

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,

Klinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Sven Mahner

**Untersuchung von NRIP1 und LCoR zur prognostischen  
Bedeutung bei Patientinnen mit Vulvakarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Juliane Bomhard

aus München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Nina Ditsch

Prof. Dr. Reinhold Knitza

Mitbetreuung durch die

promovierte Mitarbeiterin: Dr. Helene Heidegger-Steger

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2022

Für meine Oma, Ingrid Bomhard.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
1.1 DAS VULVAKARZINOM .....	6
1.1.1 <i>Epidemiologie</i> .....	6
1.1.2 <i>Ätiologie und Risikofaktoren</i> .....	7
1.1.2.1 Humane Papillomaviren.....	7
1.1.2.2 HPV-unabhängige Risikofaktoren .....	7
1.1.3 <i>Histologische Einteilung</i> .....	8
1.1.3.1 Vulväre intraepitheliale Neoplasie (VIN) .....	8
1.1.3.2 Invasives Vulvakarzinom .....	9
1.1.4 <i>Prävention</i> .....	10
1.1.4.1 Primärprävention .....	10
1.1.4.1.1 HPV Impfung.....	10
1.1.4.1.2 Lichen sclerosus .....	11
1.1.4.2 Sekundärprävention .....	12
1.1.5 <i>Diagnostik</i> .....	12
1.1.5.1 Symptomatik .....	12
1.1.5.2 Klinische Diagnostik .....	12
1.1.5.3 Grading / Staging / TNM .....	13
1.1.6 <i>Therapie</i> .....	15
1.1.6.1 Stadiengerechte Therapie .....	15
1.1.6.2 Strahlen- und Chemotherapie.....	18
1.2 AKTUELLE FORSCHUNG ZU PROGNOSTISCHEN BIOMARKERN DES VULVAKARZINOMS, FRAGESTELLUNG .....	19
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>21</b>
2.1 MATERIAL.....	21
2.2 IMMUNHISTOCHEMIE .....	21
2.2.1 <i>Anfertigung der Paraffinschnitte</i> .....	21
2.2.2 <i>Ablauf der immunhistochemischen Färbung</i> .....	21
2.3 ZELLKULTUR .....	22
2.3.1 <i>Kultivierung der Zelllinien</i> .....	22
2.3.2 <i>Splitten der Zellen</i> .....	23
2.3.3 <i>Immunzytochemie zum Nachweis von NRIP1 und LCoR</i> .....	23
2.3.4 <i>Immunzytochemische Auswertung</i> .....	25
2.3.5 <i>WST-Test zur Überprüfung der Zellviabilität unter Stimulation mit 9-cis-Retinsäure und 15dPGJ<sub>2</sub></i> .....	25
2.3.5.1 Durchführung des WST-1-Assays.....	26
2.3.5.2 Auswertung des WST-1-Assays.....	27
2.3.6 <i>Doppelimmunfluoreszenzfärbung</i> .....	27
2.3.7 <i>Quantifizierung der lebenden Zellen bei der Stimulation mit 10nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub></i> .....	28
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>29</b>
3.1 IMMUNHISTOLOGIE.....	29
3.1.1 <i>Expression von LCoR</i> .....	29
3.1.1.1 LCoR und Grading.....	30
3.1.1.2 LCoR und T-Status .....	31
3.1.1.3 LCoR und Fokalität .....	32
3.1.2 <i>Expression von NRIP1</i> .....	33
3.1.2.1 NRIP1 und Grading.....	34
3.2 KORRELATIONSANALYSEN .....	36
3.2.1 <i>Negative Korrelation zwischen LCoR und dem Erkrankungsalter</i> .....	36
3.2.2 <i>Positive Korrelation zwischen der zytoplasmatischen Expression von LCoR und dem Grading</i> .....	36
3.2.3 <i>Negative Korrelation zwischen NRIP1 und Tumorgroße</i> .....	36
3.2.4 <i>Positive Korrelation zwischen LCoR und NRIP1</i> .....	36
3.3 ÜBERLEBENSANALYSEN .....	37
3.3.1 <i>Nukleäre LCoR Expression als Überlebensvorteil</i> .....	37
3.3.2 <i>Nukleäre NRIP1 Expression als Vorteil für das rezidivfreie Überleben</i> .....	39
3.4 IMMUNZYTOLOGIE .....	40
3.4.1 <i>LCoR Expression in den Zelllinien A-431 und SW 954</i> .....	40

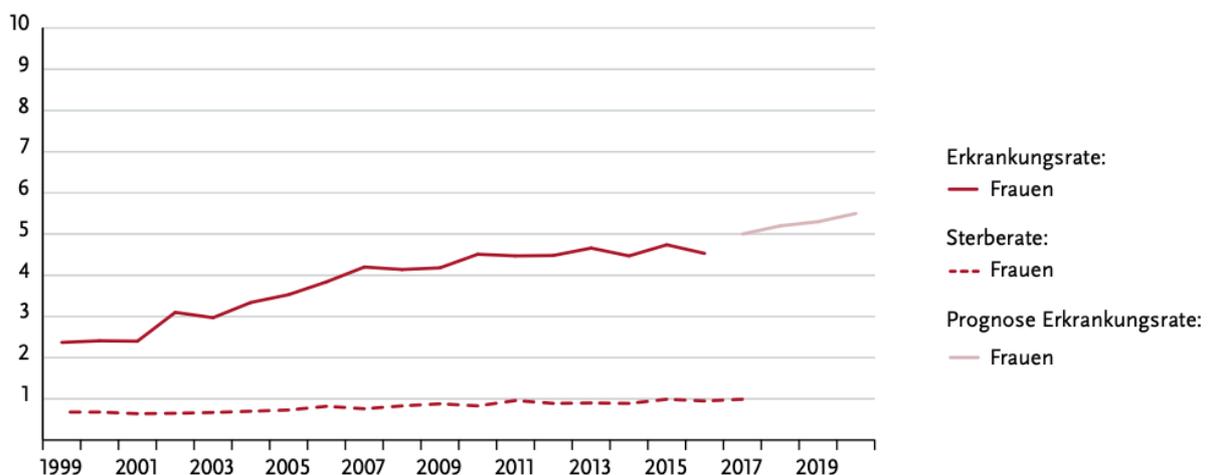
3.4.2 NRIP1 Expression in den Zelllinien A-431 und SW 954.....	41
3.5 WST (WATER SOLUBLE TETRAZOLIUM) ASSAY.....	41
3.5.1 Stimulation der Zelllinien A-431 und SW 954 mit 9-cis-Retinsäure.....	41
3.5.2 Stimulation der Zelllinien A-431 und SW 954 mit 15dPGJ <sub>2</sub> .....	42
3.5.3 Stimulation der Zelllinien A-431 und SW 954 mit 15dPGJ <sub>2</sub> und 9-cis-Retinsäure.....	43
3.6 QUANTIFIZIERUNG DER VIABILITÄT DER ZELLLINIEN A-431 UND SW 954 UNTER STIMULATION MIT 10NM/ML 15DPGJ <sub>2</sub> .....	44
3.7 DOPPELIMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG.....	45
3.7.1 Nukleäre Expression von LCoR und PPARγ in der Zelllinie A-431.....	46
3.7.2 Nukleäre Expression von LCoR und PPARγ in der Zelllinie SW 954.....	47
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>49</b>
4.1 ZUSAMMENFASSUNG.....	49
4.2 LCoR ALS PROGNOTISCHER TUMORMARKER.....	50
4.3 NRIP1 ALS PROGNOTISCHER TUMORMARKER.....	51
4.4 INTERAKTION VON LCoR UND NRIP1.....	52
4.5 IN VITRO VIABILITÄT UNTER 9-CIS-RETINSÄURE IN DEN VULVAKARZINOMZELLLINIEN A-431 UND SW 954.....	52
4.6 IN VITRO VIABILITÄT UNTER STIMULATION MIT 15DPGJ <sub>2</sub> IN DEN VULVAKARZINOMZELLLINIEN A-431 UND SW 954.....	53
4.7 IN VITRO VIABILITÄT UNTER STIMULATION MIT 15DPGJ <sub>2</sub> UND 9-CIS-RETINSÄURE IN DEN VULVAKARZINOMZELLLINIEN A-431 UND SW 954.....	54
4.8 VERLUST VON NUKLEÄRE LCoR UND PPARγ EXPRESSION IN DER DOPPELIMMUN-FLUORESCENZFÄRBUNG IN SW 954 ZELLEN UNTER STIMULATION MIT 15DPGJ <sub>2</sub> .....	55
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>56</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>58</b>
<b>TABELLEN.....</b>	<b>59</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>63</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>71</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>73</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>74</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>75</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Vulvakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Vulvakarzinom gehört zu den selteneren gynäkologischen Karzinomen der Frau mit einer Inzidenz von 44.235 Neuerkrankungen weltweit im Jahr 2018 (1). Mit 16.395 Neuerkrankungen ist dabei eine Häufung in Europa zu sehen. In Deutschland ist seit der Jahrtausendwende ein deutlicher Anstieg der Fallzahlen sowie ein leichter Anstieg der Sterbezahlen zu beobachten (2). Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, fand ein Anstieg der Inzidenz von fast 50% von ca. 2,5 im Jahr 2000 auf 4,5 pro 100.000 Einwohner im Jahr 2016 statt (3). Dies entspricht einer Gesamtzahl von 3330 Neuerkrankungen deutschlandweit im Jahr 2016. Für das Jahr 2020 liegt die vom Robert-Koch-Institut geschätzte Zahl in Deutschland bei ca. 4000 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Der Anstieg ist dabei vor allem in der Gruppe der jüngeren Frauen < 60 Jahren zu beobachten (4).



**Abbildung 1:** Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten des Vulvakarzinoms, Deutschland 1999-2016/2017, Prognose (Inzidenz) bis 2020, je 100.000 (3).

Das mittlere Erkrankungsalter bei Erstdiagnose liegt in Deutschland bei 73 Jahren, wobei in ca. 60% der Fälle ein niedriges Tumorstadium vorliegt. Im Durchschnitt liegt die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland bei 71%, wohingegen sie bei bereits stark fortgeschrittenem Tumorwachstum mit 20% deutlich niedriger ist (2). Es können weltweit und auch deutschlandweit lokale Häufungsphänomene beobachtet werden mit einer Inzidenz von 6,6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in Südafrika (1) und ca. 8 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Saarland (3).

### 1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Der Entstehung des Vulvakarzinoms liegt eine multifaktorielle Genese mit verschiedenen Risikofaktoren zu Grunde. Anhand der humanen Papillomaviren (HPV) können zwei unabhängige Entstehungswege unterschieden werden. Man unterscheidet die HPV-abhängige von der HPV-unabhängigen Genese (5).

#### 1.1.2.1 Humane Papillomaviren

Ebenso wie bei der Genese des Zervixkarzinoms spielen humane Papillomaviren bei der Genese des Vulvakarzinoms eine entscheidende Rolle. Vor allem bei jungen Frauen unter 56 Jahren sind sie häufig mit für die Entstehung eines invasiven Vulvakarzinoms oder einer vulvären intraepithelialen Neoplasie (VIN) verantwortlich. Je nach Kanzerogenität können die humanen Papillomaviren in eine high-risk-Gruppe (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), die für die Entstehung von höhergradigen Dysplasien und Karzinomen verantwortlich sind, und eine low-risk-Gruppe (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 71, 72, 74, 81, 83), die primär Genitalwarzen oder niedriggradige Dysplasien verursachen, eingeteilt werden (6) (7). Wichtige Kofaktoren, die die HPV-assoziierte Kanzerogenese verstärken können, sind Co-Infektionen mit Chlamydien, HIV sowie Nikotinabusus (8). Der in ca. 75% der HPV positiven Fälle nachgewiesene Subtyp am Vulvakarzinom ist HPV 16, auf den mit deutlichem Abstand (in absteigender Häufigkeit) die Subtypen HPV 33, 18, 45, 52, 56, 58 und 31 folgen. Eine groß angelegte retrospektive klinische Studie mit über 2000 Fällen ergab, dass weltweit ungefähr ein Viertel der Vulvakarzinome und ein Großteil (mit einer Prävalenz von ca. 88%) der intraepithelialen vulvären Neoplasien (VIN) HPV-assoziiert sind (9) (5). Eine große Metaanalyse mit über 5000 Fällen ergab ähnliche Werte mit einer HPV-Prävalenz von ca. 40% bezogen auf das invasive Vulvakarzinom und ca.76% bezogen auf die VIN-Läsionen (10).

#### 1.1.2.2 HPV-unabhängige Risikofaktoren

Zu den HPV unabhängigen Risikofaktoren gehören entzündliche Veränderungen der Vulva, die häufig erst im höheren Alter auftreten. Hierzu gehört der Lichen sclerosus (LS), aus dem sich in 4,5% der Fälle eine VIN oder ein invasives Vulvakarzinom mit einer durchschnittlichen Latenzzeit von ca. 10 Jahren entwickelt (11). Ähnlich verhält es sich mit dem Lichen simplex chronicus (LSC), der ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für ein Vulvakarzinom einhergeht (12).

Eine weitere HPV-unabhängige präkanzeröse Läsion ist die differenzierte intraepitheliale vulväre Neoplasie (dVIN), die mit einer Mutation des Tumorproteins p53 sowie einem LSC oder LS assoziiert sein kann (13) (14).

Immunsupprimierte Patientinnen im Rahmen einer Organtransplantation (15) oder auch einer HIV-Infektion (16) haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von diversen Karzinomen, zu denen auch das Vulvakarzinom gehört. Zu weiteren Risikofaktoren gehören Adipositas, Nikotinabusus, ein früher erster Geschlechtsverkehr sowie Promiskuität (17).

### 1.1.3 Histologische Einteilung

Es kann zwischen dem invasiven Vulvakarzinom und seinen Vorstufen, den vulvären intraepithelialen Neoplasien (VIN) unterschieden werden.

#### 1.1.3.1 Vulväre intraepitheliale Neoplasie (VIN)

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Terminologie für die verschiedenen Stadien der VIN diverse Male geändert, wie in Abbildung 2 zu sehen ist. Im Jahr 2012 gab die „international society for the study of vulvovaginal disease“ die aktuelle Terminologie bekannt. Low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL, niedriggradige intraepitheliale Läsionen) und high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL, höhergradige intraepitheliale Läsionen) entstehen in der Regel primär HPV-assoziiert und werden auch unter dem Begriff undifferenzierte VIN (uVIN) zusammengefasst. Die differenzierte VIN (dVIN) hingegen ist in der Regel nicht HPV-assoziiert, sondern tritt vor allem im Rahmen eines länger vorbestehenden Lichen sclerosus auf (18) (19).

ISSVD 1986	ISSVD 2004	LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology) 2012
VIN 1	Flat condylomata or HPV effect	LSIL
VIN 2 and VIN 3	VIN, usual type: 1. VIN, warty type 2. VIN, basaloid type 3. VIN, mixed	HSIL
Differentiated VIN	VIN, differentiated type	Differentiated VIN (dVIN)

**Abbildung 2:** Intraepitheliale vulväre Neoplasie (VIN) und ihre terminologischen Veränderungen (23).

Unbehandelt liegt das Risiko der Entwicklung eines invasiven Karzinoms bei einer HSIL zwischen 9-15%. Unter Behandlung kann das Risiko auf 3-5% gesenkt werden (20) (21). dVIN Läsionen treten mit 2-29% deutlich seltener auf und sind trotzdem für ca. 40% der invasiven Vulvakarzinome verantwortlich. Daraus kann geschlossen werden, dass dVIN Läsionen im Vergleich zu HSIL ein deutlich höheres Entartungspotential aufweisen, wie auch in Abbildung 3 zu Entstehungswegen des Vulvakarzinoms schematisch vereinfacht dargestellt ist (22) (18).

