin gesetzt. Außerdem wurden Korrelationen mit den patientenspezifischen Eigenschaften Überleben, Progression der Tumorerkrankung und dem Auftreten von Lokalrezidiven untersucht. Im Kollektiv fiel bei der Betrachtung des Gradings auf, dass VEGFR2 in höhergradig (G2 und G3) entarteten Tumoren stärker exprimiert war, als in geringgradig entarteten Läsionen (G1). Allerdings erreichte diese Beobachtung mit einem p-Wert von $p=0,067$ lediglich eine Borderline-Signifikanz. Die Expression von VEGFR2 steht statistisch signifikant in Zusammenhang mit derjenigen Expression des Hormonrezeptors ER α im untersuchten Kollektiv. Für LHCGR konnte ebenfalls eine Korrelation mit der Expression von ER α sowie dem Hormonrezeptor PR-A gezeigt werden. Weiterhin ergab sich ein Zusammenhang zwischen der Expression von LHCGR und des Hormonrezeptors Glycodelin A. Für das Gesamtüberleben der Patientinnen zeigte sich in den durchgeführten Analysen keine Beeinflussung durch die VEGFR2 oder LHCGR- Expression. Die dargestellten Ergebnisse beruhen auf der Auswertung der Rezeptorexpression entsprechend dem IRS. Diese Methode ist insofern limitiert, als dass die Vergabe der Punktwerte durchaus von der Subjektivität des Betrachters abhängen. Um die Objektivität zu erhöhen, wurde jedes Präparat daher mindestens zweimal bewertet.

Die Neoangiogenese ist eine wichtige Voraussetzung für die Tumorprogression und Metastasenformation. Sie wird unter anderem durch das Signalmolekül VEGF vermittelt, deren

Effekte über die Familie der Rezeptor- Tyrosinkinase VEGFR ausgeführt werden. Verschiedene Arbeitsgruppen [82-84] konnten zeigen, dass VEGF in Endometriumkarzinomen verstärkt exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression eines Bindungspartners von VEGF, dem VEGFR2, untersucht, um so zu einem fundierteren Verständnis der Neovaskularisation in Endometriumkarzinomen beizutragen. In den vorliegenden Tumorgeweben zeigten 177 (87%) Proben einen positiven VEGFR2-Rezeptorstatus. VEGFR2 zeigte sich korreliert mit dem Auftreten von Metastasen im hier untersuchten Kollektiv. Diese Aussage ist allerdings durch teilweise unbekannte Daten zur Metastasierung im Kollektiv einerseits und durch die Unterrepräsentanz von Fällen mit Metastasen im vorliegenden Kollektiv mit 1,5%, verglichen mit den Literaturangaben von bis zu 25% [30] limitiert. Immunhistochemisch zeigte sich ein betont zellulär plasmatisches Antigenexpressionsmuster von VEGFR2 anstelle eines endothelialen Musters. Das dargestellte Ergebnis ist damit konkordant mit vorherigen Beobachtungen [81, 82]. Die Gruppe Wang et al. [82] konnte ebenfalls die Expression von VEGFR2 in 58% ihrer untersuchten endometrioiden Tumoren zeigen und darüber hinaus eine erhöhte Expression gegenüber gesundem Endometrium feststellen. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die Hochregulierung von VEGFR2 für die Progression und Metastasierung des Endometriumkarzinoms entscheidend ist. Bezüglich der prognostischen Aussagekraft der VEGFR2-Expression findet sich eine uneindeutige Datenlage in der Literatur. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Borderline-Signifikanz bezüglich einer Korrelation zwischen höherer VEGFR2-Expression und Grading ohne jedoch einen Einfluss auf das Gesamtüberleben zu haben. Diese Beobachtung wird durch andere Arbeiten [82, 136] bestätigt, die trotz erhöhter VEGFR2-Expression im Malignom ebenfalls keine Korrelation zwischen VEGFR2 Expression und Differenzierungsgrad des Malignoms finden konnten. Ein Zusammenhang zwischen Grading und VEGFR2-Expression konnte aber in anderen Tumorentitäten, wie der epithelialen Dysplasie [137] oder Weichteilsarkomen [138] gezeigt werden. Für Weichteilsarkome konnte sogar eine Korrelation zwischen Gesamtüberleben und der Expression von VEGFR2 beobachtet werden. Im gesunden Endometrium vermittelt VEGFR2 den postmenstruellen Reparaturprozess des Endometriums [139]. Interessanterweise konnte die Gruppe von Wang et al. [82] zeigen, dass VEGFR3 in seiner Expression einen Einfluss auf das Tumorstaging aufzeigt und daher als Bindungspartner von VEGF möglicherweise stärker in die tumorvermittelte Neoangiogenese eingebunden sein könnte als VEGFR2. VEGFR3 ist vorrangig in Induktion die Lymphangiogenese involviert. Möglicherweise hätte also die Untersuchung von VEGFR3 anstatt VEGFR2 in dieser Arbeit ebenfalls einen Einfluss auf das Tumorstaging gezeigt.

Die vorliegend beobachtete Expression von VEGFR2 in 87% der Tumoren kann als positiver Indikator für einen Neoangiogenese-inhibierenden Therapieansatz in Endometriumkarzinomen gewertet werden. Bisher fand die Blockade des Signalmoleküls

VEGF vor allem bei Patientinnen in fortgeschrittenem Erkrankungsstadium oder in der Rezidivsituation Aufmerksamkeit. Der monoklonale Antikörper vom IgG-Typ Bevacizumab blockiert die Aktivität von VEGF, bevor die Bindung an einen VEGFR stattfindet [140]. Studien zum Einsatz von Bevacizumab in Rezidivsituation oder therapieresistenten Fällen zeigten vielversprechende Ergebnisse: In der Studie der Gynecologic Oncology Group [141] wurde Bevacizumab als alleiniger Wirkstoff eingesetzt. In der dort untersuchten Kohorte von insgesamt 52 Patientinnen wurde bei 40,4% ein progressionsfreies 6-Monats-Überleben gezeigt. Andere Arbeiten erproben den Einsatz von Bevacizumab in Kombination mit dem mTor-Inhibitor Temsirolimus [142] oder als Kombination mit einer Radiotherapie [143] bzw. als Second-line -Therapie mit den Chemotherapeutika Paclitaxel und Carboplatin [144] und konnten das Therapieansprechen deutlich erhöhen. Diese Studien erhärten die Bedeutung des in dieser Arbeit präklinisch untersuchten VEGF-abhängigen Signalwegs für den klinischen Einsatz. Trotz vergleichsweise guter Ergebnisse der jeweiligen Protokolle, birgt die Angiogenese-inhibierende Therapie ob ihrer systemischen Wirkung ein signifikantes Toxizitätsprofil [145]. Eine alternative direkte spezifische Blockade von VEGFR2 könnte möglicherweise eine Alternative der nebenwirkungsreichen VEGF-Inhibition sein: Für die Blockade der extrazellulären Matrix von VEGFR2 steht beispielsweise der monoklonale Antikörper Ramucirumab zur Verfügung, der bereits im Rahmen groß angelegter Studien im kolorektalen Karzinom [146], Magenkarzinom und Ösophaguskarzinom [147] erprobt wurde und in der Kohorte von 238 Patienten mit gastralen bzw. ösophagealen Karzinomen das Gesamtüberleben bei geringem Nebenwirkungsprofil signifikant gegenüber der Placebogruppe erhöhen konnte. In einer weiteren Gruppe von 1072 Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom wurde durch Ramucirumab ebenfalls das Gesamtüberleben gegenüber der Placebogruppe verbessert. Für den Einsatz von einer spezifischen VEGF-Rezeptor-2-Blockade in Endometriumkarzinomen stehen entsprechende Forschungsarbeiten noch aus.

In der vorliegenden Arbeit wird insbesondere das Zusammenspiel zwischen Neoangiogenese und Expression hormoneller Faktoren untersucht. Humane endotheliale Zellen exprimieren sowohl ER α als auch den bislang weniger in dieser Funktion untersuchten ER β [148]. Im gesunden endometrialen Gewebe erfolgt die Neoangiogenese in Abhängigkeit von 17- β -Estradiol in Abhängigkeit des Menstruationszyklus. Eine Fehlregulation dieser komplexen Mechanismen könnte die Tumorigenese begünstigen. VEGFR2 wird durch 17- β -Estradiol, dem Liganden von ER α induziert [149]. Daher ist anzunehmen, dass eine Korrelation zwischen den Rezeptoren ER α und VEGFR2 besteht, die in dieser Arbeit immunhistochemisch bestätigt wurde. Higgins et al. [45] zeigten in Zelllinien von Mammakarzinomen, dass die Interaktion zwischen VEGFR2 und dem Hormonrezeptor ER α hormonabhängig durch die Bindung an die kleineren Proteine und Transkriptionsfaktoren Sp3 und Sp4 vermittelt wird. ER α /Sp3 und ER α /Sp4 binden an die proximalen GC-reichen Seiten des VEGFR2-Promoters und führen

damit zur gesteigerten Transkription und konsekutiv zur erhöhten VEGFR2-Expression [45]. In Brustkrebs-Zelllinien scheint 17- β -Estradiol allerdings abhängig vom molekularen Signalweg sowohl proangiogenetisch als auch inhibierend zu wirken [150]. In der Zelllinie MCF-7 eines Mammakarzinoms regulierte der Komplex ER α /Sp1 die VEGFR2-Expression herab [151]. Ob die Interaktion zwischen 17- β -Estradiol- und VEGFR2- Expression für das Endometriumkarzinom in einer Aktivierung oder Inhibierung der Neoangiogenese resultiert, bedarf weiteren Studien. 17- β -Östradiol vermittelt seine neoangiogenetischen Effekte nicht nur über den ER α , sondern speziell die non-genomischen und schnellen Effekte über GPER1. In der hier vorliegenden Kohorte zeigte sich ER α außerdem mit dem Hormonrezeptor LHCGR korreliert. In diesem Kollektiv exprimierten 73% der untersuchten Tumoren den Rezeptor LHCGR. Seine Liganden LH und hCG stehen zunehmend unter Verdacht an der malignen Transformation von humanen Tumoren beteiligt zu sein, wie zum Beispiel in Brust- oder Ovarialkarzinomen [152]. Übereinstimmend mit dem hier vorgestellten Ergebnis der Immunhistochemie konnte eine erhöhte LHCGR-Expression in humanen Endometriumkarzinomen gezeigt und darüber hinaus eine Korrelation mit der Invasivität *in vitro* hergestellt werden [96]. Die spätere Untersuchung der Endometriumkarzinom-Zelllinien mittels PCR zeigte in dieser Arbeit überraschend keine erhöhte Expression von LHCGR-mRNA gegenüber dem gesunden Gewebe (siehe unten).