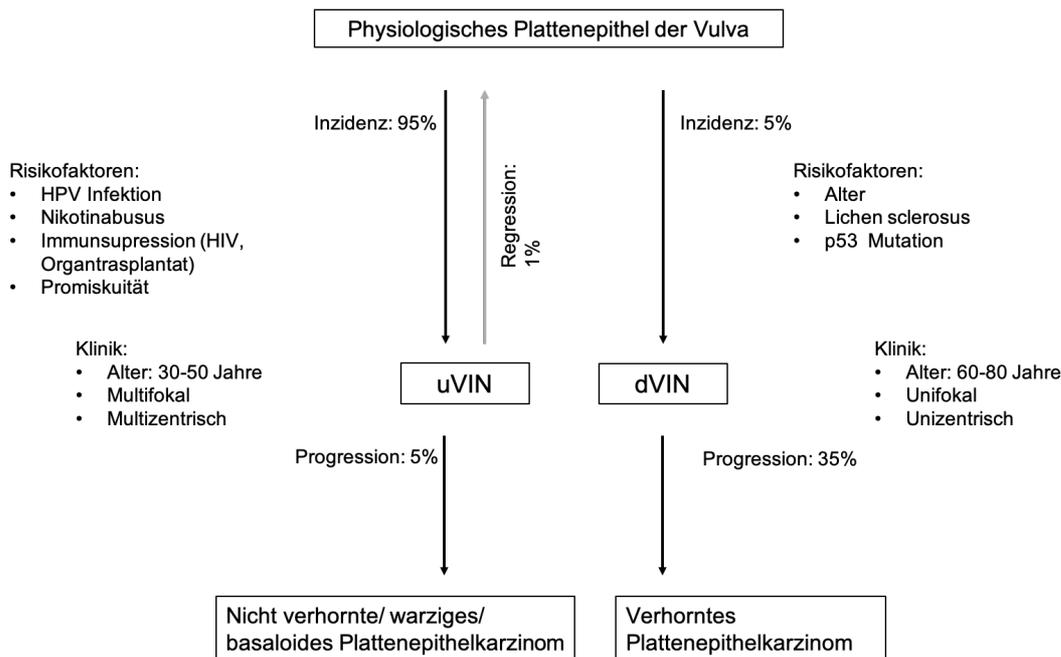


Abbildung 3: Entstehungswege des Vulvakarzinoms, adaptiert nach (12) (22).

### 1.1.3.2 Invasives Vulvakarzinom

Der mit Abstand häufigste histologische Subtyp des invasiven Vulvakarzinoms ist mit über 80% das Plattenepithelkarzinom (23). Dieses kann in weitere Untergruppen unterteilt werden. Das verhornende Plattenepithelkarzinom liegt in 65-80% der Fälle vor. Es entsteht vor allem bei älteren Frauen und tritt in der Regel HPV-unabhängig auf (24) (25) (9). Das nicht verhornende Plattenepithelkarzinom ist vor allem bei jüngeren Frauen zu finden und entsteht in der Regel HPV-abhängig (5) (9). Außerdem können warzige und basaloide Plattenepithelkarzinome abgegrenzt werden, die ebenfalls vermehrt HPV-abhängig und vor allem bei jüngeren Patientinnen auftreten (24). Eine seltene Sonderform stellt das Basalzellkarzinom dar, welches vor allem bei älteren Patientinnen mit einem mittleren Alter von 70 Jahren auftritt, häufig auf Grund seines makroskopischen Bildes primär als Ekzem oder Psoriasis verkannt wird (26) und in ca. 1% der Fälle vorliegt (9).

Ein weiterer sehr seltener Subtyp ist das verruköse Plattenepithelkarzinom, welches weniger als 1% der Vulvakarzinome ausmacht. Insgesamt handelt es sich sowohl bei dem Basalzellkarzinom als auch bei dem verrukösen Karzinom um langsam wachsende, spät metastasierende Karzinome mit einer verhältnismäßig guten Prognose (27) (28).

In sehr seltenen Fällen kommt es zu Karzinomen der Bartholin-Drüsen, die vorwiegend Adeno- oder Plattenepithelkarzinome sind (je ca. 40% der Fälle). Andere histologische Subtypen sind das adenoidzystische Karzinom in ca. 5-15% der Fälle sowie das adenosquamöse (in ca. 5% der Fälle), das kleinzellig-neuroendokrine und das Transitionalzellkarzinom (29) (30).

Ein weiteres seltenes Adenokarzinom der Vulva ist das vulväre Paget-Karzinom, welches aus einem extramammären Morbus Paget entsteht (31) und ca. 1-2% der Vulvakarzinome ausmacht (32).

#### 1.1.4 Prävention

Man unterscheidet zwischen Primärprävention, durch die die Entstehung der Krankheit verhindert werden soll, Sekundärprävention, durch die eine bereits entstandene Erkrankung früh erkannt werden und an ihrem Fortschreiten gehindert werden soll und der Tertiärprävention mit dem Ziel Folgeschäden und Rezidive der Erkrankung früh zu erkennen bzw. zu verhindern (33).

##### 1.1.4.1 Primärprävention

Die Möglichkeiten der Primärprävention ergeben sich aus den Risikofaktoren sowie der Ätiologie des Vulvakarzinoms und seiner Vorstufen.

###### 1.1.4.1.1 HPV Impfung

Weltweit entstehen ca. 40% aller invasiven Vulvakarzinome und ca. 76% aller vulvären intraepithelialen Läsionen (VIN 2/3) HPV-assoziiert (10). Aufgrund dessen wird die prophylaktische HPV-Impfung sowohl von den Autoren der AWMF Leitlinie zur „Impfprävention HPV-assoziiierter Neoplasien“ als auch von den Autoren der AWMF Leitlinie zur „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Vulvakarzinoms und seiner Vorstufen“ empfohlen (6) (25). Diese gründen ihre Empfehlungen auf Studien, die gezeigt haben, dass die Prävalenz für VIN-Läsionen durch eine HPV-Impfung stark gesenkt werden kann (34) (35) (36). Zu der Senkung der Prävalenz des invasiven Vulvakarzinoms gibt es aktuell noch keine publizierten Daten. Mit Hilfe einer kombinierten Analyse von drei

prospektiv randomisierten Studien mit insgesamt 18.174 Probandinnen im Alter von 16-26 Jahren konnte gezeigt werden, dass Frauen, die mit standardisiertem Impfschema geimpft wurden (3 Impfdosen) und zum Impfzeitpunkt HPV-naiv waren über den Zeitraum der Nachuntersuchung von 3 Jahren einen Schutz vor HPV 16/18-assoziierten VIN Läsionen von 100% aufwiesen. Die Probandinnen wurden dabei in eine Placebogruppe und eine Gruppe, die den HPV-Vierfachimpfstoff Gardasil (gegen HPV 16, 18, 11 und 6) erhielt, eingeteilt (35). Auch in der Gruppe der Frauen, die zum Zeitpunkt der ersten Impfung bereits mit HPV infiziert sein konnten, ergab sich eine Prävention für durch HPV 16/18 induzierte VIN 2/3 Läsionen von 71%. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die HPV-Impfung keinen Effekt auf bereits bestehende VIN-Läsionen oder HPV-Infektionen hatte (35) (33).

Nach aktueller Empfehlung der ständigen Impfkommission (STIKO) sollen alle Kinder und Jugendlichen (Mädchen und Jungen) im Alter von 9-14 Jahren eine HPV-Impfung mit dem Impfstoff Gardasil-9 (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58) oder Cervarix (HPV 16, 18) erhalten. Zum 17 Lebensjahr sowie möglichst vor dem ersten Sexualkontakt sollte die Impfung abgeschlossen sein. Auch Jugendliche, die älter als 17 Jahre sind und bereits ihren ersten Sexualkontakt hatten, können von der Impfung noch profitieren, allerdings ist die Wirksamkeit gegenüber HPV-naiven Personen reduziert. Geimpfte Patientinnen und Patienten müssen darauf hingewiesen werden, dass die aktuelle Impfung nicht gegen alle onkogenen HPV-Typen schützt. Daher sollten alle geimpften Frauen weiterhin die jährlichen gynäkologischen Früherkennungsuntersuchungen durchführen lassen (37).

#### 1.1.4.1.2 Lichen sclerosus

HPV-negative Vulvakarzinome können vor allem auf dem Boden chronischer Vulvaerkrankungen wie dem Lichen sclerosus entstehen, dessen genaue Ätiologie zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht sicher geklärt ist. Es wird von einer multifaktoriellen Genese mit traumatischen, autoimmunen, genetischen, hormonellen und entzündlichen Einflussfaktoren ausgegangen (38). Daher besteht hier noch kein konkreter Ansatz für eine Primärprävention. Eine australische, unizentrisch prospektive Longitudinalstudie mit insgesamt 507 Patientinnen mit histologisch gesichertem Lichen sclerosus ergab jedoch vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf die Prävention der Entstehung eines Vulvakarzinoms unter konsequenter topischer Kortikosteroidtherapie. In der Gruppe mit konsequenter Therapie (70,4% der Patientinnen) entwickelte über den Beobachtungszeitraum von im Mittel 5 Jahren keine der Patientinnen eine VIN, wohingegen in der Gruppe mit

niedrigerer Compliance (29,6% der Patientinnen) 7 histologisch gesicherte VINs bzw. invasive Vulvakarzinome entstanden (39) (33).

#### *1.1.4.2 Sekundärprävention*

Es existiert kein spezifisches Screening zur Detektion des Vulvakarzinoms und seiner Vorstufen bei asymptomatischen Patientinnen. Im Rahmen der gynäkologischen Krebsvorsorgeuntersuchungen sollte immer auch die gesamte Vulva inspiziert und untersucht werden. Sobald die Patientin symptomatisch ist, sollte außerdem eine konsequente Abklärung der Symptome erfolgen, sowie die großzügige Indikationsstellung zur histologischen Sicherung des Befundes (25) (33).

#### 1.1.5 Diagnostik

##### *1.1.5.1 Symptomatik*

Das häufigste Frühsymptom des Vulvakarzinoms ist mit einer weiten Spanne von 29-69% ein Pruritus in der betroffenen Region (40) (41). Allgemein ist das Vulvakarzinom im Frühstadium jedoch häufig asymptomatisch. Weitere mögliche Symptome sind Brennen, Dysurie, Dyspareunie oder Ulzerationen. Im fortgeschrittenen Stadium können tastbare Veränderungen wie Hautveränderungen oder Knoten gefunden werden. Deutlich seltener treten Blutungen oder Fluor auf (25) (42).

##### *1.1.5.2 Klinische Diagnostik*

Klinisch gibt es beim Vulvakarzinom kein pathognomonisches Erscheinungsbild. Daher ist eine ausführliche Inspektion und klinische Untersuchung mit Palpation der äußeren Genitalregion, der Vagina sowie der Zervix, einschließlich der ersten Lymphabflussstation in den Leisten beidseits, entscheidend. Bei der Inspektion ist auf Farbveränderungen wie Rötungen oder weißliche Flecken, Oberflächenveränderungen wie Erhabenheit, Einsenkungen und raue Stellen sowie auf unregelmäßige Ränder zu achten. Palpatorisch können vor allem große, fortgeschrittene Tumoren mit fester Konsistenz, fehlender Verschieblichkeit zum umliegenden Gewebe, Ulzerationen und Blutungen imponieren. Eine Vulvoskopie mittels eines Kolposkops ermöglicht eine bessere inspektorische Beurteilung auch makroskopisch unauffälliger Areale. Hier kann, genau wie bei der Kolposkopie der Portio, die Applikation von 3-5%iger Essigsäure durchgeführt werden, um entartetes Gewebe durch eine Weißfärbung zu demaskieren (42). Wichtig ist hier zu beachten, dass die Applikation von Essigsäure auch bei vulvagesunden Frauen im Bereich des

Scheidenvorhofs eine diffuse Weißfärbung verursachen kann (43). Für eine Biopsie sollte mittels Vulvoskopie der Ort der maximalen makroskopischen Veränderung gewählt werden. Auffällige Läsionen im Randbereich sollten ggf. ebenfalls biopsiert werden, um die topographische Ausdehnung beurteilen zu können. Die Anwendung der Toluidinblauprobe mit 1%iger Toluidinblaulösung ist wegen der hohen Rate an falsch-negativ Ergebnissen nicht mehr empfohlen. Auch die zytologische Diagnostik spielt an der Vulva auf Grund ihrer geringen Spezifität nur eine untergeordnete Rolle (25).

#### *1.1.5.3 Grading / Staging / TNM*

Die histologische Diagnostik ist das entscheidende Mittel zur Diagnosesicherung und sollte bei jeder auffälligen, nicht abheilenden Läsion unklarer Ursache erfolgen. Hierbei kann zwischen zwei Entnahmetechniken unterschieden werden: Der Probebiopsie und der Exzisionsbiopsie. Die Probebiopsie wird in der Regel mit einer Stanze durchgeführt und erfasst alle Hautschichten bis zum Subkutangewebe. Bei Multifokalität können mehrere Biopsien entnommen werden, um die Ausdehnung adäquat beurteilen zu können. Die Exzisionsbiopsie ist bei unifokalen, kleinen Läsionen sowie bei Melanomverdacht sinnvoll, wenn eine Resektion im Gesunden möglich ist (25) (42).

Konnte histologisch ein invasives Karzinom gesichert werden, sollte ein prätherapeutisches Staging, mit Beurteilung der Infiltrationstiefe, einer gynäkologischen Untersuchung des gesamten Anogenitalbereichs sowie die Untersuchung der regionären Lymphabflusswege und ggf. die Durchführung ergänzender Bildgebung erfolgen. Bei der Beurteilung der Infiltrationstiefe liegt die entscheidende Grenze bei 1mm (44) (25). So haben Karzinome mit einer Infiltrationstiefe  $\leq 1\text{mm}$  nahezu kein Metastasierungsrisiko, wohingegen ab einer Infiltrationstiefe  $> 1\text{mm}$  ein relevantes Metastasierungsrisiko in die inguinofemorale Lymphknoten besteht. Die gynäkologische Untersuchung der Anogenitalregion sollte die Bestimmung der makroskopischen Tumorgröße, inklusive größtem Tumordurchmesser, die genaue Tumorlokalisation sowie eine Beurteilung der Beteiligung benachbarter Strukturen wie Urethra, Vagina, Anus und Knochen beinhalten. Außerdem sollte der Ausschluss einer Multizentrität durch die ausführliche Inspektion einschließlich Vulvoskopie mit und ohne Essigsäure im gesamten Anogenitalbereich erfolgen. Zusätzlich ist eine SpekulumEinstellung, mit Kolposkopie und Inspektion der Vagina und Portio ggf. mit Essigprobe, Biopsieentnahme und HPV-Testung sowie die Palpation von Vulva, Vagina, innerem Genitale und des kleinen Beckens einschließlich einer rektalen Untersuchung, indiziert. Ggf. kann ebenfalls eine proktologische oder urologische Untersuchung durchgeführt werden. Zu der Untersuchung der regionären Lymphabflusswege

gehört die Palpation der Leistenlymphknoten, da das Vulvakarzinom primär lymphogen metastasiert. Da die Zuverlässigkeit der Lymphknotenpalpation zur Metastasenerkennung jedoch begrenzt ist (in 16-24% sind palpatorisch unauffällige Lymphknoten histologisch befallen und in 24-41% sind palpatorisch auffällige Lymphknoten histologisch tumorfrei (45)), ist bei Verdacht auf eine Lymphknotenmetastasierung weitere bildgebende Diagnostik indiziert. Abhängig von der Größe der Lymphknotenmetastasen sind unterschiedliche bildgebende Verfahren überlegen. So konnte im Vergleich verschiedener Studien gezeigt werden, dass die Magnetresonanztomographie (MRT) ab einer Lymphknotengröße von 5 mm mit 87% eine bessere Sensitivität (bei etwas schlechterer Spezifität mit 81%) aufweist (46) als die Sonographie mit einer Sensitivität von 76% (mit besserer Spezifität von 91%) (47). Bei einem Querdurchmesser <10 mm verbessert sich die Spezifität auf 91% bei mit 89% stabil bleibender Sensitivität (48). In der Computertomographie (CT) können bei einem Lymphknotenlängendurchmesser von > 10mm mit einer Sensitivität von 58% und einer Spezifität von 75% keine vergleichbaren Werte erzielt werden (49). Mit der Positronenemissionstomographie (PET) konnte eine Sensitivität von 67% bei einer sehr guten Spezifität von 95% erreicht werden, wodurch sie vor allem zur Detektion von schlecht sichtbaren, tiefer sitzenden Metastasen eingesetzt werden kann (50) (42). Bei klinisch fortgeschrittenem Tumorwachstum ( $\geq$  FIGO II) sollte zur Beurteilung der lokalen Ausdehnung sowie der inguinalen, femoralen und pelvinen Lymphknoten zur weiteren Therapieplanung eine MRT durchgeführt werden (25) (42). Mit dem Ergebnis der histopathologischen Untersuchung, ggf. weiterer Bildgebung und dem Operationsbefund kann das Staging entsprechend der FIGO- (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) und TNM-Klassifikation (gemäß Union internationale contre le cancer kurz UICC) erfolgen (Tabelle 1), welche in Deutschland beide angewendet werden. Die Beurteilungskriterien beinhalten die lokale Ausbreitung (T), die Lymphknoteninfiltration (L) sowie die Fernmetastasierung (M) (42).

UICC/TNM	FIGO	Tumorausbreitung
	Tis	Carcinoma in situ, vulväre intraepitheliale Neoplasie (VIN) 3
T1	I	Tumor begrenzt auf Vulva oder Vulva und Perineum
T1a	IA	Tumor $\leq 2$ cm in größter Ausdehnung und Stromainfiltration $\leq 1$ mm
T1b	IB	Tumor $>2$ cm in größter Ausdehnung, Stromainfiltration $> 1$ mm
T2	II	Tumor infiltriert eine der folgenden Strukturen, unteres Drittel der Urethra, der Vagina oder den Anus
T3	IVA	Tumor infiltriert eine der folgenden Strukturen: obere zwei Drittel der Urethra, der Vagina, Blasen-, Rektummukosa oder ist am Knochen fixiert
N0		Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	III	Regionäre Lymphknotenmetastasen mit folgenden Eigenschaften:
N1a	IIIA(ii)	Eine oder zwei Lymphknotenmetastase(n), jede $< 5$ mm
N1b	IIIA(i)	Eine Lymphknotenmetastase $\geq 5$ mm
N2		Regionäre Lymphknotenmetastasen mit folgenden Eigenschaften
N2a	IIIB(ii)	Drei oder mehr Lymphknotenmetastasen, jede $< 5$ mm
N2b	IIIB(i)	Zwei oder mehr Lymphknotenmetastasen $\geq 5$ mm
N2c	IIIC	Lymphknotenmetastasen mit extrakapsulärer Ausbreitung
N3	IVA(ii)	Fixierte oder ulzerierte regionäre Lymphknotenmetastasen
M0		Keine Fernmetastasen
M1	IVB	Fernmetastasen (einschl. Beckenlymphknotenmetastasen)

**Tabelle 1:** FIGO- und TNM-Klassifikation des Vulvakarzinoms (adaptiert nach (51) (52)).

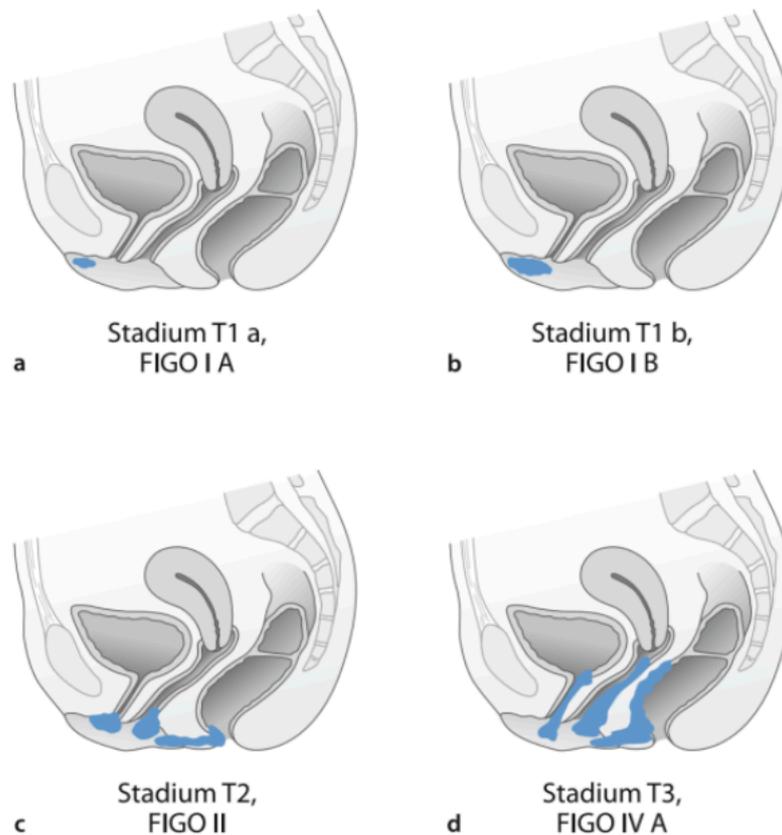
### 1.1.6 Therapie

Die Therapie des invasiven Vulvakarzinoms erfolgt primär operativ. In Ausnahmefällen wie der Inoperabilität der Patientin, einem fortgeschrittenen Tumorstadium mit Infiltration von Urethra und/oder Anus, einem ausgedehnten multifokalen Befund oder einem metastasierten Stadium können eine primäre Radio(chemo)therapie oder eine neoadjuvante Chemotherapie zur Tumorreduktion und/oder palliativen Therapie in Erwägung gezogen werden. Für letzteres, gibt es auf Grund der geringen Fallzahlen allerdings kaum Therapiestandards (25).

#### 1.1.6.1 Stadiengerechte Therapie

Angestrebt wird immer die Exzision im Gesunden (R0), wobei es für den genauen Tumorabstand zum Resektionsrand keine signifikanten Unterschiede in der Rezidivrate gibt

(53). Dies kann bei unifokalen Karzinomen im Stadium T1/ FIGO I in der Regel durch eine möglichst schonende, radikale, lokale Exzision erreicht werden. Das Stadium T2/ FIGO II umfasst eine große Variabilität von Karzinomen (Tabelle 1, Abbildung 4). Daher variiert die Therapie stark abhängig von den betroffenen Strukturen von einer radikalen lokalen Exzision bis zur partiellen (vorderen oder hinteren Vulvektomie je nach Tumorkalisation) oder kompletten Vulvektomie. Dies erfolgt, wenn nötig, mit Lappenplastik zur Defektdeckung sowie ggf. in Kombination mit einer Radio(chemo)therapie. Ziel ist hier vor allem der Kontinenzerthalt. Karzinome, die unabhängig von ihrer Größe die oberen zwei Drittel der Urethra, Vagina, Blasen- oder Rektumschleimhaut infiltrieren oder am Knochen fixiert sind, werden im Stadium T3/ FIGO IVA erfasst. Mögliche Therapieansätze sind eine primäre Radiochemotherapie in palliativer Absicht, eine neoadjuvante Radio(chemo)therapie zur Verbesserung der Resektabilität des Tumors (bei fehlenden Fernmetastasen sollte immer eine Resektion im Gesunden angestrebt werden) oder eine primäre Exenteration in kurativer oder palliativer Absicht bei Einbruch und/oder Fistelung mit Nachbarorganen. Letzteres sollte jedoch nur in interdisziplinären Zentren von erfahrenen Chirurgen vorgenommen werden. Bei einer Infiltration in den Knochen muss individuell entschieden werden, ob ein chirurgisches Vorgehen, eine Radio(chemo)therapie oder eine Kombination bevorzugt wird. Die Empfehlung zur primären neoadjuvanten Radiochemotherapie gilt immer auch für primär inoperable Karzinome. Allgemein sollte gemäß der aktuellen Leitlinie Vulvakarzinom 2015 mit möglichst geringer Radikalität vorgegangen werden, da eine Operation an der Vulva und vor allem an der Klitoris große Auswirkungen auf die Sexualität und das Selbstwertgefühl der Frauen haben kann. Alle Patientinnen und besonders junge Patientinnen sollten daher ausführlich über die Therapieoptionen mit Kurz- und Langzeitfolgen sowie Risiken aufgeklärt werden (25) (54) (55).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der das Tumorstadium bestimmenden Ausbreitung (56).

Ab einem Tumorstadium  $\geq T1b$ / FIGO IB mit einer Infiltrationstiefe  $> 1$ mm sollte zusätzlich ein operatives Staging der inguino-femorale (pelvine Lymphknotenmetastasen sind selten und werden nicht standartmäßig entfernt) Lymphknoten mittels einer Sentinel- oder einer kompletten (der tiefen und oberflächigen) inguinofemorale Lymphonodektomie erfolgen. Letztere sollte je nach Tumorlokalisation ein oder beidseitig erfolgen (bei lateralen Tumoren mit  $> 1$ cm Abstand zu Mittellinie, einem maximalen Durchmesser von 2cm und ipsilateral histologisch unauffälligen Lymphknoten einseitig, bei medialen Tumoren bilateral) (55). Voraussetzungen für eine Sentinel-Lymphonodektomie sind ein unifokaler Tumor, ein maximaler Tumordurchmesser von  $< 4$ cm, klinisch und ggf. sonographisch unauffällige femoroinguinale Lymphknoten, die Durchführung durch ein erfahrenes Team, ein Ultrastaging mit immunhistochemischer Aufarbeitung durch einen Pathologen sowie eine adäquate Aufklärung der Patientin über mögliche Vor- und Nachteile des Verfahrens und die Notwendigkeit einer regelmäßigen Nachsorge mit guter Compliance seitens der Patientin. Unter Einhaltung dieser Kriterien gibt es in der prospektiven GROINSS-V I Beobachtungsstudie bei Patientinnen mit negativen Sentinel Lymphknoten eine inguinale Rezidivrate von 2,3% nach 35 Monaten

Beobachtungszeitraum (57). Diese Rezidivrate ist gegenüber der kompletten Lymphonodektomie mit einer Rezidivrate je nach Studie von 0-2,4% nur leicht erhöht (58) (25).

#### 1.1.6.2 Strahlen- und Chemotherapie

Eine adjuvante Radiotherapie des Tumorbettes sollte nach Resektion mit histologisch (R1) oder makroskopisch (R2) sichtbaren Karzinom am Präparatrand zur Prognosebesserung erfolgen. Sie sollte ebenfalls in Erwägung gezogen werden, wenn der Abstand des gesunden Gewebes zum Tumorgewebe im histologischen Präparat  $\leq 3$ mm beträgt (59) (25). Die adjuvante Radiotherapie der inguino-femorale Lymphabflusswege ist ebenfalls zu empfehlen, wenn einer der folgenden Faktoren zu trifft:  $\geq 2$  inguinale Lymphknotenmetastasen, eine Lymphknotenmetastase  $\geq 5$  mm, Wachstum nach extrakapsulär (N2c/ FIGO IIIC), fixierte/ulzerierte Lymphknotenmetastasen (N3/ FIGO IVA(ii)) (25). Exemplarisch für den Umgang mit histologisch gesicherten Mikrometastasen  $\leq 2$  mm ist eine retrospektive Studie mit 159 Patientinnen, die in den Jahren 2008-2015 eine Sentinel-Lymphonodektomie erhielten, zu nennen. Hier konnte gezeigt werden, dass die adjuvante Radiotherapie der inguino-femorale und pelvinen Lymphknoten ipsilateral über einen mittleren Beobachtungszeitraum von 31 Monaten eine ebenbürtige Alternative zur kompletten inguinofemorale Lymphonodektomie sein könnte (60).

<b>UICC-Stadium</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>unbekannt</b>
<b>Stadium bei Erstdiagnose in %</b>	36	2	14	5	43
<b>5-Jahres-Überleben in %</b>	88	63	46	20	71

*Table 2: Stadienverteilung bei Erstdiagnose und 5-Jahres-Überleben in Abhängigkeit des UICC-Stadiums, Deutschland 2015-2016, modifiziert nach Daten des RKI (3).*

Vulvakarzinomrezidive treten in 26-37% der Fälle auf. In den meisten Fällen (40-60%) kommt es innerhalb der ersten zwei Jahre nach Erstdiagnose zu einem Rezidiv, wobei Lokalrezidive mit ca. 50-70% am häufigsten auftreten. Bei ca. 30% der Rezidive handelt es sich um Leisten-/pelvine oder distante Rezidive (61) (62). Abhängig vom

Tumorstadium ist das Rezidivrisiko je nach initialem Stadium erhöht, wie in einer italienischen retrospektiv klinischen Studie, die in den Jahren 1980-1994 502 Patientinnen mit Vulvakarzinom erfasste, gezeigt werden konnte: 22% der Patientinnen im FIGO Stadium I, 35,8% im FIGO Stadium II, 45% im FIGO Stadium III und 44,2% der Patientinnen im FIGO Stadium IV entwickelten hier ein Rezidiv (63).

## 1.2 Aktuelle Forschung zu prognostischen Biomarkern des Vulvakarzinoms, Fragestellung

Da das Vulvakarzinom mit ca. 5% der gynäkologischen Tumoren (64) zu den selteneren Karzinomen der Frau gehört, sind zu ihm vergleichsweise wenig Studien zu finden. Seit Beginn der Jahrtausendwende hat sich dies geändert und so existieren mittlerweile diverse Studien zu prädiktiven Biomarkern in Bezug auf die Prognose und Therapie des Vulvakarzinoms (Veröffentlichungen auf Pubmed Stand 07/2020).