Im Rahmen der hier präsentierten Daten konnte gezeigt werden, dass eine höhere Expression von ER α mit einer erhöhten LHCGR-Expression einhergeht. Eine Korrelation dieser beiden Rezeptoren konnte im Rahmen anderer Arbeiten bereits für Mammakarzinome beschrieben werden: Yuri et al. [153] zeigten, dass die Behandlung mit dem Liganden hCG in kanzerösen Zelllinien zu einem Anstieg des Östrogenlevels führte. hCG ist ein potentes Agens, das in verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien die Proliferation neoplastischer Zellen hemmen konnte [154]. Der Effekt wird vermutlich im Anschluss an die Bindung an LHCGR über eine p53-assoziierte mitochondriale Apoptoseinduktion vermittelt. Zusätzlich scheint hCG seine proliferationshemmende Wirkung über eine ovarielle Hypersekretion zu induzieren, welche die erhöhten Östrogenlevel verursachen [153]. Daraus könnte sich ableiten lassen, dass Karzinome, die LHCGR und ER α in erhöhten Levels ko-exprimieren, von einer Therapie mit hCG profitieren könnten. Die Ko-Expression der beiden Rezeptoren scheint in testikulären Keimzelltumoren zur Metastasenformation beizutragen. Möglicherweise erhöhen genetische Polymorphismen die Sensitivität des Rezeptors LHCGR für den Bindungspartner und begünstigen hierdurch sowohl Karzinogenese als auch Metastasierung [155]. Diese Beobachtung konnten in dem hier vorliegenden Kollektiv an Endometriumkarzinomen aufgrund der zu geringen Anzahl der Fälle metastasierter Tumoren (s.o.) für das Endometrium zwar nicht gezeigt werden, könnte grundsätzlich allerdings auf diese Tumorentität übertragbar sein.

Die Expression von LHCGR und VEGFR2 korrelierte in unserem Kollektiv überraschenderweise nicht miteinander. Durch den hier vorgestellten experimentellen Ansatz lässt sich daher der bereits beschriebene Einfluss von hCG auf VEGF [61, 92, 93] nicht bestätigen. Da die genannten Untersuchungen aber Signalmoleküle und nicht ihre Rezeptoren betreffen bleibt die Möglichkeit offen, dass der Effekt über andere Signalwege bzw. indirekt vermittelt wird.

Die Signalwege der Neovaskularisation im Gewebe des reproduktiven Systems interagieren über die Ausschüttung der Hormone und bilden so ein komplexes System. Progesteron wird in seiner Funktion als Gegenspieler von Östrogen eine tumorprotektive Wirkung im Endometrium zugeschrieben [10, 105]. Im vorliegend untersuchten Kollektiv konnte eine Korrelation zwischen dem Progesteron-Rezeptor PR-A und LHCGR gezeigt werden. Diese Beobachtung könnte durch eine Induktion der Progesteron-Synthese durch LHCGR im endometrialen Gewebe erklärt werden [156]. Die experimentelle Suppression von Progesteron durch den PR-Antagonisten Mifepristone führt in luteinisierten humanen Granulosazellen sowohl zu einer Suppression von LHCGR, LH/hCG und aufgrund des fehlenden autokrinen Stimulus zu einer Inhibition der Progesteron-Synthese. Umgekehrt führt die Exposition von endometrialem Gewebe gegenüber Progesteron zur verstärkten Synthese von LH/hCG und LHCGR [157]. In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit liegt die gegenseitige Beeinflussung von LHCGR und PR-A im kanzerösen endometrialen Gewebe daher nahe. Progesteron beeinflusst im physiologischen hormonellen Regelkreis positiv das Vorkommen des Proteins Glycodelin, das in der Pathogenese des Endometriumkarzinoms eine Rolle spielt [104]. In der hier präsentierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von LHCGR im endometrioiden Endometriumkarzinom auch mit derjenigen Expression von Glycodelin A korreliert. Glycodelin A gilt im Endometriumkarzinom als negativ prognostischer Faktor bezogen auf das Überleben der Patientinnen. Diese Korrelation könnte im Endometriumkarzinom auf eine Interaktion zwischen hCG und Glycodelin A zurückzuführen sein [98]. Analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte im Ovarialkarzinom die Korrelation zwischen LHCGR und Glycodelin A bereits bestätigt werden [158]. Weiterhin wiesen Versuche zur Stimulation von hCG durch Glycodelin A an humanen Trophoblastenzellen auf einen Zusammenhang der Expression von den Gonadotropin-Rezeptoren (FSHR und LHCGR), des Hormons hCG und dem Auftreten von Glycodelin hin [159]. Progesteron induziert die Expression von Glycodelin. Eine Antagonisierung des Progesteron-Einflusses auf Glycodelin A verringerte in Zelllinien humaner Endometriumkarzinome die zelluläre Proliferation [103]. In sporadischen Mammakarzinomen zeigte sich, dass Glycodelin A die Zellmigration und Angiogenese unterstützt. Sowohl Antikörper gegen Glycodelin A als auch gegen VEGF konnten diese Wirkung inhibieren, was einen direkten Einfluss von Glycodelin A auf den VEGF-Signalweg nahelegt [160].

4.1.1 Individuelle Risikogruppierungen und molekulare targets

Aus den dargestellten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Wechselwirkungen zwischen den Steroidhormonen, LHCGR und VEGFR2 bestehen. Hormonelle und neoangiogenetische Faktoren scheinen sich über ein komplexes Regulationssystem gegenseitig zu beeinflussen. Die Steroidhormonrezeptoren spielen im humanen Endometrium eine entscheidende Rolle, da sie den Auf- und Abbau des Endometriums, sowie Zellwachstum und -teilung regulieren. Aufgrund des hier dargestellten engen Zusammenspiels der beiden Schenkel Neoangiogenese und hormoneller Faktoren lässt sich annehmen, dass durch die therapeutische Blockade beider Mechanismen ein additiver Effekt erzielt werden kann. Ein zentrales Anliegen dieser Arbeit war es, präklinische Arbeit zur Beantwortung der Frage nach einer Gruppierung der Patientinnen hinsichtlich ihrer Tumoreigenschaften zu leisten und daraus abzuleiten, ob eine Patientengruppe von einer bestimmten Therapie besonders profitieren könnte. Bezüglich des Gesamtüberlebens der Patientinnen, der Progression oder der Aggressivität konnte in dieser Arbeit anhand der Oberflächenrezeptoren keine Patientengruppe sicher bestimmt werden, die aufgrund ihrer Expression eines Oberflächenmoleküls unter besonderem Risiko steht. Das vorliegende Kollektiv unterstreicht die extreme Heterogenität der Karzinome bezüglich der Rezeptorexpression. Daher könnte der personalisierten Krebstherapie in dieser Tumorentität umso mehr Bedeutung zukommen. Die Untersuchung des individuellen Tumors auf das Vorkommen von LHCGR und VEGFR2 erlaubt eine hormonsuppressive oder neoangiogenese-inhibierende Therapie individuell auf die Patientin zugeschnitten abzuleiten, die weniger Nebenwirkungen bei höherer Effektivität erzielen. Diese Arbeit liefert Hinweise, dass Patientinnen mit hoher VEGFR2-Expression von einer VEGF-inhibierenden Therapie profitieren können, da die Tumoren umso aggressiver zu sein scheinen. Die Korrelation von VEGFR2 und ER α weist darauf hin, dass Patientinnen mit positivem ER α -Status von einer VEGF-inhibierenden Therapie profitieren können. In Tumoren, die LHCGR und ER α ko-exprimieren könnte mit hCG möglicherweise die Metastasierungstendenz inhibiert werden. Die positive Korrelation von LHCGR und PR α lässt darauf schließen, dass Patientinnen mit diesem Profil mit einer zusätzlichen GnRH-Analoga-Therapie effektiv therapiert werden könnten. Um konkrete therapeutische Konzepte zu etablieren ist allerdings weitere Forschungsarbeit nötig.

4.2 Circulating Tumor Cells – Markergene der Metastasierung

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit zielt auf die Prädiktion der Metastasierung im Endometriumkarzinom anhand von Circulating Tumor Cells im Blutstrom. Dazu wurden die humanen Endometriumkarzinom-Zelllinien AN3CA, HEC-1-A, HEC-1-B, KLE, RL95 und Ishikawa kultiviert. Als Referenz der Genexpression im gesundem Endometrium wurden gesunde endometriale Stromazellen aus Patientenproben gewonnen. Aus den kultivierten Zellen wurde RNA extrahiert und in cDNA transkribiert, sodass das Material in die RT-PCR eingesetzt werden konnte. Ziel dieses experimentellen Ansatzes war es ein Set an spezifischen Markergenen in Endometriumkarzinomen zu etablieren, über die sich CTCs im Blutstrom detektieren lassen. Aus den Ergebnissen der RT-PCR ergab sich im hier vorgestellten Versuchsaufbau, dass das Gen Her-2 in allen untersuchten Zelllinien gegenüber gesundem Gewebe deutlich stärker exprimiert ist und daher als Markergen zur Detektion von CTCs geeignet sein könnte. Die Gene PR-A und ER α waren in ihrer Expression nur in einzelnen Zelllinien hochreguliert. Verglichen mit dem Kontrollgewebe zeigten GPER und MIG7 eine zu geringfügig erhöhte Genexpression, sodass sie sich diesem experimentellen Ansatz zufolge nicht als Marker von CTCs eignen. LHCGR stellt das einzige Gen dieses Ansatzes dar, dessen Expression in keiner Zelllinie eine relevante Erhöhung zeigte.

In den durchgeführten Experimenten zur Quantifizierung der Genexpression variieren die Ergebnisse einerseits bezogen auf die unterschiedlichen Gene, andererseits auch bezüglich der unterschiedlichen Zelllinien. Die beobachteten Unterschiede in der Expression eines Gens in unterschiedlichen Zelllinien spiegeln die Vielfalt der Expressionsmuster wieder, wie man sie ähnlich in Patientenproben wiederfinden würde. Die Genexpressionsmuster der Zelllinien HEC-1-A und HEC-1-B zeigten große Ähnlichkeiten, die auf ihren gemeinsamen Ursprung zurückzuführen sind (vgl. 2.2.1.1). Die Zelllinie Ishikawa zeigt sich am deutlichsten different zu den anderen untersuchten Linien. Die Zellen dieser Linie wurden von einer asiatischen Patientin gewonnen, während die übrigen Zelllinien kaukasischen Ursprungs waren. Daraus lässt sich folgern, dass die ethnische Herkunft der Patientinnen das Genexpressionsprofil in Endometriumkarzinomen deutlich beeinflusst und daher auch Unterschiede in der Karzinogenese angenommen werden dürfen [161]. Die Spenderin der Ishikawa Zelllinie war darüber hinaus mit 39 Jahren deutlich jünger als die Spenderinnen der anderen Zelllinien, deren Alter im Median bei 65 Jahren lag. Es besteht daher die Möglichkeit, dass es sich bei Ishikawa um prämenopausal entstandene Tumorzellen handelt, die im Kontrast zu den anderen vermutlich postmenopausalen Zellen zusätzlich Hinweis auf divergierende genetische Hintergründe sein könnten. Die Zelllinie AN3CA wurde aus metastasiertem Gewebe gewonnen und könnte sich aus diesem Grund im Expressionsprofil von den anderen Zellen unterscheiden und Genprodukte überexprimieren, die zur Metastasierung befähigen. Die ausgeprägte Heterogenität der Endometriumkarzinome bezüglich ihrer pathogenetischen als auch klinischen Charakteristika wird durch unterschiedliche genetische Profile bedingt.

Darin besteht letztlich die Herausforderung bei der Etablierung von spezifischen und hochsensitiven Markern des Endometriumkarzinoms zur Detektion von CTCs. Von den untersuchten Genen zeigte sich die Expression der Genprodukte von Her-2 in allen untersuchten Karzinom-Zelllinien deutlich hochreguliert und qualifiziert sich daher als Markergen. Die Überexpression von Her-2 wird in 10-30% der Endometriumkarzinomen festgestellt [116, 162] und scheint die Tumorprogression in Endometriumkarzinomen zu beeinflussen [163]. Her-2 eignet sich außerdem als negativ prognostischer Marker und scheint besonders hoch in serösen Adenomen exprimiert zu sein [116]. Das Genprodukt von GPER war vor allem in den Zelllinien AN3CA und RL-95 erhöht. GPER vermittelt die schnelle, nicht genomischen Effekte von Östrogen und aktiviert unter anderem über den EGFR-MAPK-Signalweg die Proliferation der Tumorzellen im Endometriumkarzinom [112]. Die Beobachtung, dass das Gen vor allem in der aus metastatischem Gewebe gewonnenen Zelllinie AN3CA hochreguliert ist, könnte auf seine besondere Rolle im späten Endometriumkarzinom hinweisen. In die Vermittlung der Östrogen-Effekte ist außerdem auch der Rezeptor ER α eingebunden, dessen erhöhte Genexpression hier allerdings nur in der Zelllinie Hec-1b gezeigt werden konnte. Die Genexpression von MIG7 zeigte sich in den Zelllinien KLE und Hec-1b stark und in Hec-1a intermediär erhöht. Als Teil eines Sets an Markergenen, könnte MIG7 daher durchaus zur Detektion von CTCs geeignet sein. Das Genprodukt scheint in die Interaktion des soliden Tumors im Endometrium mit dem umliegenden Gewebe involviert zu sein [119, 120], sodass seine Detektion für die Vorhersage der Metastasierung von besonderem Interesse sein könnte. Entgegen den Erwartungen aus der immunhistochemischen Untersuchung in dieser Arbeit und anderen wissenschaftlichen Vorarbeiten, zeigte sich keine relevante Erhöhung der Genexpression von VEGFR2 [82] oder LHCGR [96] in den untersuchten Zelllinien. In anderen Arbeiten stimulierte die Zugabe von rekombinantem LH die Proliferation der malignen Zelllinie Ishikawa [57, 59]. Davies et al. versuchten nachzuvollziehen, über welchen Signalweg diese Stimulation induziert wird, konnten aber aus verschiedenen Zelllinien nur in der Ishikawa-Linie eine geringfügig bis intermediäre Expression von LHCGR zeigen [59]. Dass die beiden Gene LHCGR und vor allem VEGFR2 nur eine zu vernachlässigend geringe Expression in unseren Versuchen zeigen, schmälert nicht automatisch ihre Bedeutung für die Karzinogenese oder für die Metastasenformation. Eine mögliche Erklärung könnte beispielsweise sein, dass die mRNA nach ihrer Synthese schnell degradiert, sodass ihre Expression mit der RT-PCR nicht mehr gemessen werden kann. Um diese Vermutung zu untermauern und die Expression dieser Genprodukte besser zu verstehen, bedarf es anderer methodischer Ansätze. Im Rahmen der Detektion von CTCs über die RT-PCR kann diese methodische Einschränkung umgangen werden, indem gezielt Markergene gesucht werden, von deren RNA bekannt ist, dass sie eine lange Halbwertszeit besitzt. Damit würde sich das Zeitfenster für ihre Detektion deutlich vergrößern.

Die hier dargestellten Ergebnisse der Genexpression in den endometrioiden Tumorzelllinien wurden relativ zu ihrer Expression im gesunden Gewebe erhoben. Die Patientenproben, deren zelluläres Material als Referenzgewebe aufgearbeitet wurde, entstammen prämenopausalen Patientinnen, obwohl die meisten Endometriumkarzinome postmenopausal entstehen. Prämenopausale und postmenopausale Gewebe unterscheiden sich allerdings in Bezug auf ihre Hormonexpression und möglicherweise auch bezüglich der hier untersuchten potentiellen Markergene. Die Verwendung von postmenopausalen Zellen als Referenzgewebe wäre daher für diese Untersuchung noch geeigneter gewesen.

4.2.1 Klinische Implikationen zur Detektion von CTCs im Endometriumkarzinom

Für die individuelle Patientin kann die Kenntnis über das Bestehen von CTCs in ihrem Blutstrom wichtige Informationen über Krankheitsstadium [164] und das Potential zur Filialisierung ihres Tumors liefern, die entscheidend für die Therapieanpassung sein können und sogar helfen könnten eine Metastasierung zu verhindern. Die Rolle von CTCs für das Endometriumkarzinom ist bisher nicht eindeutig definiert. Grund dafür sind nicht zuletzt unterschiedliche methodischer Ansätze zur Detektion, die Divergenzen in den Detektionsraten hervorbringen. Allerdings ist das Vorhandensein von CTCs verlässlicher mit dem Erkrankungsstadium assoziiert, als herkömmliche Tumormarker wie etwa CA125 oder HE4 [67]. Die hier vorgestellte und angewendete RT-PCR ist eine vielversprechende Möglichkeit, um CTCs von Endometriumkarzinomen einfach und kosteneffizient nachzuweisen. Sie ist in nahezu allen Laboratorien verfügbar und könnte daher ein sehr hilfreiches Modul zur Vorhersage der hämatogenen Metastasierung im Endometriumkarzinom werden. Mit RQ-Werten deutlich >1 ist Her-2 ein geeigneter Genmarker für die Detektion von Endometriumkarzinom-Zellen. Es bedarf allerdings weiterer Forschungsarbeit um ein Set an Markergenen zu etablieren, die gemeinsam mit Her-2, zuverlässige Aussagen über das Vorkommen von Tumorzellen in Patientenproben zulassen. Als weitere Markergene könnten sich beispielsweise CLDN-4 [165], MIG7 und CK19 [70, 165] eignen. Für die klinische Anwendung der Detektion von CTCs muss dann im nächste Schritt, analog zum Vorgehen bei Patienten mit Brustkrebs [72], die Höhe der Genexpression der Menge an zu erwartenden Tumorzellen im Blut zugeordnet werden. Für diesen Zweck können Standardkurven generiert werden, indem in unterschiedliche Mengen an Tumorzellen den Blutproben gesunder Probanden *in vitro* zugegeben werden. Die klinische Bestimmung von CTCs aus Patientenblutproben ermöglicht darüber hinaus selbst eine genauere Charakterisierung der Tumorzellen, die wiederum zur Anpassung des Therapieregimes genutzt werden können und einen weiteren Schritt in Richtung personalisierter Tumorthherapie darstellen würde.