Czogalla und Kollegen (65) sahen sich die Expression von „Programmed death-ligand 1“ (PD-L1) in HPV16 positiven und negativen Plattenepithelkarzinomen der Vulva sowie deren Korrelation zu „Tumor-infiltrating lymphocytes“ (TILs) in Bezug auf eine mögliche prognostische Bedeutung an. PD-L1 ist ein Angriffspunkt für Checkpoint-Inhibitoren, welche durch dessen Blockierung eine starke Immunreaktion gegen Tumorzellen auslösen (66). Es zeigte sich, dass eine hohe PD-L1 Expression mit einer schlechteren Prognose für das Überleben einher geht, wohingegen sich eine HPV16 Positivität als ein unabhängiger positiver prognostischer Faktor für das progressionsfreie Überleben ergab. Vergleichbare Ergebnisse dazu konnten auch von Thangarajah und Kollegen (67) gezeigt werden. Mit der membranständigen „Carbonic anhydrase IX“ (CAIX), die bei der Zellaadhäsion eine Rolle spielt und wichtig für das Wachstum und Überleben von Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen (68) ist, untersuchten Choschick und Kollegen (69) einen weiteren möglichen Tumormarker und Therapieansatz für das Vulvakarzinom. In 57% der Fälle konnte eine positive Expression von CAIX gefunden werden, welche ebenfalls signifikant mit einem höheren Tumorstadium, einem größeren Tumordurchmesser sowie -invasion als auch mit inguinalen Lymphknotenmetastasen und einem Trend zum kürzeren rezidivfreien Überleben einher gingen. In einer weiteren Studie von Fons und Kollegen (70) wurden verschiedene vielversprechende Proteinmarker für das Vulvakarzinom untersucht, wie unter anderem die Cyclooxygenase 2 (COX-2). Durch die Synthese von Prostaglandinen fördert diese die Zellproliferation, inhibiert Apoptose sowie die Immunantwort gegen Krebszellen und reguliert die Angiogenese (71). Bei hoher Expressierung von COX-2 und positiven Lymphknotenmetastasen ergab sich eine

signifikante Verschlechterung des krankheitsspezifischen und rezidivfreien Überlebens der Patientinnen. Cyclin D1 (CCD1) spielt als regulatorische Untereinheit der cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6, welche Schlüsselenzyme im G1/S-Phasenübergang sind, eine zentrale Rolle in der Zellzyklusprogression (72). Die Expression im Vulvakarzinomgewebe untersuchten Choschick und Kollegen (73) und fanden einen Zusammenhang zwischen einer Überexpression von CCD1 und dem Auftreten regionaler Lymphknotenmetastasen, besonders in HPV-negativen Karzinomen, was Fragen nach dem zusammenhängenden Signalweg mit HP-Viren aufwarf. Wie hier deutlich wird, gibt es bereits einige Ansätze für prognostische und therapeutische Marker des Vulvakarzinoms, die in dieser Arbeit mit dem „Ligand dependent corepressor“ (LCoR) und „Receptor-interacting protein of 140 kDa“ (RIP140) auch bekannt als „Nuclear-receptor interacting protein 1“ (NRIP1) (in der weiteren Arbeit immer als NRIP1 bezeichnet) um zwei weitere ergänzt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Für diese Arbeit wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Proben von 157 Patientinnen mit Vulvakarzinom verwendet, die von 1990-2008 in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU in der Innenstadt (Maistraße) oder in Großhadern (Marchioninistraße) operiert wurden. Die Gewebeschnitte für die Immunhistochemie wurden aus diesen Paraffinblöcken erstellt.

### 2.2 Immunhistochemie

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung können in verschiedenen Gewebearten, wie z.B. dem Vulvakarzinomgewebe, über eine Antigen-Antikörper-Bindung bestimmte Proteine mit anschließender Färbung mikroskopisch sichtbar gemacht werden.

#### 2.2.1 Anfertigung der Paraffinschnitte

Die je 2-3µm dicken Schnitte wurden mit Hilfe des Schlittenmikrotoms aus den Paraffinblöcken erstellt und zur Glättung in ein Streckbad mit 45°C warmen destillierten Wasser gelegt. Anschließend wurden sie auf extra für die Immunhistochemie beschichtete Objektträger (sog. Superfrost Plus) aufgezogen. Dank der Beschichtung ist die Oberfläche der Objektträger positiv geladen, was für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte sorgt. Um die Haftung noch weiter zu verbessern wurden die Schnitte über Nacht im Brutschrank bei ca. 56-58°C getrocknet.

#### 2.2.2 Ablauf der immunhistochemischen Färbung

Als erstes wurden die Schnitte für 20 Minuten in Roticlear entparaffiniert und anschließend zweimal in 100%igem Ethanol geschwenkt. Anschließend wurde die endogene Peroxidase durch die 20-minütige Inkubation in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung blockiert. Daraufhin wurden die Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100%, 96%, 70% und 50%) geschwenkt und zur Entfernung der letzten Ethanolreste in Aqua dest. gestellt. Durch 5-minütiges Kochen mit Citratpuffer im Dampfkochtopf erfolgte die Demaskierung des jeweiligen Antigens, aus der durch die Formalinfixierung entstandenen Proteinvernetzungen. Nach der Abkühlung durch Leitungswasser und der 5-minütigen Spülung in Aqua dest. begann mit dem zweimal 2-minütigen Waschen in PBS der eigentliche Teil der immunhistochemischen Färbung. Sie erfolgte in einer feuchten Kammer, um die Schnitte während der einzelnen Inkubationsschritte vor dem Austrocknen zu

schützen. Als erster Schritt wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten mit der Blocking Solution (Reagent 1) inkubiert. Dies erfolgte, um elektrostatische Ladungen im Gewebe abzusättigen und somit zu verhindern, dass das Immunglobulin sich durch hydrophobe Bindung unspezifisch an Membranen oder Fettgewebe bindet und eine unspezifische Färbung entsteht. Nach abgelaufener Zeit wurde das Reagent 1 von den Objektträgern abgekippt und direkt im Anschluss der Primärantikörper aufgetragen. Dieser wurde bei 4°C für 16 Stunden über Nacht inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Schnitte erneut zweimal 2 Minuten in PBS gewaschen und der Post Block (Reagent 2) wurde als Verstärkungsreagenz für 20 Minuten aufgetragen. Erneut erfolgte ein Waschschriff (zweimal 2 Minuten in PBS) und anschließend wurde das HRP-Polymer (Reagent 3) für 30 Minuten aufgetragen. Wieder erfolgte ein Waschschriff (zweimal 2 Minuten in PBS) um überschüssiges HRP-Polymer abzuwaschen. Als nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte, je nach Primärantikörper, für 1,5 Minuten (NRIP1) bzw. 3 Minuten (LCoR) mit DAB gefärbt und zum Stoppen der Färbereaktion zweimal 2 Minuten in Aqua dest. gespült. Daraufhin erfolgte für 2 Minuten die Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach P. Mayer und die anschließende Bläuung für 2 Minuten unter fließendem, warmem Wasser. Danach durchliefen die Objektträger zur Entwässerung die aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70%, 96%, 2 x 100%) bis zur Aufhellung in Roticlear und wurden zum Schluss mit dem Eindeckmedium RotiMount eingedeckelt. Als Positivkontrolle wurden für beide Antikörper (NRIP1 und LCoR) Gewebeschnitte von der Plazenta verwendet. Nach abgeschlossener Färbung wurde die Farbintensität der Gewebeschnitte unter dem Lichtmikroskop anhand des Immunoreactive Score (IRS) (74) beurteilt. Die Farbintensitäten wurden jeweils getrennt für Zellkerne und Zytoplasma beurteilt (0 = keine, 1 = schwache, 2 = moderate, 3 = starke Färbung). Neben der Farbintensität wurde ebenfalls die Menge der gefärbten Zellkerne bzw. des Zytoplasmas im Tumorgewebe berücksichtigt (0 = keine Färbung, 1 = <10% der Zellen, 2 = 11-50% der Zellen, 3 = 51-80% der Zellen, 4 = 81-100% der Zellen). Die Objektträger wurden durch zwei unabhängige Gutachter nach diesem System ausgewertet. Durch die Multiplikation der beiden Werte ergibt sich der IRS für den jeweiligen Gewebeschnitt und Antikörper. Mit einem digitalen Kamerasystem wurden Bilder der Gewebeschnitte angefertigt.

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Kultivierung der Zelllinien

Für die *in vitro* Analyse wurden Vulvakarzinomzellen der Linien A-431 und SW 954 in 12ml bzw. 24ml Dulbecco's modifiziertem Eagle Nährmedium (DMEM), welches mit

10% fetalen Kälberserum versetzt war, in T75 (75cm<sup>2</sup>) bzw. in T175 (175cm<sup>2</sup>) Flaschen kultiviert und bei 37°C in einem Brutschrank mit einem atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% aufbewahrt. Zur Verhinderung der Kontamination der Zellen erfolgten alle Versuche unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank. Es wurde ausschließlich mit sterilen Geräten und Materialien gearbeitet und 70%iger Ethanol wurde zur Sterilisation verwendet. Die Zellen wurden einmal wöchentlich gezählt und passagiert. Zusätzlich fand einmal pro Woche ein Mediumwechsel statt.

### 2.3.2 Splitten der Zellen

Sobald die Zellen durch konfluentes Wachstum einen geschlossene Monolayer in der Zellkulturflasche gebildet hatten, erfolgte die Zellpassagierung. Dies geschah, um das Sterben der Zellen durch Platzmangel zu verhindern. Dazu wurde zuerst das verbrauchte Medium mittels einer elektronischen Pipettierhilfe entfernt und verworfen. Je nach Größe wurden die Flaschen mit 6ml bzw. 8ml PBS gespült, um das restliche Medium mit FCS zu entfernen, welches sonst die Wirkung von Trypsin hemmen könnte. Im Anschluss wurden 2ml bzw. 3ml Trypsin/EDTA hinzugefügt und für 8 Minuten im Brutschrank inkubiert. Trypsin bewirkt die Lösung der Zellen vom Kulturboden und verursacht die Vereinzelung der Zellen untereinander. Durch das Hinzugeben von 8ml bzw. 12ml DMEM + 10%FCS erfolgte die Aufhebung der Wirkung von Trypsin. Nach gutem Mischen wurden ca. 100µl für die Zellzählung in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben und die restliche Zellsuspension in ein 50ml Zentrifugenröhrchen pipettiert, welches anschließend für 5 Minuten bei 1000upm, Raumtemperatur und einer Bremse von zwei zentrifugiert wurde. Parallel dazu erfolgte die Zellzählung, für die 25µl der Zellsuspension, 25µl Trypanblau und 50µl PBS gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben wurden. Der durch das Zentrifugieren entstandene Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Anschließend wurde so viel neues DMEM + 10%FCS hinzugegeben, wie mittels Zellzählung ermittelt nötig war, um eine Zellsuspension mit einer Millionen Zellen pro einen Milliliter zu erstellen. Damit die erstrebte Zellzahl in der Zellkulturflasche erreicht wird, wurde die entsprechend verdünnte Menge an Zellsuspension zurück in die Flasche pipettiert und mit dem Nährmedium (DMEM + 10% FCS) um 12ml oder 24ml ergänzt.

### 2.3.3 Immunzytochemie zum Nachweis von NRIP1 und LCoR

SW 954 und A-431 Zellen wurden auf Objektträger in Quadriperms mit einer Densität von einer Millionen Zellen pro Objektträger ausgesät und dann mit DMEM + 10% FCS auf 4ml pro Objektträger aufgefüllt. Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie MCF-7

verwendet, die sowohl das Antigen NRIP1 als auch LCoR exprimiert (75) (76). Auch sie wurde wie oben beschrieben ausgesät. Durch die positive Färbung von NRIP1 und LCoR in dieser Kontrolle wird die Spezifität der Färbung sichergestellt. Nach einer Anwachszeit im Brutschrank von ca. 24 Stunden wurden die Objektträger 3-mal mit PBS gespült und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Formalin fixiert. Nach 5-minütigem Waschen in PBS, wurden die 3 Objektträger für die Färbung mit dem Primärantikörper NRIP1 für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,2% Nonylphenoethoxylat (NP40) inkubiert und die 3 Objektträger für die Färbung mit dem Primärantikörper LCoR für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Digitonin (1:1000 in PBS verdünnt) inkubiert. Dies erfolgte jeweils um die Zellmembran zu permeabilisieren. Abgesehen von diesem Schritt und von dem Auftragen unterschiedlicher Primärantikörper in unterschiedlicher Verdünnung (NRIP1 1:100 und LCoR 1:50) erfolgte die immunzytochemische Analyse der beiden Antigene NRIP1 und LCoR identisch und wird aus diesem Grund in dem gleichen Methodenschritt erläutert.

Nach der Inkubation mit dem Membranpermeabilisator wurden die Objektträger erneut 5 Minuten in PBS gewaschen. Als nächstes wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Blockierungsserum aus dem Vectastain Elite rabbit-IgG-Kit inkubiert, welches aus 3 Tropfen Goat-Normalserum auf 10ml steriles PBS angesetzt wurde. Durch das Blockierungsserum, welches aus der Tierspezies stammt, aus der der sekundäre Antikörper gewonnen wurde, werden elektrostatische Ladungen im Gewebe abgesättigt. Es verhindert so eine unspezifische Färbung durch Blockierung unspezifischer Bindestellen. Nach abgelaufener Zeit wurde das Blockierungsserum abgekippt. Anschließend wurden 100µl des jeweiligen Primärantikörpers in entsprechender Verdünnung in PBS auf die jeweiligen Objektträger aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 16 Stunden über Nacht in einer Feuchtkammer. Nach der Inkubation wurden die Objektträger erneut 5 Minuten in PBS gewaschen und dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Sekundärantikörper aus dem Vectastain Elite rabbit-IgG-Kit inkubiert. Dieser wurde aus 3 Tropfen Goat-Normalserum, einem Tropfen Anti-rabbit-IgG und 10ml PBS angesetzt. Nach abgelaufener Zeit wurde erneut für 5 Minuten mit PBS gewaschen und die Objektträger anschließend für weitere 30 Minuten mit dem ABC-Komplex aus dem Vectastain Elite rabbit-IgG-Kit inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschgang mit 5-minütigen Waschen in PBS und die Färbung mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol plus (AEC+Substrat Chromogen). Die Objektträger mit MCF-7 Zellen und dem Primärantikörper NRIP1 wurden für 5 Minuten mit AEC plus inkubiert, MCF-7 Zellen mit dem Primärantikörper LCoR für 6 Minuten und die restlichen Objektträger mit A-431 und SW 954 unabhängig vom

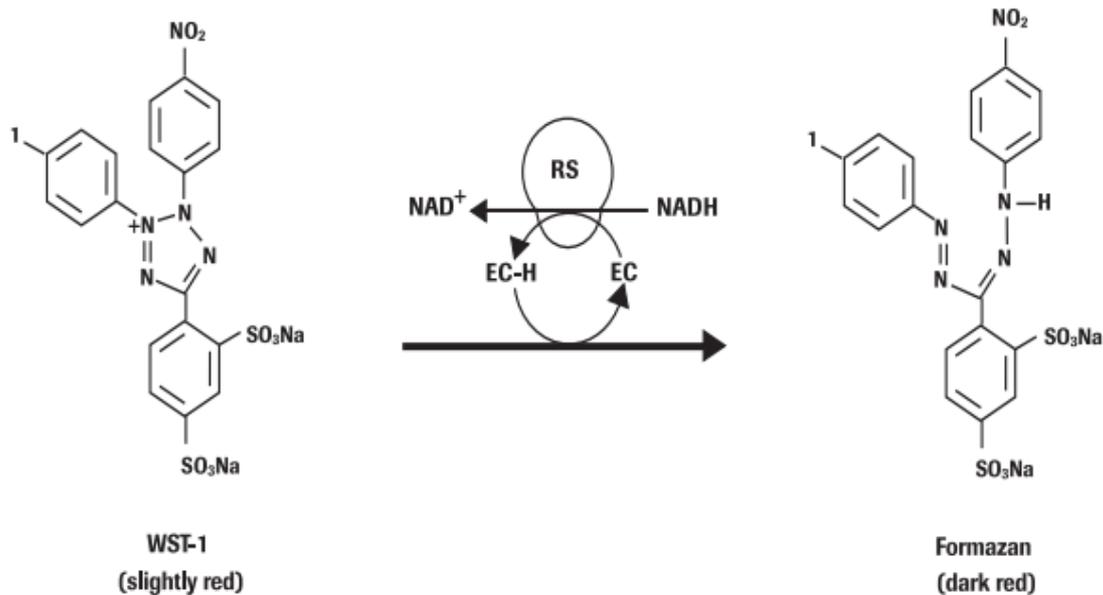
Primärantikörper für 10 Minuten. Die Färbung erfolgte unter einem Lichtmikroskop, um den Farbumschlag beobachten zu können und eine optimale Färbung der Zellen zu erreichen. Die Färbereaktion wurde durch das Waschen in Aqua dest. gestoppt, die Objektträger anschließend für 30 Sekunden in saurem Hämalaun nach Mayer gegengefärbt und für 3 Minuten unter fließendem warmem Leitungswasser gebläut. Daraufhin erfolgte die Eindeckung der Objektträger mit dem Eindeckmedium Aquatex®. Dies beeinträchtigte die Färbung nicht, da Aquatex® und Glas denselben Brechungsindex besitzen.