5. Zusammenfassung

In den Industrienationen stellt das Endometriumkarzinom das häufigste Malignom des weiblichen Genitals dar. Die Inzidenz der Erkrankung nimmt mit steigender Lebenserwartung zu. Als wichtigster Risikofaktor gilt ein langfristig erhöhter Östrogenspiegel. Aufgrund der früh apparenten Symptomatik in Form einer plötzlich auftretenden uterinen peri- oder postmenopausalen Blutung, wird das Karzinom häufig in frühen Erkrankungsstadien diagnostiziert. Die Hauptsäule der Therapie besteht in der chirurgischen Resektion mit anschließender Radiotherapie. Selten wird zusätzlich eine neoadjuvante Chemotherapie mit Platinderivaten durchgeführt. Trotzdem zeigt sich eine hohe Rate an Lokalrezidiven und Metastasenformation. Daher ist es umso entscheidender neue Ansatzpunkte zur Malignomcharakterisierung und Risikoeinschätzung zu erforschen, um die Tumorigenese und das Fortschreiten der Erkrankung auf molekularer Ebene besser zu verstehen und bestenfalls therapeutische Implikationen daraus ableiten zu können.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit neoangiogenetische und hormonelle Faktoren im Endometriumkarzinom zu charakterisieren, um zum tieferen Verständnis der Pathogenese im Endometriumkarzinom beizutragen. Forciertes Tumorwachstum benötigt eine verstärkte Perfusion des neoplastischen Gewebes, um ausreichend Metabolite bereitzustellen. VEGF ist ein wesentlicher Faktor in der Formation neuer Blutgefäße. Sein Rezeptor VEGFR2 vermittelt die biologischen Prozesse im Endometrium. In anderen Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von VEGF und seinem Rezeptor prognostische Signifikanz hat und die medikamentöse Blockade das Tumorwachstum hemmen kann. Die Tumorigenese im Endometriumkarzinom wird außerdem durch die Hormone LH und hCG und ihren gemeinsamen Bindungspartner LHCGR beeinflusst. Eine Korrelation der Rezeptorexpression mit der Zellproliferation im malignen endometrialen Gewebe und dem Grading des Tumors könnte darauf hinweisen, dass Patientinnen mit positivem LHCGR-Status von einer therapeutischen Blockade dieser Hormonachse profitieren. In dieser Arbeit wurden 203 in Paraffin eingebettete Endometriumkarzinomschnitte immunhistochemisch angefärbt und auf ihr Expressionsmuster von VEGFR2 und LHCGR untersucht. Für die Detektion der Rezeptoren wurde eine Antikörper-gekoppelte Enzymreaktion gewählt. Die Färbung wurde anschließend lichtmikroskopisch nach dem immunreaktiven Score (IRS) bewertet und statistisch auf Korrelationen mit Tumorcharakteristika und Patientendaten überprüft. Es konnte ein geringgradiger Zusammenhang zwischen VEGFR2 und dem Grading des Tumors gezeigt werden. Außerdem besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen VEGFR2 und dem Östrogenrezeptor $ER\alpha$. LHCGR zeigte sich ebenfalls korreliert mit der Expression von $ER\alpha$ und darüber hinaus mit derjenigen des Progesteronrezeptors PR-A. Weder die Expression von VEGFR2 noch diejenige von LHCGR wirkte sich auf das Gesamtüberleben der Patientinnen aus. Die Korrelationen zwischen VEGFR2 und LHCGR mit $ER\alpha$, sowie

diejenige von LHCGR mit PR-A können mit ihrem Wechselspiel als Signalvermittlungsmoleküle in Zellwachstum und -differenzierung erklärt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass sich bei Patientinnen mit einem endometrioiden Adenokarzinom eine medikamentöse Blockade die VEGFR2, LHCGR, ER α und PR positiv prognostisch auswirkt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll der frühen Vorhersage von Metastasen bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom Rechnung getragen werden. Metastasen entwickeln sich aus einzelnen vom Primärtumor losgelösten Zellen, die in den Blutstrom gelangen und in einem anderen Gewebe absiedeln. Die Detektion dieser einzelnen Zellen, der Circulating Tumor Cells (CTCs), im Blutstrom, könnte zuverlässiger als die herkömmlichen Tumormarker eine Filialisierung vorhersagen noch bevor sie klinisch apparent wird. Um diese Zellen im Blutstrom zu detektieren, kann ein PCR-gestützter Ansatz verwendet werden. CTCs unterscheiden sich in ihrer Genexpression durch ihren epithelialen Ursprung aus dem Primärtumor von den mesenchymalen Blutzellen. Die Etablierung eines Sets an spezifischen Markergenen für das Endometriumkarzinom ist daher die Voraussetzung für den Erfolg dieses Ansatzes. Dazu wurden die endometrioiden Karinomzelllinien Hec-1a, Hec-1b, AN3CA, Ishikawa, RL-95 und KLE kultiviert. Anschließend wurde in einem RT-PCR-Ansatz ihre Genexpression der Hormonrezeptoren LHCGR, PR-A, ER α , GPER1 und Her2, sowie ihre Genexpression des Neoangiogenese vermittelten Rezeptors VEGFR2 und das Gen MIG-7 im Vergleich zu einem Kontrollgewebe untersucht. Die Expressionslevel der Gene PR-A und Er α variierten zwischen den unterschiedlichen Zelllinien, während GPER, MIG7 und VEGFR2 nur geringfügig und LHCGR überhaupt nicht höher exprimiert waren. Her2 erfüllt den Anspruch in allen Tumorzelllinien im Vergleich zum Kontrollgewebe höher exprimiert zu sein und ist daher in Kombination mit noch zu etablierenden Genen zur Detektion von CTCs gut geeignet.

Die vorgestellte Arbeit leistet weitere Einblicke in die Tumorbiologie im frühen und späten Endometriumkarzinom. Das komplexe Wechselspiel der hormonellen und neoangiogenetischen Faktoren bietet Ansatzpunkte für die medikamentöse Blockade von LHCGR, VEGFR2, ER α und PR, mit denen multiplikative Effekt erzielt werden könnten und die sich daher positiv prognostisch auswirken könnten. Zur Überprüfung dieser These bedarf es allerdings weiterer Forschungsarbeiten. Für das späte Endometriumkarzinom stellt der Nachweis von CTCs mithilfe der RT-PCR einen vielversprechenden Ansatz zur Diagnostik einer einsetzenden Filialisierung über das Blutgefäßsystem. Hier wurde Her-2 als geeigneter Marker beschrieben. Der nächste Schritt in dieser Richtung besteht in der Untersuchung weiterer Marker auf ihre Eignung im Modellsystem mit verschiedenen Endometriumkarzinom-Zelllinien. Sobald ein Set besteht, kann dieses an Patientenprobenmaterial erneut erprobt und verfeinert werden und schließlich im klinischen Alltag für Staging und Therapie bedeutend werden.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Akt	AKR mouse thymoma kinase
CDKI	Cyclin dependent kinase inhibitor
c-fos	
CNV	Copy Number Variation
COX-1	Cyclooxygenase-1
Ct	„Cycle over Threshold“
CT	Computertomographie
DAB	3,3' Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
dUTP	Deoxyuridine Triphosphat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ERα	Estrogen Receptor α
FCS	Fetal Calf Serum
hCG	Human Choriogonadotropin
IRS	Immunoreactive Score
LH	Luteinisierendes Hormon
LHCG	Luteinizing Human Choriogonadotropine
LHCGR	Luteinizing Human Choriogonadotropine Receptor
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
OAS	Overall Survival
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PR-A	Progesteron Receptor A
PTEN	Phosphatase and tensin homolog

RQ	„Relative Quantification“= Relativer Genexpressionswert
RT-PCR	Real-Time PCR
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

6.2 Bezugsquellenverzeichnis

6.2.1 Reagenzien

Reagenzien	Bezugsquelle
3,3-Diaminobenzidin (DAB) mit Substratpuffer	Dako North America, Inc., Carpinteria (USA)
Aqua dest.	Apotheke Innenstadt, Universitätsklinikum LMU
Auftragspuffer	New England Biolabs Inc., Ipswich Massachussets, USA
Chloroform p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
DMEM HAM'S F12	Biochrom GmbH, Berlin
Dulbecco's MEM Biochrom 500 ml	Biochrom GmbH, Berlin
Erylyse-Puffer für Veridex Blut	Apotheke Innenstadt, Universitätsklinikum LMU
Ethanol 50% vergällt	Apotheke Innenstadt, Universitätsklinikum LMU
Ethanol 70% vergällt	CLN GmbH, Chemikalien- und Laborgroßhandel, Langenbach
Ethanol 96% p.a.	Apotheke Innenstadt, Universitätsklinikum
Ethanol absolut vergällt	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach
FCS 500ml	Biochrom GmbH, Berlin
Hank's Salt Solution (w/o Ca²⁺/Mg²⁺, w/o Phenol / Mg²⁺)	Biochrom GmbH, Berlin
Isopropanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt
Mayers Hämalan	AppliChem, Darmstadt

Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Nested PCR-Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Nuclease-freies Wasser	Invitrogen, Carlsbad Kalifornien (USA)
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
PCR Mastermix	Promega, Madison Wisconsin (USA)
Penicillin	Biochrom AG, Berlin
Real-Time Primer	Applied Biosystems, Carlsbad Kalifornien (USA)
Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Super Script III first Strand Synthesis Super Mix for qPCR	Invitrogen, Carlsbad Kalifornien (USA)
TaqMan Fast Universal PCR MasterMix (2x), No AmpErase UNG	Applied Biosystems, Carlsbad Kalifornien (USA)
TaqMan Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Carlsbad Kalifornien (USA)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Trizol LS	Ambion, Carlsbad Kalifornien (USA)
Trypsin/ EDTA Solution 100 ml (0,05%/0,02%	Biochrom AG, Berlin
Vectastain Elite ABC Kit (Rabbit IgG) - Goat-Normalserum - biotinyliertes Goat-Anti-Rabbit-IgG-Sekundär-AK - konzentrierte A- und B-Reagenzien	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Wasserstoffperoxid 30%	VWR International, Radnor (USA)
X-tra Kitt	Medite GmbH, Burgdorf
Xylol	Apotheke Innenstadt, Uni LMU

Tabelle 39: Verzeichnis der verwendeten Reagenzien

6.2.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Abzug HERA safe	Heraeus Instruments Thermofisher Science GmbH, Hanau
Deckgläser 24x24mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser 24x50 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten - 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg

- 10-100 µl - 500-5000 µl	
Falcon-Röhrchen - 50ml - 15ml	Fisher Scientific, Hampton New Hampshire (USA)
Feather Disposable Scalpel No 22 Steril 25kGy	GF Health Products Inc., Atlanta Georgia (USA)
Gefrierschrank -20°C Bosch Cooler	Robert Bosch GmbH, Gerlingen
Gefrierschrank -80°C Hera Freeze	Thermo Electron Corporatio, Waltham Massachussetts (USA)
Glaspipetten - 5ml - 10ml	SARSTEDT AG&Co. Nürnbrecht-Rommelsdorf
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Kulturflaschen Falcon 250ml, Canted Neck	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (Österreich)
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0,1 ml	Applied Biosystems, Carlsbad Kalifornien (USA)
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Carlsbad Kalifornien (USA)
Mikroskop Diaplan - Objektiv 6,3-fach - Objektiv 10-fach - Objektiv 25-fach - Objektiv 40-fach	Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
Minizentrifuge Centrifuge 5415	Eppendorf AG, Hamburg
Multi-Safe Seal Tubes, 1,5/1,7ml	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Objektträger Superfrost Plus 26x76x1 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Petrischalen Cellstar Tubes 50ml	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (Österreich)
Photometer Nanodrop	Implen, München
Pipettenspitzen epT.I.P,S,500 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen Premium Tips - 10 µl - 100 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettierhilfe Accu-jet pro	BRAND GmbH&Co.KG, Werthelm
Reaktionsgefäß 0,6ml farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
RealTime PCR Gerät 7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems, Carlsbad Kalifornien (USA)

Schnellkochtopf	Fissler GmbH, Idar-Oberstein
Serologische Pipetten Falcon, steril - 5ml - 10ml	BD, Franklin Lakes (USA)
Vortex-Gerät Genie 2	Bender & Hobein, Zürich (Schweiz)
Cell Scraper Falcon 28 cm, steril	Fisher Scientific, Hampton New Hampshire (USA)
Filtersieb Falcon - 40 µg - 250 µg	Fisher Scientific, Hampton New Hampshire (USA)

Tabelle 40: Verzeichnis der Gebrauch- und Verbrauchsmaterialien

6.3 Quellenverzeichnis

1. GEKID, *Cancer in Germany 2011/2012. Incidence and Trends*. 2015.
2. AWMF, *Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). AWMF Leitlinien Register*, 2018. **Nr. 032/034-OL**.
3. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
4. Friberg, E., et al., *Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis*. *Diabetologia*, 2007. **50**(7): p. 1365-74.
5. Anderson, K.E., et al., *Diabetes and endometrial cancer in the Iowa women's health study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001. **10**(6): p. 611-6.
6. Luo, J., et al., *Association between diabetes, diabetes treatment and risk of developing endometrial cancer*. *Br J Cancer*, 2014. **111**(7): p. 1432-9.
7. Trabert, B., et al., *Metabolic syndrome and risk of endometrial cancer in the united states: a study in the SEER-medicare linked database*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015. **24**(1): p. 261-7.
8. AGO, *Empfehlungen für Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinoms - Aktualisierte Empfehlungen der Kommission Uterus auf Grundlage der S2k Leitlinie (V1.0, 01.06.2008)*. AWMF Leitlinien Register, 2013. **Nr.0320 / 34:2013**.
9. Sheikh, M.A., et al., *USA endometrial cancer projections to 2030: should we be concerned?* *Future Oncol*, 2014. **10**(16): p. 2561-8.
10. Bokhman, J.V., *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 1983. **15**(1): p. 10-7.
11. Beral, V., D. Bull, and G. Reeves, *Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. *Lancet*, 2005. **365**(9470): p. 1543-51.
12. Morice, P., et al., *Endometrial cancer*. *Lancet*, 2016. **387**(10023): p. 1094-108.
13. Clement, P.B. and R.H. Young, *Endometrioid carcinoma of the uterine corpus: a review of its pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects*. *Adv Anat Pathol*, 2002. **9**(3): p. 145-84.

14. Clement, P.B. and R.H. Young, *Non-endometrioid carcinomas of the uterine corpus: a review of their pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects*. Adv Anat Pathol, 2004. **11**(3): p. 117-42.
15. Darvishian, F., et al., *Serous endometrial cancers that mimic endometrioid adenocarcinomas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of a group of problematic cases*. Am J Surg Pathol, 2004. **28**(12): p. 1568-78.
16. Carcangiu, M.L. and J.T. Chambers, *Uterine papillary serous carcinoma: a study on 108 cases with emphasis on the prognostic significance of associated endometrioid carcinoma, absence of invasion, and concomitant ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol, 1992. **47**(3): p. 298-305.
17. Koechli OR, S.B., Benz J, Petru E, Haller U, *Maligne Tumoren des Corpus Uteri*, in *Gynäkologische Onkologie*. 1998, Springer Berlin Heidelberg New York. p. 189-242.
18. Scully RE, B.T., Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkinson EJ, *International Histological Classification and Typing of Female Genital Tract Tumours*. Springer, New York Berlin Heidelberg, 1994.
19. Levine, R.L., et al., *PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma*. Cancer Res, 1998. **58**(15): p. 3254-8.
20. Yu, J.S. and W. Cui, *Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination*. Development, 2016. **143**(17): p. 3050-60.
21. Olsson, A.K., et al., *VEGF receptor signalling - in control of vascular function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 359-71.
22. Kandoth, C., et al., *Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma*. Nature, 2013. **497**(7447): p. 67-73.
23. McConechy, M.K., et al., *Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas*. J Pathol, 2012. **228**(1): p. 20-30.
24. Amant, F., et al., *Endometrial cancer*. Lancet, 2005. **366**(9484): p. 491-505.
25. Eifel, P., et al., *Simultaneous presentation of carcinoma involving the ovary and the uterine corpus*. Cancer, 1982. **50**(1): p. 163-70.
26. Choo, Y.C. and B. Naylor, *Multiple primary neoplasms of the ovary and uterus*. Int J Gynaecol Obstet, 1982. **20**(4): p. 327-34.
27. Timmermans, A., et al., *Endometrial thickness measurement for detecting endometrial cancer in women with postmenopausal bleeding: a systematic review and meta-analysis*. Obstet Gynecol, 2010. **116**(1): p. 160-7.
28. Denschlag, D., U. Ulrich, and G. Emons, *The diagnosis and treatment of endometrial cancer: progress and controversies*. Dtsch Arztebl Int, 2010. **108**(34-35): p. 571-7.
29. Löning T, R.L., *Pathologie der weiblichen Genitalorgane III*. Spezielle pathologische Anatomie, ed. S. G. Vol. Band 20/III. 2001, Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag. 739.
30. Amant, F., et al., *Treatment modalities in endometrial cancer*. Curr Opin Oncol, 2007. **19**(5): p. 479-85.
31. Brierley, J., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM Classification of Malignant Tumours*. Vol. Eighth edition. 2017, Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
32. Chan, J.K. and D.S. Kapp, *Role of complete lymphadenectomy in endometrioid uterine cancer*. Lancet Oncol, 2007. **8**(9): p. 831-41.