#### 2.3.4 Immunzytochemische Auswertung

Die Intensität der Färbung wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops beurteilt und je nach Stärke in eine geringe, mäßige oder starke Färbung unterteilt.

#### 2.3.5 WST-Test zur Überprüfung der Zellviabilität unter Stimulation mit 9-cis-Retinsäure und 15dPGJ<sub>2</sub>

Durch den WST-1-Assay (water soluble tetrazolium) kann eine intakte Atmungskette in den Zellen nachgewiesen werden. Somit wird er als Proliferationsassay verwendet, um die Anzahl der lebensfähigen Zellen zu bestimmen. Zellen mit einer intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolinium-Reduktase spalten das Tetrazoliniumsalz WST-1 zu Tetrazolam-(Formazan)-Farbstoff, was einen Farbumschlag verursacht. Dieser Reaktionsweg ist in Abbildung 5 dargestellt. Dieser Farbumschlag, der sich linear zur Proliferation und Vitalität der Zellen verhält, kann mit Hilfe eines Spektralphotometers, dem ELISA-Reader DYNEX MRX II bei einer Wellenlänge von 450nm detektiert (77) und mit der Revelation-Software gemessen und quantifiziert werden.



**Abbildung 5:** Reaktionsweg des Tetrazoliniumsalzes zu Formazan (EC = Elektronenaufnehmer; RS = Succinat-Tetrazoliumreduktase) (77).

#### 2.3.5.1 Durchführung des WST-1-Assays

Im Anschluss an die Zellpassagierung wurden sechs 96-Well-Platten pro Well mit je 50µl Medium-Zellsuspension mit einer Zellzahl von 400.000 Zellen/ml bestückt. Der WST-1-Assay wurde für die Zeitpunkte 24h, 48h sowie 72h durchgeführt, wobei jede Zelllinie (A-431 und SW 954) für jeden Zeitpunkt ihre eigene Platte hatte. Pro Platte wurden jeweils 66 Wells mit 50µl Zellen, gelöst in DMEM mit 10%igen FCS, bestückt und 6 Wells mit 50µl DMEM mit 10%igen FCS ohne Zellen. Nachdem die Zellen für 4h im Brutschrank anwachsen konnten, wurde das DMEM mit 10%igen FCS abgezogen und mit DMEM ohne FCS ersetzt. Anschließend konnten die Zellen über Nacht weiter anwachsen, bis sie am nächsten Morgen mit 9-cis-Retinsäure, 15dPGJ<sub>2</sub> und beiden Stimulanzien in Kombination inkubiert wurden. Stimuliert wurde mit 1 und 10nM/ml 9-cis-Retinsäure und 15dPGJ<sub>2</sub> separat sowie mit beiden Konzentrationen in Kombination. 9-cis-Retinsäure sowie 15dPGJ<sub>2</sub> wurden pro Konzentration und Stimulanz (Kontrolle, 1nM/ml, 10nM/ml) in je 6 Wells gegeben. 9-cis-Retinsäure und 15dPGJ<sub>2</sub> wurden zusammen in den Konzentrationen 1nM/ml, 10nM/ml und der Kontrolle in je weitere 6 Wells gegeben. Weiteren 12 Wells (6 Wells mit Zellen und 6 Wells ohne Zellen) wurde DMEM ohne FCS zugegeben. Anschließend wurden die Platten für die entsprechende Zeit im Brutschrank inkubiert.

Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde jedem Well, bis auf die Negativkontrolle mit Zellen und DMEM ohne FCS, 10µl WST-1 Reagenz zugegeben. Den 6 Wells der Negativkontrolle wurden je 10µl DMEM mit 10%igen FCS zugegeben. Anschließend folgte

eine 30-minütige Inkubation im Brutschrank. Während diesen 30 Minuten wurden der ELISA Reader DYNEX MRXII, der Computer mit der Revelation-Software und die Zentrifuge für die Zentrifugierung der 96-Well-Platte vorbereitet. Nach den 30 Minuten wurde die 96-Well-Platte für eine Minute bei Raumtemperatur und 1000U/m zentrifugiert und in den ELISA-Reader eingesetzt und gemessen. Die Messung erfolgte 3-mal direkt hintereinander.

#### *2.3.5.2 Auswertung des WST-1-Assays*

Die vom ELISA Readers DYNEX MRXII photometrisch generierten Daten zur Absorption wurden in Excel übertragen und gespeichert. Für die Erstellung der Diagramme wurde jeweils der Mittelwert der sechs parallel erfolgten Stimulationen gebildet und die Kontrolle auf den Wert 1 gesetzt. Mit dem ermittelten Faktor wurden die Werte für die Stimulation mit 1nM und 10nM angeglichen.

#### *2.3.6 Doppelimmunfluoreszenzfärbung*

Mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenzfärbung wird die gleichzeitige Darstellung von zwei Antigenen ermöglicht. Dabei binden zwei Primärantikörper unterschiedlicher Spezies (z.B. Mouse und Rabbit) an zwei spezifische Antigene, in diesem Fall LCoR und PPARgamma. Um diese Bindung sichtbar zu machen, werden speziesspezifische mit Fluorochrom konjugierte Sekundärantikörper (Cy2 und Cy3) hinzugegeben, die den jeweiligen Primärantikörper binden. Fluorochrome haben die Fähigkeit Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und in Form von Photonen einer anderen Wellenlänge abzugeben. Als Fluoreszenz bezeichnet man die Lichtemission durch Atome bzw. Moleküle, welche durch die Aufnahme von energiereicher Strahlung verursacht wird.

Im Anschluss an die Zellpassagierung wurden auf einen Objektträger mit 8 Chamber Slides jeweils 4 Kammern mit 40.000 Zellen/500µl DMEM+10% FCS der Zelllinie A-431 und jeweils 50.000 Zellen/µl DMEM+10% FCS der Zelllinie SW 954 gegeben. Nachdem die Zellen 24h Stunden anwachsen konnten, wurde am nächsten Tag pro Zelllinie jeweils doppelt in den Konzentrationen Kontrolle und 1nM/ml stimuliert. Anschließend wurde der Objektträger für 24h im Brutschrank inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde jedes Well zweimal mit 500µl PBS gespült und anschließend der Objektträger aus dem Chamber Slide entfernt. Daraufhin wurden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Formalin fixiert, danach zweimal für 5 Minuten in PBS gespült und für 15 Minuten mit dem Ultra V Block inkubiert. Dieser dient der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und verhindert damit das unspezifische Anfärben. Nach abgelaufener

Inkubationszeit wurde dieser abgeklopft und die angesetzten Primärantikörper Anti-Phospho-PPARgamma (Ser112) und LCoR im Verdünnungsmedium auf den Objektträger gegeben. Sie inkubierten für 17 Stunden bei 4°C über Nacht im Kühlschrank. Am nächsten Tag wurde der Objektträger dreimal 2 Minuten in PBS gespült und anschließend die im Dunkeln in dem Verdünnungsmedium angesetzten Sekundärantikörper Cy2 und Cy3 auf den Objektträger gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten ebenfalls im Dunkeln. Nach vollendeter Inkubation folgte das Waschen für dreimal 2 Minuten in PBS. Als nächstes wurde der Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet und abschließend mit DAPI, dem Eindeckmedium für Fluoreszenz eingedeckt sowie das Eindeckglas seitlich mit Nagellack fixiert. Der Objektträger wurde noch am selben Tag unter dem Fluoreszenz Axioskop Fotomikroskop angeschaut. Außerdem wurden die benötigten Fotos direkt mit Hilfe des digitalen Axio-cam Kamerasystems erstellt.

#### 2.3.7 Quantifizierung der lebenden Zellen bei der Stimulation mit 10nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub>

Nach der Zellpassagierung wurde eine 12-Well Platte mit je 2 Wells 200.000 Zellen/500µl DMEM+ 10%FCS der Zelllinien A-431 und SW 954 bestückt und für 4 Stunden zum Anwachsen der Zellen in den Brutschrank gestellt. Nach abgelaufener Zeit wurde das DMEM+10%FCS abgezogen, mit DMEM ohne FCS ersetzt und die 12-Well Platte zur weiteren Inkubation in den Brutschrank gegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation von je 2 Kontrollen und 10nM 15dPGJ<sub>2</sub> pro Zelllinie mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Nach erfolgter 24-stündiger Stimulation wurden aus jedem Well die 500µl Lösung abgezogen und jeweils in ein eigenes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden für 5 Minuten bei 1000upm Raumtemperatur und einer Bremse von 2 zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde abgezogen und verworfen, so dass nur noch das Zellpellet im Gefäß verblieb. Die Wells wurden mit je 300µl PBS gespült und die Zellen am Wellboden wurden anschließend durch eine 8-minütige Inkubation im Brutschrank mit 200µl Trypsin gelöst. Um die Trypsinaktivität zu stoppen wurden 800µl DMEM+10%FCS in jedes Well gegeben, gut gespült und die Zell-Medium-Suspension auf das entsprechende, bereits zentrifugierte Zellpellet gegeben. Diese wurden gut gemischt und die Zellen nach Protokoll in der Zählkammer ausgezählt. Es wurden sowohl die lebenden Zellen (weiß) als auch die toten Zellen (blau) gezählt.

## 3 Ergebnisse

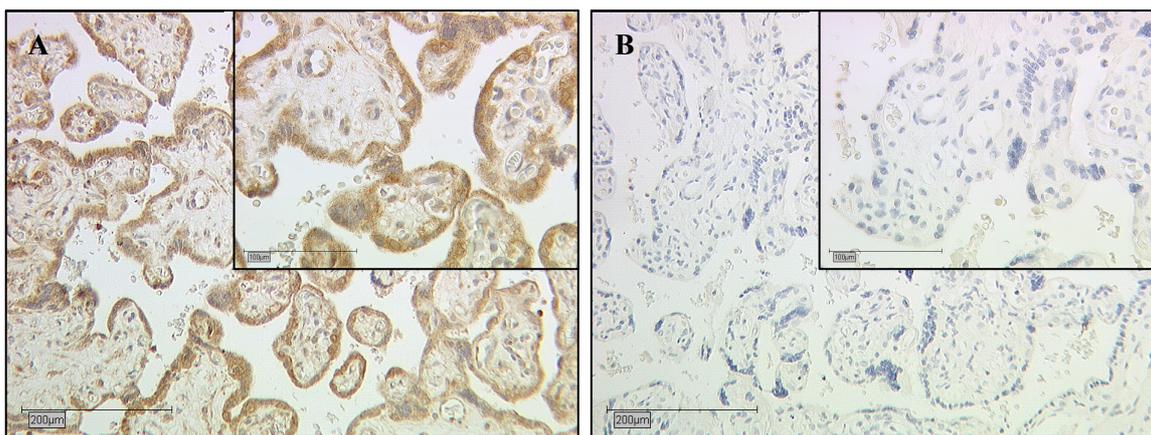
### 3.1 Immunhistologie

#### 3.1.1 Expression von LCoR

Das Patientenkollektiv bestand aus 144 Frauen mit Vulvakarzinom (bei 13 der 157 Gewebeproben handelte es sich um Vorstufen und nicht um manifestierte Karzinome), deren Gewebeproben mit Anti-LCoR gefärbt wurden, um dessen Expression im Vulvakarzinom zu analysieren. 140 dieser immunhistologischen Schnitte konnten ausgewertet werden. In zwei davon konnte kein Tumorgewebe gefunden werden und bei zwei weiteren schwamm das Gewebe während der Aufbereitung für den Färbeprozess ab.

Insgesamt zeigte sich in 81% der 140 Fälle eine nukleäre Expression von LCoR und in 100% der Fälle eine zytoplasmatische Expression. Bei der nukleären Expression von LCoR lag der Median bei einem IRS von 1, der Mittelwert bei einem IRS von 1,56, der Modus bei einem IRS von 1 und die Spannweite bei einem IRS von 8, bei einem minimalen Wert von 0 und einem maximalen Wert von 8. Bei der zytoplasmatischen Expression von LCoR lag der Median bei einem IRS von 6, der Mittelwert bei einem IRS von 6,09, der Modus bei einem IRS von 8 und die Spannweite bei einem IRS von 11 bei einem minimalen Wert von 1 und einem maximalen Wert von 12.

Die exemplarische Abbildung der Positiv- und Negativkontrollen im Plazentagewebe sind in Abbildung 6 zu sehen.

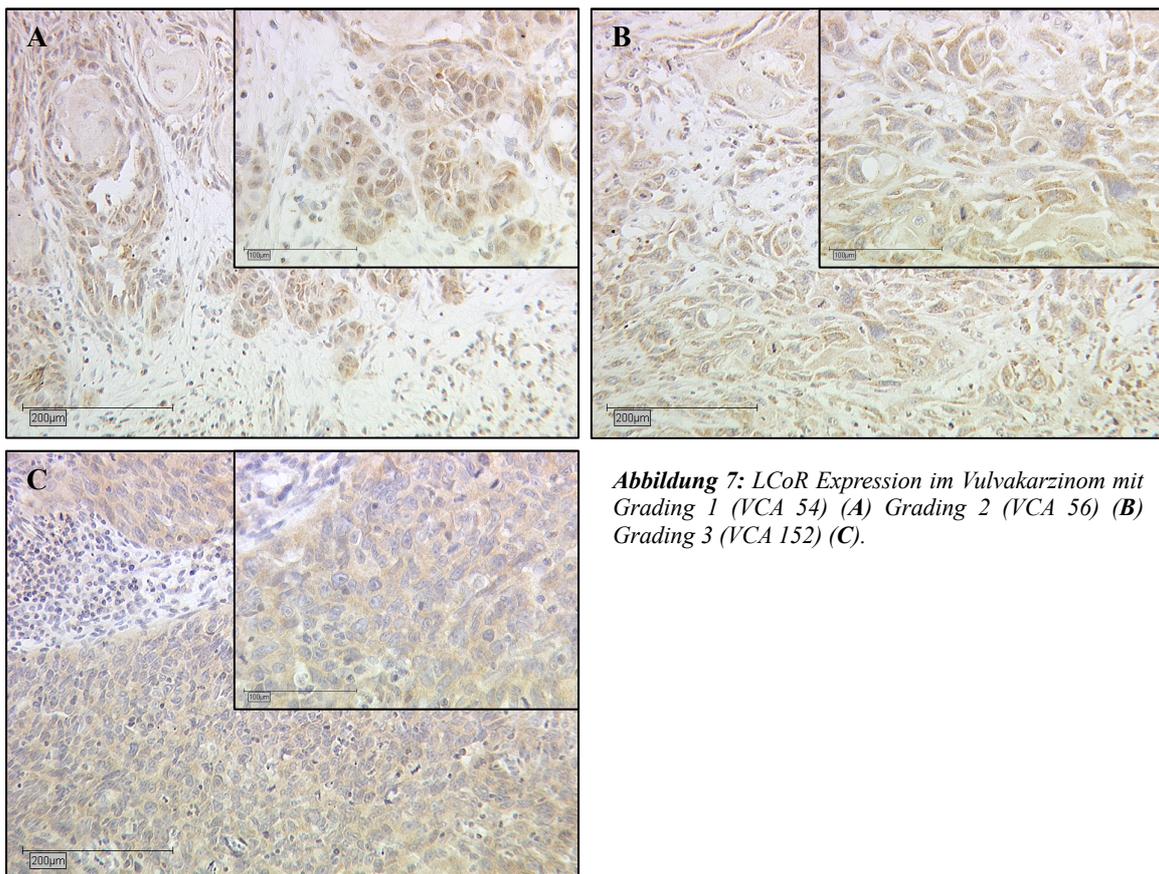


**Abbildung 6:** Positiv- und Negativkontrolle für LCoR.  
LCoR Positivkontrolle (A) und LCoR Negativkontrolle (B) an der Plazenta.