33. Lu, Q., et al., *Comparison of laparoscopy and laparotomy for management of endometrial carcinoma: a prospective randomized study with 11-year experience*. J Cancer Res Clin Oncol, 2013. **139**(11): p. 1853-9.
34. Kalogiannidis, I., et al., *Laparoscopy-assisted vaginal hysterectomy compared with abdominal hysterectomy in clinical stage I endometrial cancer: safety, recurrence, and long-term outcome*. Am J Obstet Gynecol, 2007. **196**(3): p. 248.e1-8.
35. Creutzberg, C.L., et al., *Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. PORTEC Study Group. Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma*. Lancet, 2000. **355**(9213): p. 1404-11.
36. Nout, R.A., et al., *Vaginal brachytherapy versus pelvic external beam radiotherapy for patients with endometrial cancer of high-intermediate risk (PORTEC-2): an open-label, non-inferiority, randomised trial*. Lancet, 2010. **375**(9717): p. 816-23.
37. Kong, A., et al., *Adjuvant radiotherapy for stage I endometrial cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2012(4): p. Cd003916.
38. Lin, L.L., et al., *External radiotherapy versus vaginal brachytherapy for patients with intermediate risk endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 2007. **106**(1): p. 215-20.
39. Singh, M., et al., *Relationship of estrogen and progesterone receptors to clinical outcome in metastatic endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study*. Gynecol Oncol, 2007. **106**(2): p. 325-33.
40. Lai, C.H., et al., *Successful pregnancy after tamoxifen and megestrol acetate therapy for endometrial carcinoma*. Br J Obstet Gynaecol, 1994. **101**(6): p. 547-9.
41. Burke, W.M., et al., *Endometrial cancer: a review and current management strategies: part I*. Gynecol Oncol, 2014. **134**(2): p. 385-92.
42. Pike, M.C., et al., *Estrogen-progestin replacement therapy and endometrial cancer*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(15): p. 1110-6.
43. R, L.-R., *Taschenlehrbuch Histologie*. Vol. 3. Auflage. 2009, Stuttgart New York: Thieme-Verlag.
44. Akhmedkhanov, A., A. Zeleniuch-Jacquotte, and P. Toniolo, *Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer: review of the evidence and research perspectives*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **943**: p. 296-315.
45. Higgins, K.J., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression is induced by 17beta-estradiol in ZR-75 breast cancer cells by estrogen receptor alpha/Sp proteins*. Endocrinology, 2006. **147**(7): p. 3285-95.
46. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. N Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
47. Bernstein, L., et al., *Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(19): p. 1654-62.
48. Weiderpass, E., et al., *Trends in corpus uteri cancer mortality in member states of the European Union*. Eur J Cancer, 2014. **50**(9): p. 1675-84.
49. Creutzberg, C.L., et al., *Nomograms for prediction of outcome with or without adjuvant radiation therapy for patients with endometrial cancer: a pooled analysis of PORTEC-1 and PORTEC-2 trials*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2015. **91**(3): p. 530-9.
50. AlHilli, M.M., et al., *Risk-scoring models for individualized prediction of overall survival in low-grade and high-grade endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 2014. **133**(3): p. 485-93.

51. Bendifallah, S., et al., *External validation of nomograms designed to predict lymphatic dissemination in patients with early-stage endometrioid endometrial cancer: a multicenter study*. Am J Obstet Gynecol, 2015. **212**(1): p. 56.e1-7.
52. Moir-Meyer, G.L., et al., *Rare germline copy number deletions of likely functional importance are implicated in endometrial cancer predisposition*. Hum Genet, 2015. **134**(3): p. 269-78.
53. Soslow, R.A., *Endometrial carcinomas with ambiguous features*. Semin Diagn Pathol, 2010. **27**(4): p. 261-73.
54. Frost, J.A., et al., *Lymphadenectomy for the management of endometrial cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2015(9): p. Cd007585.
55. Creasman, W.T., *Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer*. Cancer, 1993. **71**(4 Suppl): p. 1467-70.
56. Srijaipracharoen, S., et al., *Expression of ER, PR, and Her-2/neu in endometrial cancer: a clinicopathological study*. Asian Pac J Cancer Prev, 2010. **11**(1): p. 215-20.
57. Lin, J., et al., *Increased expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene in human endometrial carcinomas*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **79**(5): p. 1483-91.
58. Ji, Q., et al., *Increased expression of human luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor mRNA in human endometrial cancer*. Mol Cell Probes, 2002. **16**(4): p. 269-75.
59. Davies, S., et al., *Regulation of endometrial cancer cell growth by luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH)*. Br J Cancer, 2000. **83**(12): p. 1730-4.
60. Noci, I., et al., *Longstanding survival without cancer progression in a patient affected by endometrial carcinoma treated primarily with leuprolide*. Br J Cancer, 2001. **85**(3): p. 333-6.
61. Zygmunt, M., et al., *Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 5290-6.
62. Naumov, G.N., et al., *Tumor-vascular interactions and tumor dormancy*. Apms, 2008. **116**(7-8): p. 569-85.
63. Franken, B., et al., *Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(5): p. R133.
64. de Bono, J.S., et al., *Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(19): p. 6302-9.
65. Bidard, F.C., et al., *Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data*. Lancet Oncol, 2014. **15**(4): p. 406-14.
66. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(8): p. 781-91.
67. Ni, T., et al., *Detection of circulating tumour cells may add value in endometrial cancer management*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016. **207**: p. 1-4.
68. Lucci, A., et al., *Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study*. Lancet Oncol, 2012. **13**(7): p. 688-95.
69. Zhang, L., et al., *Gene expression profiles in normal and cancer cells*. Science, 1997. **276**(5316): p. 1268-72.
70. Kolbl, A.C., et al., *Endometrial Adenocarcinoma: Analysis of Circulating Tumour Cells by RT-qPCR*. Anticancer Res, 2016. **36**(6): p. 3205-9.

71. Andergassen, U., et al., *Detection of Circulating Tumour Cells from Blood of Breast Cancer Patients via RT-qPCR*. *Cancers (Basel)*, 2013. **5**(4): p. 1212-20.
72. Andergassen, U., et al., *Detection of tumor cell-specific mRNA in the peripheral blood of patients with breast cancer-evaluation of several markers with real-time reverse transcription-PCR*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(1): p. 1093-104.
73. Boenisch, T., *Immunchemische Färbemethoden*. Vol. 3. 2003, Hamburg: DakoCytomation Corp. 88.
74. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. *Pathologe*, 1987. **8**(3): p. 138-40.
75. Navarro, E., et al., *Real-time PCR detection chemistry*. *Clin Chim Acta*, 2015. **439**: p. 231-50.
76. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
77. Holland, P.M., et al., *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(16): p. 7276-80.
78. Bremnes, R.M., C. Camps, and R. Sirera, *Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood*. *Lung Cancer*, 2006. **51**(2): p. 143-58.
79. Bandiera, E., et al., *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor serum determination in women with ovarian cancer*. *ISRN Obstet Gynecol*, 2012. **2012**: p. 245756.
80. Du, K., H.Y. Gong, and Z.M. Gong, *Influence of serum VEGF levels on therapeutic outcome and diagnosis/prognostic value in patients with cervical cancer*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(20): p. 8793-6.
81. Guidi, A.J., et al., *Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma*. *Cancer*, 1996. **78**(3): p. 454-60.
82. Wang, J., et al., *Expression profiling and significance of VEGF-A, VEGFR2, VEGFR3 and related proteins in endometrial carcinoma*. *Cytokine*, 2014. **68**(2): p. 94-100.
83. Dai, H., et al., *Expression of Efp, VEGF and bFGF in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue*. *Oncol Rep*, 2010. **23**(3): p. 795-9.
84. Piastowska-Ciesielska, A.W., et al., *Analysis of the expression of angiotensin II type 1 receptor and VEGF in endometrial adenocarcinoma with different clinicopathological characteristics*. *Tumour Biol*, 2012. **33**(3): p. 767-74.
85. Mahecha, A.M. and H. Wang, *The influence of vascular endothelial growth factor-A and matrix metalloproteinase-2 and -9 in angiogenesis, metastasis, and prognosis of endometrial cancer*. *Onco Targets Ther*, 2017. **10**: p. 4617-4624.
86. North, S., M. Moenner, and A. Bikfalvi, *Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors*. *Cancer Lett*, 2005. **218**(1): p. 1-14.
87. Christoffersson, G., et al., *VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue*. *Blood*, 2012. **120**(23): p. 4653-62.
88. Latil, A., et al., *VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms*. *Int J Cancer*, 2000. **89**(2): p. 167-71.

89. Martins, S.F., et al., *Clinicopathological correlation and prognostic significance of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in colorectal cancer*. *Cancer Genomics Proteomics*, 2013. **10**(2): p. 55-67.
90. Raspollini, M.R., et al., *Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in advanced ovarian serous carcinoma*. *Int J Gynecol Cancer*, 2004. **14**(5): p. 815-23.
91. Pierce, J.G. and T.F. Parsons, *Glycoprotein hormones: structure and function*. *Annu Rev Biochem*, 1981. **50**: p. 465-95.
92. Neulen, J., et al., *Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. **80**(6): p. 1967-71.
93. Robertson, D., et al., *Urinary vascular endothelial growth factor concentrations in women undergoing gonadotrophin treatment*. *Hum Reprod*, 1995. **10**(9): p. 2478-82.
94. Toth, P., et al., *Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. **79**(1): p. 307-15.
95. Munir, I., et al., *Mitogen-activated protein kinase activation and regulation of cyclooxygenase 2 expression by platelet-activating factor and hCG in human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1B*. *J Reprod Fertil*, 1999. **117**(1): p. 49-59.
96. Noci, I., et al., *hLH/hCG-receptor expression correlates with in vitro invasiveness in human primary endometrial cancer*. *Gynecol Oncol*, 2008. **111**(3): p. 496-501.
97. Jankowska, A.G., et al., *Expression of hCG and GnRHs and their receptors in endometrial carcinoma and hyperplasia*. *Int J Gynecol Cancer*, 2010. **20**(1): p. 92-101.
98. Lenhard, M., et al., *Immunosuppressive Glycodelin A is an independent marker for poor prognosis in endometrial cancer*. *BMC Cancer*, 2013. **13**: p. 616.
99. Julkunen, M., et al., *Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy*. *Br J Obstet Gynaecol*, 1985. **92**(11): p. 1145-51.
100. Koistinen, H., et al., *Differences in glycosylation and sperm-egg binding inhibition of pregnancy-related glycodelin*. *Biol Reprod*, 2003. **69**(5): p. 1545-51.
101. Koistinen, H., et al., *The role of glycodelin in cell differentiation and tumor growth*. *Scand J Clin Lab Invest*, 2009. **69**(4): p. 452-9.
102. Koistinen, H., et al., *Glycodelin reduces carcinoma-associated gene expression in endometrial adenocarcinoma cells*. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. **193**(6): p. 1955-60.
103. Ohta, K., et al., *Glycodelin blocks progression to S phase and inhibits cell growth: a possible progesterone-induced regulator for endometrial epithelial cell growth*. *Mol Hum Reprod*, 2008. **14**(1): p. 17-22.
104. Seppala, M., et al., *Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation*. *Endocr Rev*, 2002. **23**(4): p. 401-30.
105. Oehler, M.K., M.C. Rees, and R. Bicknell, *Steroids and the endometrium*. *Curr Med Chem*, 2000. **7**(5): p. 543-60.
106. Kumar, N.S., et al., *Selective down-regulation of progesterone receptor isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cells: implications for unopposed estrogen action*. *Cancer Res*, 1998. **58**(9): p. 1860-5.

107. Wang, A., et al., *Expression of GPR30, ERalpha and ERbeta in endometrium during window of implantation in patients with polycystic ovary syndrome: a pilot study.* Gynecol Endocrinol, 2011. **27**(4): p. 251-5.
108. Revankar, C.M., et al., *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling.* Science, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
109. Plante, B.J., et al., *G protein-coupled estrogen receptor (GPER) expression in normal and abnormal endometrium.* Reprod Sci, 2012. **19**(7): p. 684-93.
110. Huang, G.S., et al., *Co-expression of GPR30 and ERbeta and their association with disease progression in uterine carcinosarcoma.* Am J Obstet Gynecol, 2010. **203**(3): p. 242.e1-5.
111. Smith, H.O., et al., *GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma.* Am J Obstet Gynecol, 2007. **196**(4): p. 386.e1-9; discussion 386.e9-11.
112. He, Y.Y., et al., *Estrogenic G protein-coupled receptor 30 signaling is involved in regulation of endometrial carcinoma by promoting proliferation, invasion potential, and interleukin-6 secretion via the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase pathway.* Cancer Sci, 2009. **100**(6): p. 1051-61.
113. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 127-37.
114. Buza, N., D.M. Roque, and A.D. Santin, *HER2/neu in Endometrial Cancer: A Promising Therapeutic Target With Diagnostic Challenges.* Arch Pathol Lab Med, 2014. **138**(3): p. 343-50.
115. Morrison, C., et al., *HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients.* J Clin Oncol, 2006. **24**(15): p. 2376-85.
116. Sugimoto, T., et al., *Correlative expression of cyclooxygenase-1 (Cox-1) and human epidermal growth factor receptor type-2 (Her-2) in endometrial cancer.* Kobe J Med Sci, 2007. **53**(5): p. 177-87.
117. Kounelis, S., et al., *Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature.* Mod Pathol, 2000. **13**(4): p. 379-88.
118. Rolitsky, C.D., et al., *HER-2/neu amplification and overexpression in endometrial carcinoma.* Int J Gynecol Pathol, 1999. **18**(2): p. 138-43.
119. Jiang, W., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer.* Crit Rev Oncol Hematol, 1999. **29**(3): p. 209-48.
120. Crouch, S., C.S. Spidel, and J.S. Lindsey, *HGF and ligation of alphavbeta5 integrin induce a novel, cancer cell-specific gene expression required for cell scattering.* Exp Cell Res, 2004. **292**(2): p. 274-87.
121. McKinlay, S.M., D.J. Brambilla, and J.G. Posner, *The normal menopause transition.* Maturitas, 1992. **14**(2): p. 103-15.
122. GEKID, *Krebs in Deutschland 2013/2014. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.* 2017.
123. Shabani, N., et al., *Prognostic significance of oestrogen receptor alpha (ERalpha) and beta (ERbeta), progesterone receptor A (PR-A) and B (PR-B) in endometrial carcinomas.* Eur J Cancer, 2007. **43**(16): p. 2434-44.
124. Jeschke, U., et al., *Development and characterization of monoclonal antibodies for the immunohistochemical detection of glycodeilin A in decidual, endometrial and gynaecological tumour tissues.* Histopathology, 2006. **48**(4): p. 394-406.

125. GmbH, A.A., *Polyclonal Antibody to Luteinizing Hormone Receptor (LHCGR) (C-term)-Aff-Purified*. 2017: <https://m1.acris-antibodies.com/pdf/SP4594P.pdf>. p. 2.
126. Systems, Z. *ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit Gebrauchsanweisung*. 2013 09.08.2013 19.08.2016].
127. AG, B., *1:1 Mischung Dulbecco's MEM / Ham's F-12 Flüssig- und Pulvermedium*
128. Assembly, W.M.A.G. *WMA Declaration of Helsinki*. 2008 World Medical Association [cited 2016; 5].
129. Fernandez-Shaw, S., et al., *Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres*. Hum Reprod, 1992. **7**(2): p. 156-61.
130. Zhang, L., M.C. Rees, and R. Bicknell, *The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. Expression of mRNAs for angiogenic polypeptides basally and on oestrogen and progesterone challenges*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 1)**: p. 323-31.
131. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
132. Gerard, G.F., et al., *Influence on stability in Escherichia coli of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*. Dna, 1986. **5**(4): p. 271-9.
133. Kotewicz, M.L., et al., *Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in Escherichia coli*. Gene, 1985. **35**(3): p. 249-58.
134. Ivitrogen. *Super Script III First-Strand Synthesis SuperMix*. Produktbeschreibung 2010 [cited 2016 24.08.2016].
135. Huggett, J., et al., *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun, 2005. **6**(4): p. 279-84.
136. Talvensaaari-Mattila, A., Y. Soini, and M. Santala, *VEGF and its receptors (flt-1 and KDR/flk-1) as prognostic indicators in endometrial carcinoma*. Tumour Biol, 2005. **26**(2): p. 81-7.
137. de Carvalho Fraga, C.A., et al., *Increased VEGFR2 and MMP9 protein levels are associated with epithelial dysplasia grading*. Pathol Res Pract, 2014. **210**(12): p. 959-64.
138. Kampmann, E., et al., *VEGFR2 predicts decreased patients survival in soft tissue sarcomas*. Pathol Res Pract, 2015. **211**(10): p. 726-30.
139. Fan, X., et al., *VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium*. Faseb j, 2008. **22**(10): p. 3571-80.
140. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis*. N Engl J Med, 2008. **358**(19): p. 2039-49.
141. Aghajanian, C., et al., *Phase II trial of bevacizumab in recurrent or persistent endometrial cancer: a Gynecologic Oncology Group study*. J Clin Oncol, 2011. **29**(16): p. 2259-65.
142. Alvarez, E.A., et al., *Phase II trial of combination bevacizumab and temsirolimus in the treatment of recurrent or persistent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecol Oncol, 2013. **129**(1): p. 22-7.
143. Viswanathan, A.N., et al., *A prospective feasibility study of radiation and concurrent bevacizumab for recurrent endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 2014. **132**(1): p. 55-60.
144. Rose, P.G., et al., *Paclitaxel, Carboplatin, and Bevacizumab in Advanced and Recurrent Endometrial Carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2017. **27**(3): p. 452-458.

145. Bogliolo, S., et al., *Current opinion on bevacizumab on endometrial cancer treatment*. Expert Opin Biol Ther, 2015. **15**(2): p. 299-307.
146. Tabernero, J., et al., *Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2015. **16**(5): p. 499-508.
147. Fuchs, C.S., et al., *Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2014. **383**(9911): p. 31-39.
148. Trenti, A., et al., *Estrogen, Angiogenesis, Immunity and Cell Metabolism: Solving the Puzzle*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(3).
149. Stoner, M., et al., *Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins*. Oncogene, 2004. **23**(5): p. 1052-63.
150. Lipovka, Y. and J.P. Konhilas, *The complex nature of oestrogen signalling in breast cancer: enemy or ally?* Biosci Rep, 2016. **36**(3).
151. Higgins, K.J., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression is down-regulated by 17beta-estradiol in MCF-7 breast cancer cells by estrogen receptor alpha/Sp proteins*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(2): p. 388-402.
152. Arcangeli, A., et al., *The LH/hCG Axis in Endometrial Cancer: A New Target in the Treatment of Recurrent or Metastatic Disease*. Obstet Gynecol Int, 2010. **2010**.
153. Yuri, T., et al., *Human chorionic gonadotropin suppresses human breast cancer cell growth directly via p53-mediated mitochondrial apoptotic pathway and indirectly via ovarian steroid secretion*. Anticancer Res, 2014. **34**(3): p. 1347-54.
154. Lopez, D., et al., *Purified human chorionic gonadotropin induces apoptosis in breast cancer*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(9): p. 2837-44.
155. Brokken, L.J., et al., *Association of polymorphisms in genes encoding hormone receptors ESR1, ESR2 and LHCGR with the risk and clinical features of testicular germ cell cancer*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **351**(2): p. 279-85.
156. Kundu, S., et al., *Expression of LH receptor in nonpregnant mouse endometrium: LH induction of 3beta-HSD and de novo synthesis of progesterone*. J Endocrinol, 2012. **215**(1): p. 151-65.
157. Yung, Y., et al., *Progesterone antagonist, RU486, represses LHCGR expression and LH/hCG signaling in cultured luteinized human mural granulosa cells*. Gynecol Endocrinol, 2014. **30**(1): p. 42-7.
158. Scholz, C., et al., *Glycodelin A is a prognostic marker to predict poor outcome in advanced stage ovarian cancer patients*. BMC Res Notes, 2012. **5**: p. 551.
159. Jeschke, U., et al., *Stimulation of hCG and inhibition of hPL in isolated human trophoblast cells in vitro by glycodelin A*. Arch Gynecol Obstet, 2003. **268**(3): p. 162-7.
160. Kolbl, A.C., et al., *Glycodelin A - a famous lipocalin and its role in breast cancer*. Anticancer Res, 2014. **34**(3): p. 1079-85.
161. Guttery, D.S., et al., *Racial differences in endometrial cancer molecular portraits in The Cancer Genome Atlas*. Oncotarget, 2018. **9**(24): p. 17093-17103.
162. Oehler, M.K., A. Brand, and G.V. Wain, *Molecular genetics and endometrial cancer*. J Br Menopause Soc, 2003. **9**(1): p. 27-31.