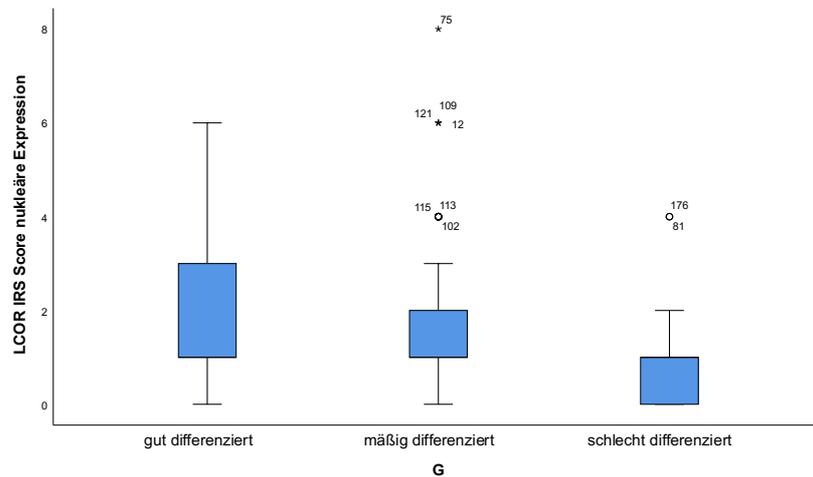
### 3.1.1.1 LCoR und Grading

Von den 144 Fällen des Patientenkollektivs konnten drei auf Grund des fehlenden Grading nicht mit in die Wertung genommen werden. Der Median lag für das Grading bei 2, der Mittelwert bei 2,03, der Modus bei 2 und die Spannweite ebenfalls bei 2, bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3. Die Verteilung der Häufigkeit der Gradingstufen lag für G1 bei 17,4%, für G2 bei 60,4% und für G3 bei 20,1%. Bei den restlichen 2,1% handelt es sich um die fehlenden Werte.

Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang nach Kruskal-Wallis zwischen einem niedrigen Grading, einem hohen IRS Score und umgekehrt ( $p= 0,019$ ). Je niedriger das Grading, desto höher war der IRS Score und damit auch die nukleäre LCoR Expression und je höher das Grading, desto niedriger war der nukleäre IRS Score und somit die nukleäre LCoR Expression (Abbildung 7, A-C). Der Median des IRS Scores der nukleären LCoR Expression ist für G1, G2 und G3 immer 1 (Figure 1).



**Abbildung 7:** LCoR Expression im Vulvakarzinom mit Grading 1 (VCA 54) (A) Grading 2 (VCA 56) (B) Grading 3 (VCA 152) (C).

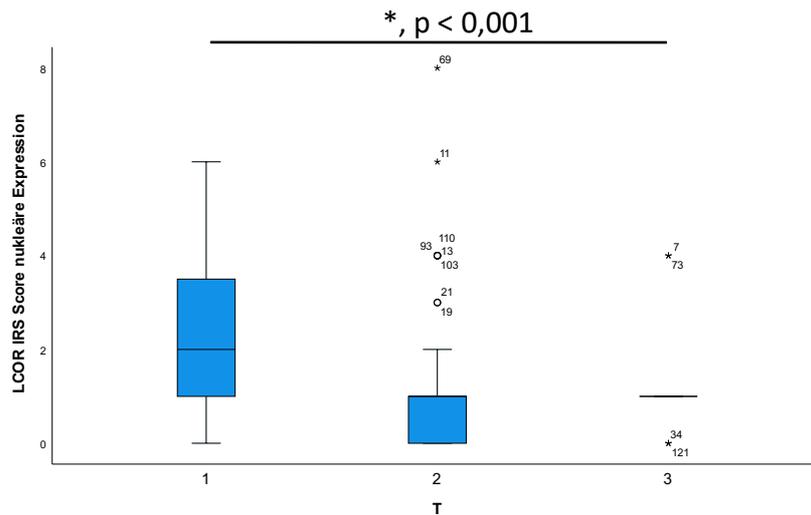


**Figure 1:** Die Expression von LCOR im Zellkern nahm mit dem Grading signifikant ab ( $p= 0,019$ ). Darstellung als Boxplot: Die Box entspricht der 25.-75. Perzentile, der Median ist die Linie in der Box, die Linien entsprechen der 5.-95. Perzentile, die Kreise sind milde Ausreiser mit einem Wert, der maximal 3x der Länge der Box entspricht, die Sternchen sind extreme Ausreiser mit Werten, die  $>3x$  der Länge der Box entsprechen.

### 3.1.1.2 LCoR und T-Status

Von den 144 Fällen konnten neun auf Grund des fehlenden T-Status nicht mit bewertet werden. Bei den übrigen 135 Fällen lag der Median bei 2, der Mittelwert bei 1,7, der Modus bei 2 und die Spannweite ebenfalls bei 2, bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3. Die Verteilung der Häufigkeit der T-Status betrug sich auf 34,7% für T1, auf 52,8% für T2 und auf 6,3% für T3. Die fehlenden 6,3% werden von den übrigen Werten gebildet.

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem nukleären ISR Score, also der nukleären Expression von LCoR und dem T-Status des Karzinoms. Je höher der IRS Score und damit die nukleäre Expression von LCoR war, desto niedriger war der T-Status. Als T1 bewertete Karzinome wiesen einen medianen IRS von 2 auf ( $p<0,001$ ) und als T2 und 3 bewertete Karzinome zeigten einen medianen IRS von 1 ( $p<0,001$ ) (Figure 2).

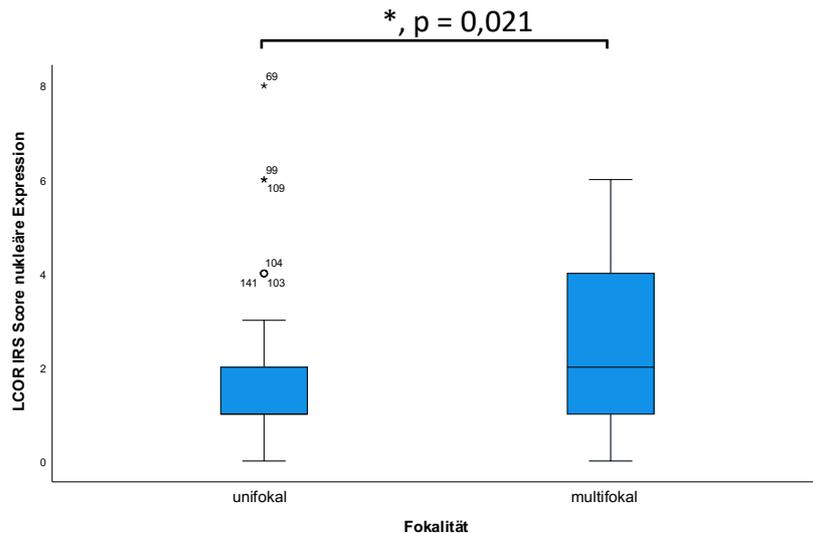


**Figure 2:** Die Expression von LCOR im Zellkern nahm mit steigendem T-Status signifikant ab ( $p < 0,001$ ). Darstellung als Boxplot: Die Box entspricht der 25.-75. Perzentile, der Median ist die Linie in der Box, die Linien entsprechen der 5.-95. Perzentile, die Kreise sind milde Ausreiser mit einem Wert, der maximal 3x der Länge der Box entspricht, die Sternchen sind extreme Ausreiser mit Werten, die  $>3x$  der Länge der Box entsprechen.

### 3.1.1.3 LCoR und Fokalität

Drei der 144 Fälle konnten auf Grund von fehlenden Angaben zur Fokalität nicht bewertet werden. Von den restlichen 141 Fällen waren 79,2% unifokal und 18,8% multifokal. Die restlichen 2,1% beziehen sich auf die fehlenden Angaben.

Es konnte gezeigt werden, dass der nukleäre IRS Score und damit die nukleäre LCoR Expression bei unifokalen Karzinomen signifikant ( $p = 0,021$ ) niedriger ist als bei multifokalen Vulvakarzinomen. Bei unifokalen Karzinomen war ein medianer IRS von 1 ( $p = 0,021$ ) und somit eine niedrige nukleäre LCoR Expression zu finden. Multifokale Karzinome wiesen einen medianen IRS Score von 2 auf ( $p = 0,021$ ) und verfügten somit über eine höhere nukleäre LCoR Expression (Figure 3).



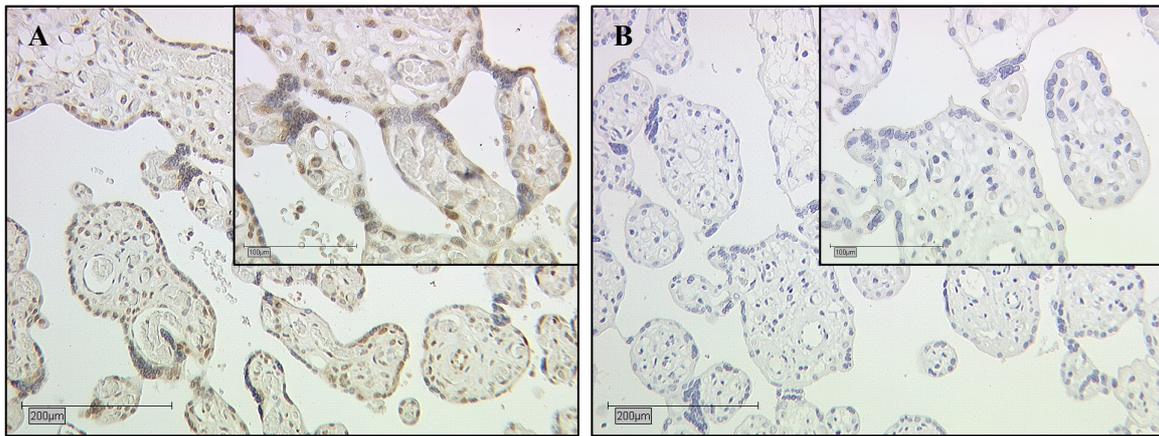
**Figure 3:** Die Expression von LCOR im Zellkern war bei unifokalen Vulvakarzinomen signifikant niedriger als bei multifokalen ( $p = 0,021$ ). Darstellung als Boxplot: Die Box entspricht der 25.-75. Perzentile, der Median ist die Linie in der Box, die Linien entsprechen der 5.-95. Perzentile, die Kreise sind milde Ausreiser mit einem Wert, der maximal 3x der Länge der Box entspricht, die Sternchen sind extreme Ausreiser mit Werten, die 3x der Länge der Box entsprechen.

### 3.1.2 Expression von NRIP1

Das Patientenkollektiv bestand aus 144 Frauen mit Vulvakarzinom (bei 13 der 157 Gewebeprobe n handelte es sich um Vorstufen und nicht um manifestierte Karzinome), deren Gewebeprobe n mit Anti-NRIP1 gefärbt wurden, um dessen Expression im Vulvakarzinom zu analysieren. 140 von diesen immunhistologischen Schnitten konnten ausgewertet werden. In drei davon konnte kein Tumorgewebe gefunden werden und bei drei weiteren schwamm das Gewebe während der Aufbereitung für den Färbeprozess ab.

Insgesamt zeigte sich in 89% der 138 Fälle eine nukleäre Expression von NRIP1 und in 51% der Fälle eine zytoplasmatische Expression. Bei der nukleären Expression von NRIP1 lag der Median bei einem IRS von 3, der Mittelwert bei einem IRS von 2,83, der Modus bei einem IRS von 1 und die Spannweite bei einem IRS von 8 bei einem minimalen Wert von 0 und einem maximalen Wert von 8. Bei der zytoplasmatischen Expression von NRIP1 lag der Median bei einem IRS von 1, der Mittelwert bei einem IRS von 1,04, der Modus bei einem IRS von 0 und die Spannweite bei einem IRS von 4 bei einem minimalen Wert von 0 und einem maximalen Wert von 4.

Die exemplarische Abbildung der Positiv- und Negativkontrollen im Plazentagewebe sind in Abbildung 8 zu sehen.

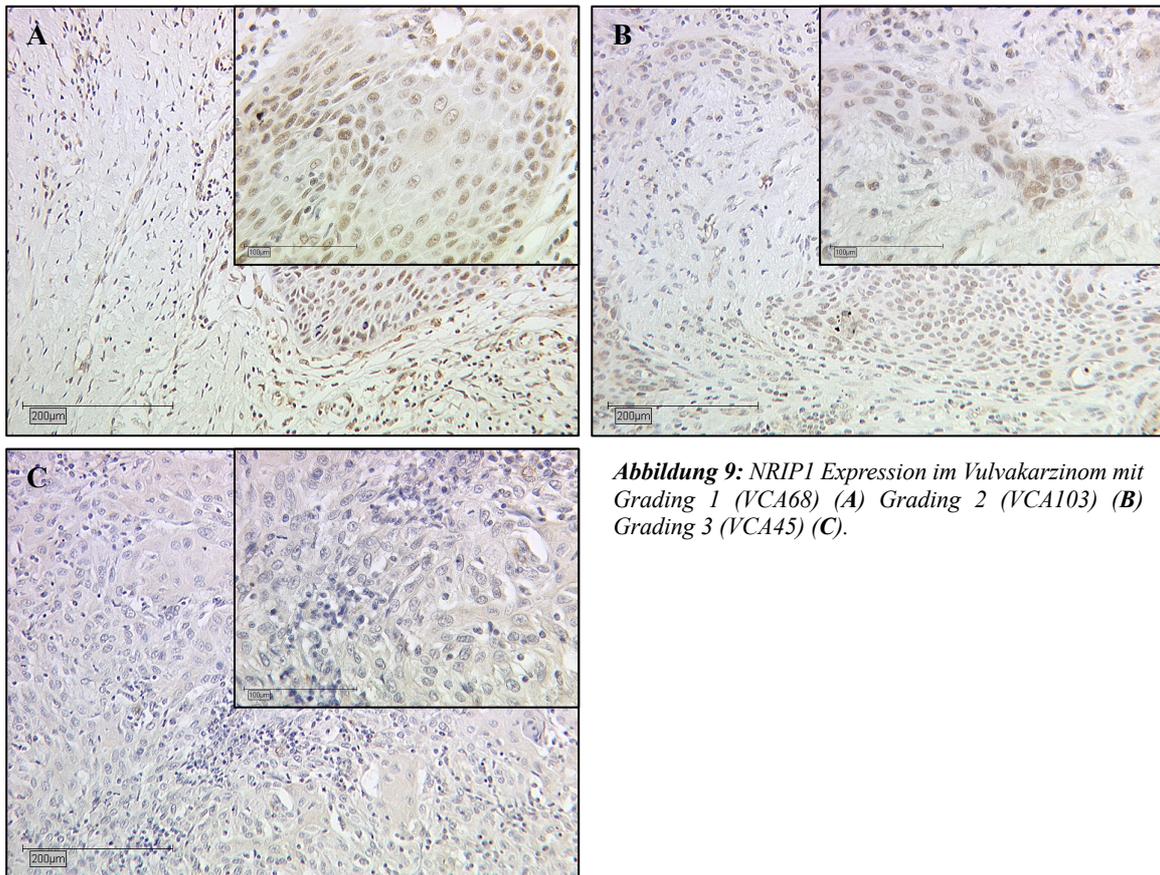


**Abbildung 8:** Positiv- und Negativkontrolle für NRIP 1. LCoR Positivkontrolle (A) und LCoR Negativkontrolle (B) an der Plazenta.

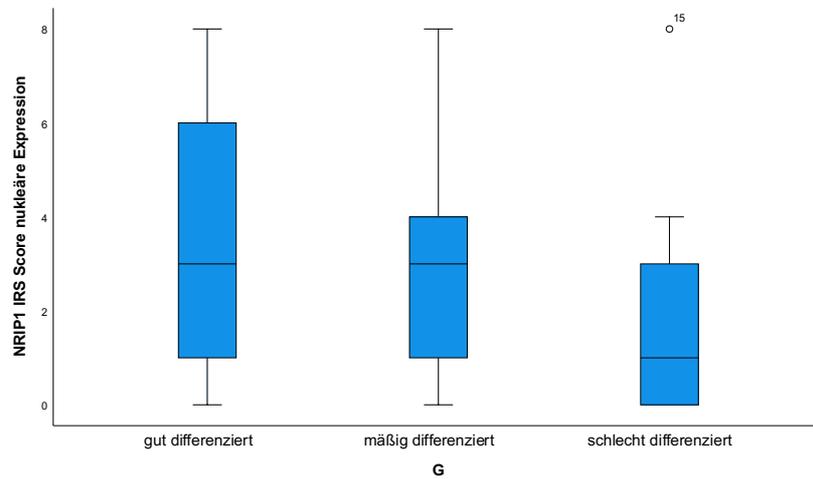
### 3.1.2.1 NRIP1 und Grading

Von den 144 Fällen des Patientenkollektivs konnten drei auf Grund des fehlenden Grading nicht mit in die Wertung genommen werden. Der Median lag für das Grading bei 2, der Mittelwert bei 2,03, der Modus bei 2 und die Spannweite ebenfalls bei 2 bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3. Die Verteilung der Häufigkeit der Gradingstufen lag für G1 bei 17,4%, für G2 bei 60,4% und für G3 bei 20,1%. Bei den restlichen 2,1% handelt es sich um die fehlenden Werte.

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang ( $p=0,01$ ) zwischen einem hohen nukleären IRS Score, also einer hohen nukleären NRIP1 Expression und einem niedrigen Grading gezogen werden. Je höher der IRS Score, desto niedriger war das Grading und umgekehrt. Als G1 und G2 bewertete Karzinome wiesen einen medianen IRS von 3 auf ( $p=0,01$ ) (Abbildung 9 A, B, Figure 4) und als G3 bewertete Karzinome zeigten einen medianen IRS von 1 ( $p=0,01$ ) (Abbildung 9 C, Figure 4).



**Abbildung 9:** NRIP1 Expression im Vulvakarzinom mit Grading 1 (VCA68) (A) Grading 2 (VCA103) (B) Grading 3 (VCA45) (C).



**Figure 4:** Die Expression von NRIP1 im Zellkern nahm mit dem Grading signifikant ab ( $p=0,01$ ). Darstellung als Boxplot: Die Box entspricht der 25.-75. Perzentile, der Median ist die Linie in der Box, die Linien entsprechen der 5.-95. Perzentile, die Kreise sind milde Ausreiser mit einem Wert, der maximal 3x der Länge der Box entspricht, die Sternchen sind extreme Ausreiser mit Werten, die  $>3x$  der Länge der Box entsprechen.

## 3.2 Korrelationsanalysen

### 3.2.1 Negative Korrelation zwischen LCoR und dem Erkrankungsalter

Es konnte eine signifikante, negative Korrelation zwischen der nukleären LCoR Expression und dem Erkrankungsalter festgestellt werden (Korrelationskoeffizient = -0,3;  $p < 0,001$ ). Patientinnen eines Vulvakarzinoms mit einer hohen nukleären LCoR Expression wiesen ein früheres Erkrankungsalter auf. Patientinnen eines Vulvakarzinoms mit einer niedrigen nukleären LCoR Expression wiesen hingegen ein späteres Erkrankungsalter auf.

### 3.2.2 Positive Korrelation zwischen der zytoplasmatischen Expression von LCoR und dem Grading

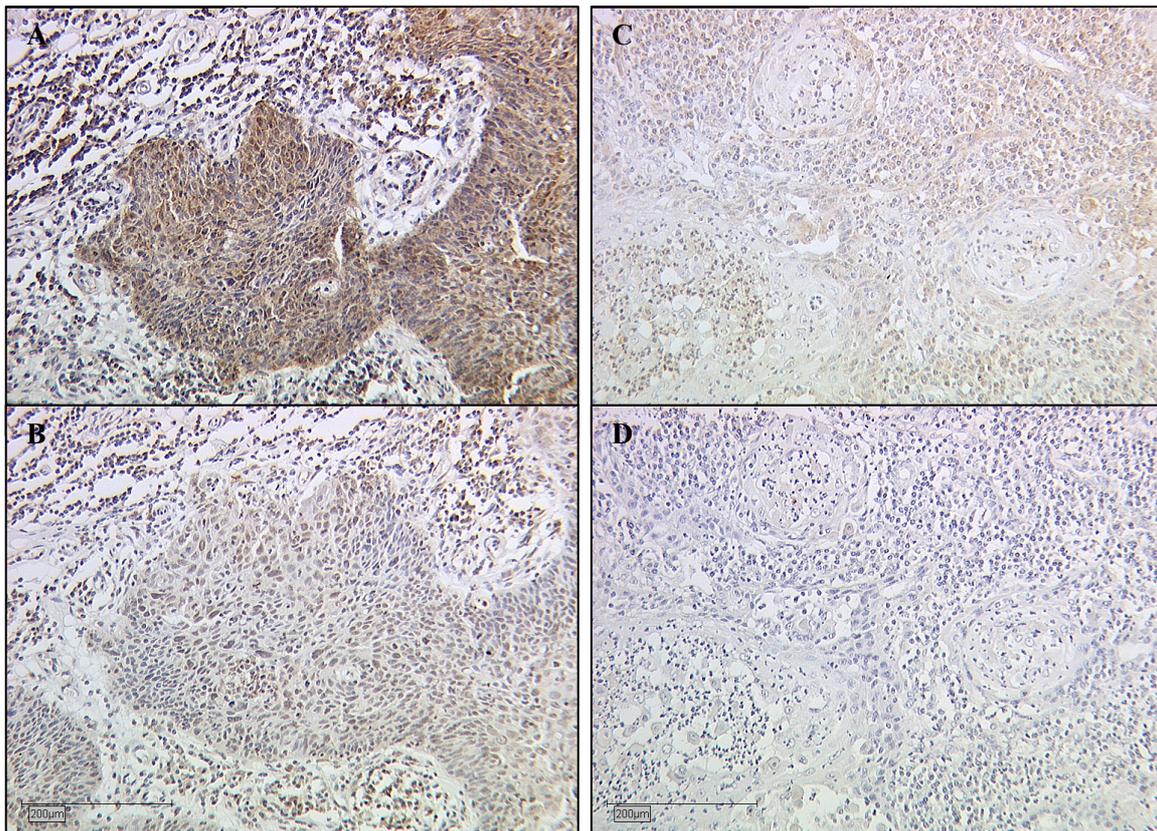
Des Weiteren ergab sich eine positive Korrelation zwischen dem IRS Score der zytoplasmatischen LCoR Expression und dem Grading (Korrelationskoeffizient = 0,184;  $p = 0,03$ ). Je niedriger das Grading, desto niedriger war auch der IRS Score der zytoplasmatischen LCoR Expression und je höher das Grading, desto höher war die zytoplasmatische LCoR Expression. Der Kruskal-Wallis-Test war mit  $p = 0,075$  nicht signifikant.

### 3.2.3 Negative Korrelation zwischen NRIP1 und TumorgroÙe

Es konnte eine negative Korrelation zwischen der TumorgroÙe in mm und dem IRS Score der nukleären NRIP1 Expression gezeigt werden (Korrelationskoeffizient = -0,188;  $p = 0,036$ ). Vulvakarzinome mit einem hohen IRS Score, also einer hohen nukleären NRIP1 Expression wiesen eine niedrige TumorgroÙe in mm auf. Vulvakarzinome mit einem niedrigen IRS Score, also einer niedrigen nukleären NRIP1 Expression hatten hingegen eine größere TumorgroÙe in mm. Für den T-Status konnte keine signifikante Korrelation berechnet werden und der Kruskal-Wallis-Test war mit  $p = 0,219$  nicht signifikant.

### 3.2.4 Positive Korrelation zwischen LCoR und NRIP1

In 81% der Fälle zeigte sich eine positive nukleäre LCoR Expression und in 89% der Fälle eine positive nukleäre NRIP1 Expression. Es zeigte sich eine signifikante, positive Korrelation zwischen der nukleären LCoR und der nukleären NRIP1 Expression (Korrelationskoeffizient = 0,354;  $p < 0,001$ ). Vulvakarzinome mit einer hohen nukleären LCoR Expression zeigten demnach auch eine hohe nukleäre NRIP1 Expression, wie in Abbildung 10 A,B zu sehen ist. Ebenso wiesen Fälle mit einer niedrigen nukleären LCoR Expression auch eine niedrige nukleäre NRIP1 Expression auf (Abbildung 10 C, D).



**Abbildung 10:** Positive Korrelation der hohen nukleären LCoR (A) und NRIP1 (B) Expression (VCA 113), Positive Korrelation der niedrigen nukleären LCoR (C) und NRIP1 (D) Expression (VCA 53).

### 3.3 Überlebensanalysen

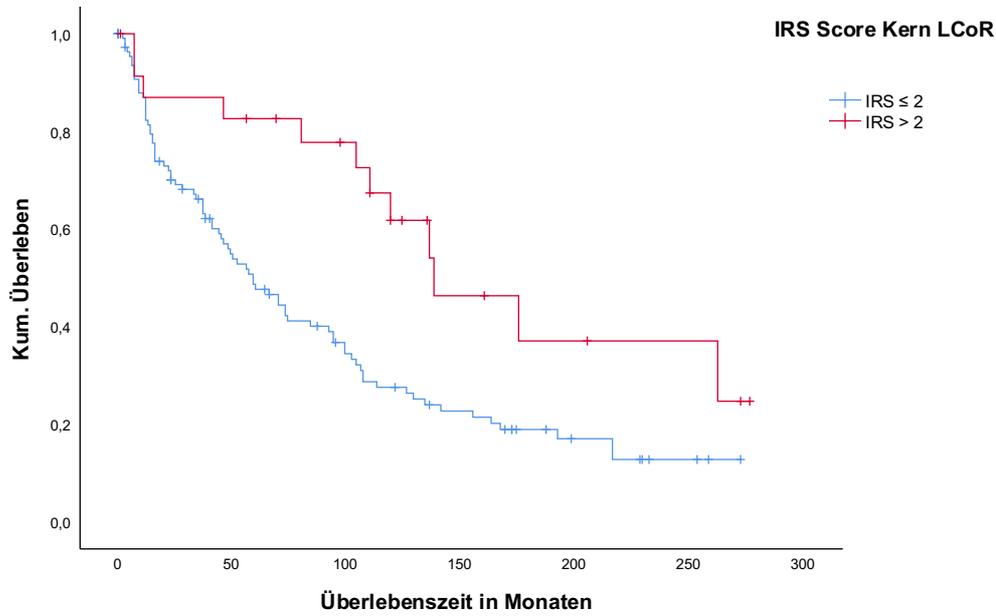
#### 3.3.1 Nukleäre LCoR Expression als Überlebensvorteil

Der Cut-off für den IRS Score wurde über die ROC Analyse mit SPSS Version 25 ermittelt. Es wurde der nukleäre IRS gewählt, bei dem die Differenz zwischen Spezifität und Sensitivität am größten war. Anschließend wurde diese Variable für einen nukleären IRS Score  $> 2$  über die Funktion Variable berechnen neu generiert.

Die Gruppe der Patientinnen mit einem IRS Score  $\leq 2$  wird von 115 Personen gebildet und die Gruppe mit einem IRS Score  $> 2$  beinhaltet 24 Personen. Fünf Patientinnen können wegen fehlender Daten nicht berücksichtigt werden. Der Schätzer des Medians der Überlebenszeit liegt in der Gruppe mit einem IRS  $\leq 2$  bei 59 Monaten mit einem Standardfehler von 9,5 Monaten und einem 95%- Konfidenzintervall von 40,4-77,6 Monaten. In der Gruppe mit einem IRS  $> 2$  liegt der Schätzer des Medians der Überlebenszeit bei 138 Monaten mit einem Standardfehler von 28,2 Monaten und einem 95%-Konfidenzintervall von 82,7-193,3 Monaten.

Es konnte gezeigt werden, dass Vulvakarzinompatientinnen die LCoR nukleär mit einem IRS  $> 2$  exprimierten einen signifikanten Überlebensvorteil ( $p= 0,005$ ) gegenüber

Vulvakarzinompatientinnen mit einer niedrigeren Expression hatten (Figure 5). Dem Robert Koch Institut (3) zufolge beträgt das 5-Jahres Überleben für Patientinnen mit Vulvakarzinom 71% und das 10-Jahres Überleben 66%. Demnach orientiert sich die Gruppe mit einem  $IRS > 2$  am Durchschnittsüberleben bei Vulvakarzinom, wohingegen die Gruppe mit einem  $IRS \leq 2$  eine unterdurchschnittliche Prognose aufweist.



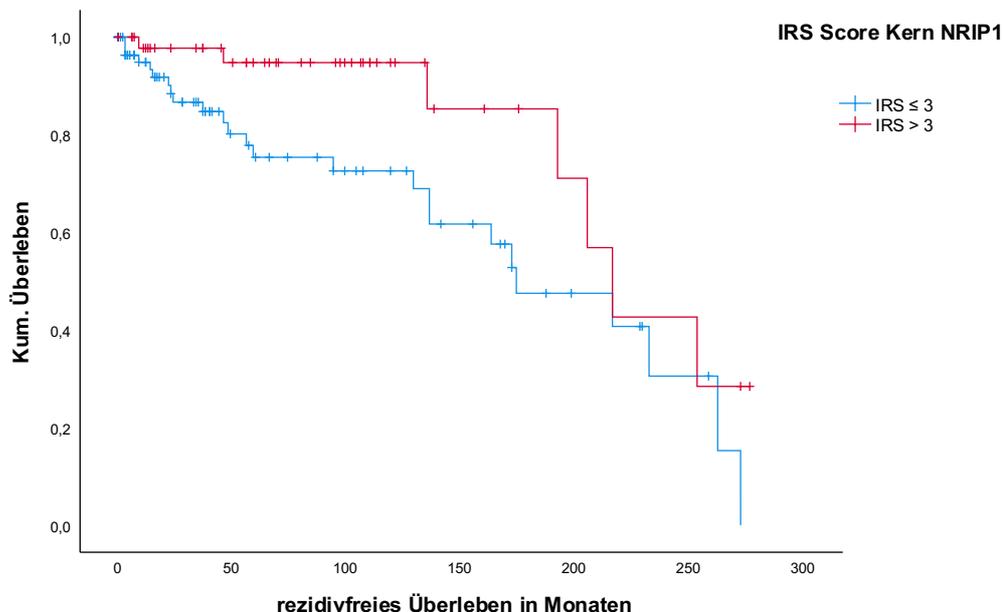
**Figure 5: Kaplan-Meier-Überlebenskurve:** blau:  $IRS \leq 2$ , rot:  $IRS > 2$ . Es zeigte sich ein signifikanter ( $p=0,005$ ) Überlebensvorteil für Patientinnen, deren Vulvakarzinom eine höhere nukleäre LCoR Expression aufwies.