163. Esteller, M., J. Xercavins, and J. Reventos, *Advances in the molecular genetics of endometrial cancer (Review)*. *Oncol Rep*, 1999. **6**(6): p. 1377-82.
164. Kiss, I., et al., *Correlation Between Disease Stage and the Presence of Viable Circulating Tumor Cells in Endometrial Cancer*. *Anticancer Res*, 2018. **38**(5): p. 2983-2987.
165. Kolbl, A.C., et al., *Quantitative PCR marker genes for endometrial adenocarcinoma*. *Mol Med Rep*, 2016. **14**(3): p. 2199-205.

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 A: G3 Endometriumkarzinom mit soliden trabekulären Strukturen, nukleären Atypien und nekrotischen Anteilen; B: Gut differenziertes endometrioides Karzinom mit weniger als 5% solidem Tumoranteil [17]	10
Abbildung 2: A: Atypische endometrioide Hyperplasie- gestörte Architektur mit glandulären Neuformationen, welche die stromalen Grenzen überschreiten [19]	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung häufiger Risikofaktoren im endometrioiden Karzinom	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Rolle von VEGF im endometrioiden Karzinom, modifiziert nach [84]	25
Abbildung 5: Schematische Skizzierung der Zielsetzung in der vorliegenden Arbeit.....	29
Abbildung 6: Positivkontrolle LHCGR (Endometrium).....	7
Abbildung 7: Positivkontrolle LHCGR (Mamma)	7
Abbildung 8: Positivkontrolle VEGFR2 (Mamma)	7
Abbildung 9: VEGFR2 - Färbeintensität 1.....	2
Abbildung 10: VEGFR2 - Färbeintensität 2.....	2
Abbildung 11: VEGFR2 - Färbeintensität 3.....	2
Abbildung 12: VEGFR2 – Endotheliale Anfärbung.....	2
Abbildung 13: LHCGR - Färbeintensität 1.....	2
Abbildung 14: LHCGR - Färbeintensität 2.....	2
Abbildung 15: LHCGR - Färbeintensität 3.....	2

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C54-C55 nach GEKID „Krebs in Deutschland“ [1]	8
Tabelle 2: Gegenüberstellung der dualistischen Einteilung nach Bokhman (1983) modifiziert	9
Tabelle 3: TNM- und FIGO-Klassifikation von 1988 mit Modifikation von 2010.....	14
Tabelle 4: 5-Jahres-Überleben bei Erkrankung an einem Endometriumkarzinom in Abhängigkeit des FIGO-Stadiums nach Creasman et al. (2006) [52].....	18
Tabelle 5: Tumorcharakteristika nach dem TNM-System im Kollektiv.....	33

Tabelle 6: Hormonrezeptorstatus für Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) und Progesteronrezeptoren (PR-A und PR-B) der Gewebeproben im untersuchten Kollektiv, [n] gesamt=203	36
Tabelle 7: Überlebensstatus der Patientinnen des untersuchten Tumorkollektivs.....	37
Tabelle 8: Eigenschaften verwendeter Antikörper und deren Konzentrationen	2
Tabelle 9: Färbungen und Kontrollen.....	6
Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Auswertung immunhistochemischer Färbungen mithilfe des Immunreactive Scores).....	2
Tabelle 11: Charakteristika der verwendeten Zelllinien endometrioider Adenokarzinome.....	4
Tabelle 12: Charakterisierung der verwendeten Marker-Gene und Taq-Man Real-Time PCR Primer (Applied BioSystems, Foster City, Kalifornien (USA)).....	10
Tabelle 13: Kennzahlen der VEGFR2- und LHCGR-Expression im Kollektiv.....	12
Tabelle 14: VEGFR2 und LHCGR-Expression nach IRS-Wert	12
Tabelle 15: VEGFR2-Expression bezogen auf das Alter der Patientinnen.....	13
Tabelle 16: LHCGR-Expression bezogen auf das Alter der Patientinnen	13
Tabelle 17: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit des T-Stadiums	14
Tabelle 18: LHCGR – Expression in Abhängigkeit des T-Stadiums.....	14
Tabelle 19: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus.....	14
Tabelle 20: LHCGR – Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus	15
Tabelle 21: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit des Metastasenstatus.....	15
Tabelle 22: LHCGR – Expression in Abhängigkeit des Metastasenstatus	15
Tabelle 23: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der FIGO-Klassifikation	16
Tabelle 24: LHCGR – Expression in Abhängigkeit der FIGO-Klassifikation	16
Tabelle 25: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit des Gradings.....	16
Tabelle 26: LHCGR – Expression in Abhängigkeit des Gradings.....	17
Tabelle 27: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der Östrogenrezeptoren ER α und ER β ..	17
Tabelle 28: LHCGR – Expression in Abhängigkeit der Östrogenrezeptoren ER α und ER β ..	18
Tabelle 29: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der Progesteronrezeptoren PR-A und PR-B	18
Tabelle 30: LHCGR – Expression in Abhängigkeit der Progesteronrezeptoren PR-A und PR-B	19

Tabelle 31: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der Glycodelinrezeptor-Expression Glycodelin- A und Glycodelin-Poly.....	20
Tabelle 32: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der Glycodelinrezeptor-Expression Glycodelin- A und Glycodelin-Poly.....	20
Tabelle 33: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit der Progression.....	21
Tabelle 34: LHCGR – Expression in Abhängigkeit der Progression.....	21
Tabelle 35: VEGFR2 – Expression in Abhängigkeit des Auftretens von Lokalrezidiven	21
Tabelle 36: LHCGR – Expression in Abhängigkeit des Auftretens von Lokalrezidiven.....	21
Tabelle 37: RNA-Konzentration und Ratio der untersuchten Zelllinien.....	24
Tabelle 38: RQ-Werte der untersuchten Gene und Zelllinien [n.d.= not detected]	26
Tabelle 39: Verzeichnis der verwendeten Reagenzien	44
Tabelle 40: Verzeichnis der Gebrauch- und Verbrauchsmaterialien	46

6.3 Graphenverzeichnis

Graph 1: Diagramm zur Alters-Häufigkeits-Verteilung im vorliegenden Kollektiv [in Jahren].	32
Graph 2: Aufteilung der Fälle im untersuchten Kollektiv nach FIGO-Klassifikation von 1998 mit Modifikation von 2010, [n] gesamt=203	34
Graph 3: Aufteilung der untersuchten Tumorpräparate entsprechend des Gradings, [n] gesamt=203	35
Graph 4: Darstellung des Überlebensstatus in Relation zum Gesamtkollektiv	37
Graph 5: Darstellung des Überlebensstatus der Patientinnen im untersuchten Kollektiv (hell=lebend, dunkel=verstorben)	22
Graph 6: Graph 5: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben nach Diagnosestellung abhängig vom IRS der VEGFR2-Expression	23
Graph 7: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben nach Diagnosestellung abhängig vom IRS der LHCGR-Expression	23
Graph 8: Quantitative Genexpression der Hormonrezeptoren in endometrialen Adenokarzinom-Zelllinien nach QR-Werten.....	27
Graph 9: Quantitative Genexpression von Her-2, MIG7 und VEGFR2 in endometrialen Adenokarzinom-Zelllinien nach QR-Werten.....	29

7. Eidesstaatliche Versicherung

Amelie Birk

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

Einfluss immunmodulatorischer Faktoren im frühen und späten Endometriumkarzinom

Selbstständig 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 ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 16.05.2019

Amelie Elisabeth Birk

8. Danksagung

Die viele Arbeit, an deren Ende ich mich nun bedanken möchte, wäre durch die wundervolle Unterstützung und Hilfe einiger Menschen nicht möglich gewesen.

Daher danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.rer.nat. Udo Jeschke für die freundliche Überlassung des Themas und seine hervorragende Unterstützung auf allen Ebenen der Projektdurchführung, sowohl in fachlicher als auch in menschlicher Hinsicht.

Meine beiden wissenschaftlichen Betreuer Priv.-Doz. Dr. Dr. med. Ulrich Andergassen und Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl hatten stets ein offenes Ohr für alle meine Fragen und Schwierigkeiten. Sie standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite und führten mich an ihrer Hand in die Welt der Wissenschaft.

Außerdem gilt mein herzlichster Dank Christina Kuhn und Simone Hoffmann, die mit ihrer offenherzigen Art und liebevollen Unterstützung meine ersten Schritte im Labor ermöglichten. Sie haben mir so viel Freude an der Arbeit vermittelt, dass ich mich jeden Tag wieder neu auf das „Labor“ gefreut habe.

Mein größter Dank geht an meine wundervollen Eltern, die stets hinter mir standen und mich mit viel Liebe und Geduld bei der Verwirklichung aller meiner Träume unterstützt haben. Danke an meine vier fantastischen Brüder Clemens, Lukas, Jonas und Leon, die mich mit viel Humor und Liebe immer wieder neu motiviert haben.

Vielen lieben Dank.