### 3.3.2 Nukleäre NRIP1 Expression als Vorteil für das rezidivfreie Überleben

Der Cut-off für den IRS Score wurde über die ROC Analyse mit SPSS ermittelt. Es wurde der nukleäre IRS gewählt, bei dem die Differenz zwischen Spezifität und Sensitivität am größten war. Anschließend wurde diese Variable für einen nukleären IRS Score  $> 3$  über die Funktion Variable berechnen neu generiert.

Die Gruppe der Patientinnen mit einem IRS Score  $\leq 3$  wird von 88 Personen gebildet und die Gruppe mit einem IRS Score  $> 3$  beinhaltet 48 Personen. Acht Patientinnen können wegen fehlender Daten nicht berücksichtigt werden. Der Schätzer des Medians der rezidivfreien Überlebenszeit liegt in der Gruppe mit einem IRS  $\leq 3$  bei 174 Monaten mit einem Standardfehler von 29,9 Monaten und einem 95%- Konfidenzintervall von 115,5-232,5 Monaten. In der Gruppe mit einem IRS  $> 3$  liegt der Schätzer des Medians der rezidivfreien Überlebenszeit bei 216 Monaten mit einem Standardfehler von 14 Monaten und einem 95%-Konfidenzintervall von 188,6-243,4 Monaten.

Es zeigte sich, dass Patientinnen, die ein Vulvakarzinom mit einem IRS Score  $> 3$ , also einer höheren nukleären Expression von NRIP1, einen signifikanten Vorteil für die Länge des rezidivfreien Überlebens ( $p= 0,022$ ) hatten. Vulvakarzinompatientinnen mit einem IRS Score  $\leq 3$  und damit einer niedrigeren nukleären NRIP1 Expression, zeigten ein kürzeres rezidiv freies Überleben (Figure 6).



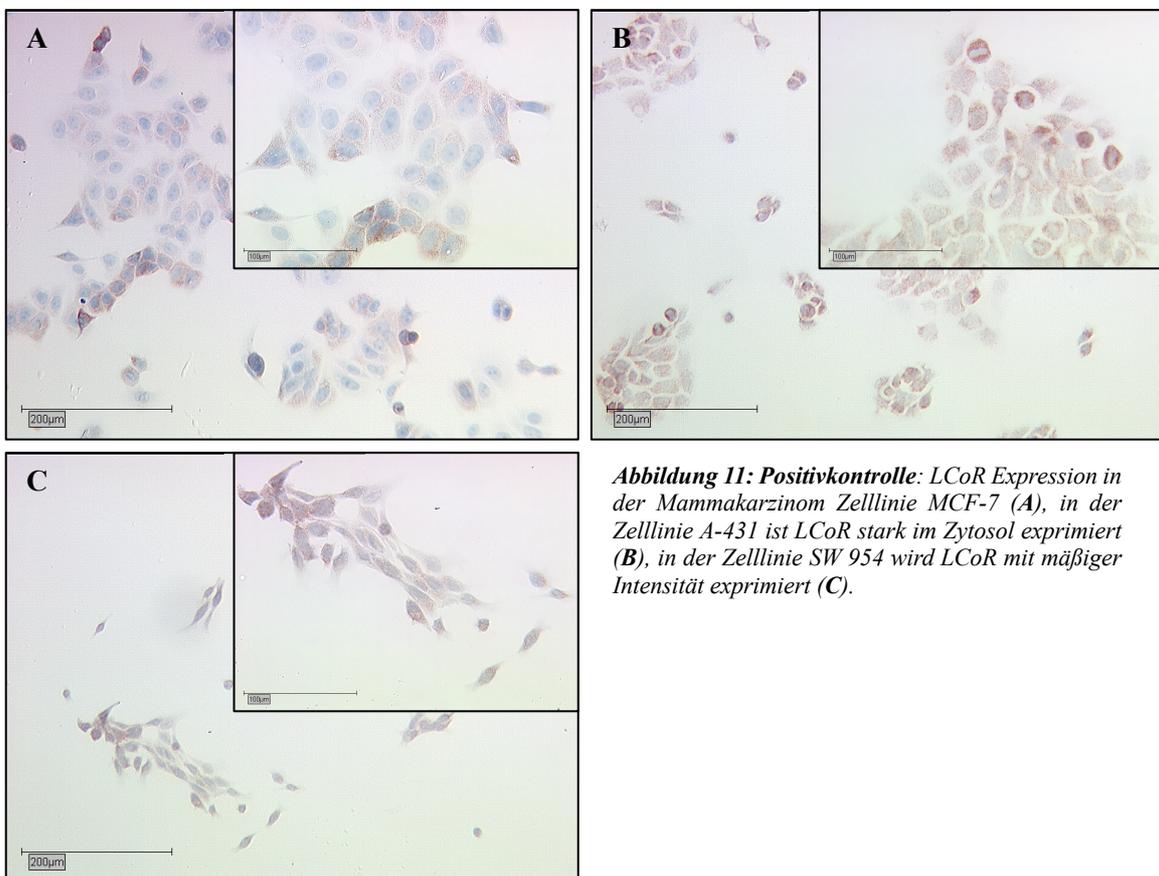
**Figure 6:** Kaplan-Meier-Überlebenskurve: blau: IRS  $\leq 3$ , rot: IRS  $> 3$ . Es zeigte sich ein längeres rezidivfreies Überleben für Patientinnen, deren Vulvakarzinom eine höhere nukleäre NRIP1 Expression aufwies.

### 3.4 Immunzytologie

Die Immunzytochemie diente der Überprüfung, ob die beiden Zelllinien A-431 und SW 954 die Transkriptionsfaktoren LCoR und NRIP1 exprimierten. Um sicher zu stellen, dass die Transkriptionsfaktoren auch tatsächlich exprimiert wurden, wurde eine Positivkontrolle mitgeführt.

#### 3.4.1 LCoR Expression in den Zelllinien A-431 und SW 954

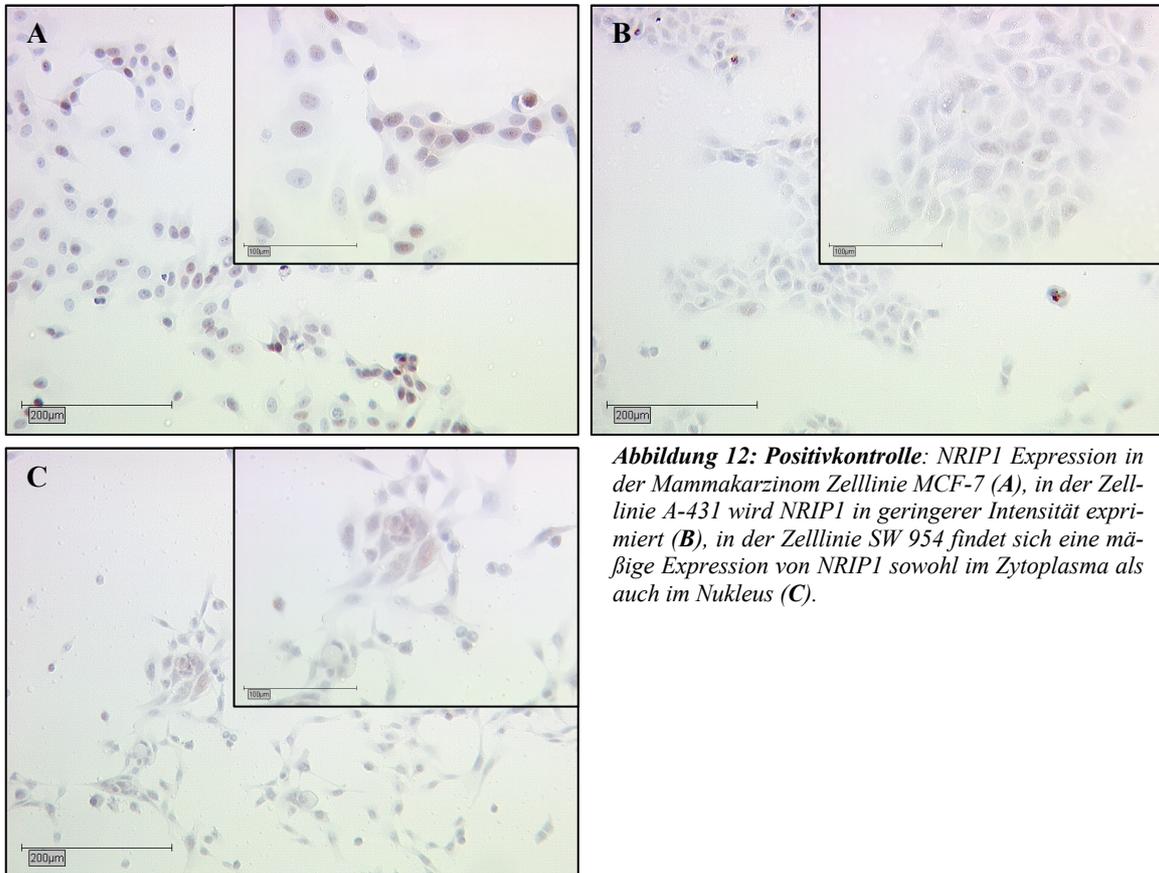
Als Positivkontrolle für LCoR dienten Mammakarzinomzellen der Linie MCF-7 (Abbildung 11, A). Es zeigte sich eine positive zytoplasmatische und eine negative nukleäre Expression. Die LCoR Expression für die Zelllinie A-431 (B) und SW 954 (C) sind in den anderen beiden Abbildungen dargestellt.



**Abbildung 11: Positivkontrolle:** LCoR Expression in der Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 (A), in der Zelllinie A-431 ist LCoR stark im Zytoplast exprimiert (B), in der Zelllinie SW 954 wird LCoR mit mäßiger Intensität exprimiert (C).

### 3.4.2 NRIP1 Expression in den Zelllinien A-431 und SW 954

Als Positivkontrolle für NRIP1 dienten ebenfalls Mammakarzinomzellen der Linie MCF-7 (Abbildung 12, A). Die NRIP1 Expression in den Zelllinie A-431 (B) und SW 954 (C) ist in den anderen beiden Abbildungen zu sehen.



**Abbildung 12: Positivkontrolle:** NRIP1 Expression in der Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 (A), in der Zelllinie A-431 wird NRIP1 in geringerer Intensität exprimiert (B), in der Zelllinie SW 954 findet sich eine mäßige Expression von NRIP1 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus (C).

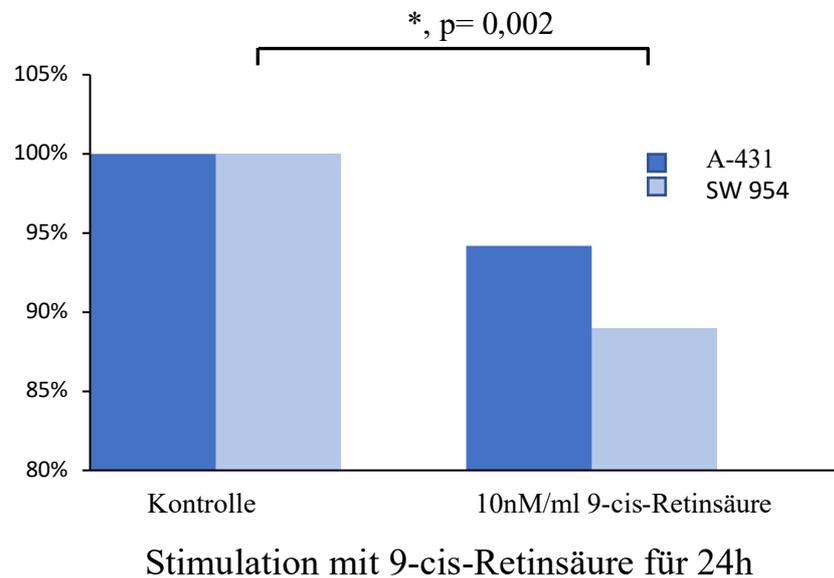
### 3.5 WST (Water soluble tetrazolium) Assay

Mit Hilfe des WST sollte die Wirkung von 15dPGJ<sub>2</sub> und 9-cis-Retinsäure auf die Viabilität der Vulvakarzinom-Zelllinien A-431 und SW 954 untersucht und damit Rückschlüsse auf deren Proliferation und Viabilität gezogen werden. Der Versuch wurde sowohl in alleiniger Stimulation als auch mit beiden Stimulantien parallel durchgeführt.

#### 3.5.1 Stimulation der Zelllinien A-431 und SW 954 mit 9-cis-Retinsäure

Unter der Stimulation mit 1nM/ml 9-cis-Retinsäure erfolgte in beiden Zelllinien eine leichte Steigerung der Viabilität, die jedoch bei beiden nicht signifikant war. Die Viabilität von A-431 stieg unter 1nM/ml 9-cis-Retinsäure im Vergleich zur Kontrolle um 5% an und die von SW 954 um 3%. Unter der Stimulation mit 10nM/ml 9-cis-Retinsäure konnte in der Vulvakarzinom-Zelllinie SW 954 ein signifikanter Abfall ( $p=0,002$ ) der Viabilität im Vergleich zu den Kontrollen gemessen werden. Die Viabilität ist von 100%,

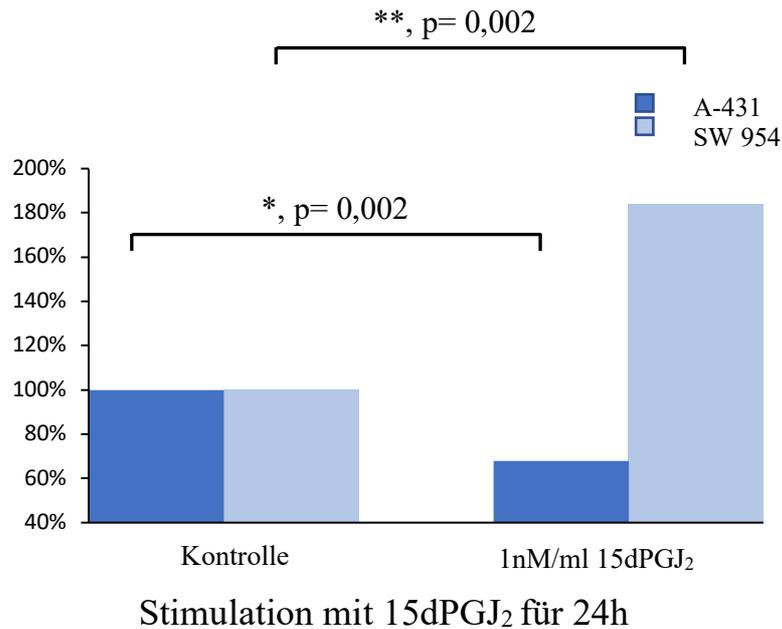
dem Ausgangswert, auf den alle Kontrollen normiert wurden, signifikant auf 89% abgesunken ( $p=0,002$ ). In der Zelllinie A-431 war ebenfalls ein Rückgang, wenn auch nicht signifikant ( $p=0,39$ ) auf 94%, zu beobachten (Figure 7).



**Figure 7: Vergleich der Viabilität der Vulvakarzinomzellen A-431 und SW 954 unter Stimulation mit 9-cis-Retinsäure, Darstellung von A-431 durch die dunklen und von SW 954 durch die hellen Balken, \* Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und der Stimulation mit 10nM/ml 9-cis-Retinsäure in der Zelllinie SW 954 gemessen.**

### 3.5.2 Stimulation der Zelllinien A-431 und SW 954 mit 15dPGJ<sub>2</sub>

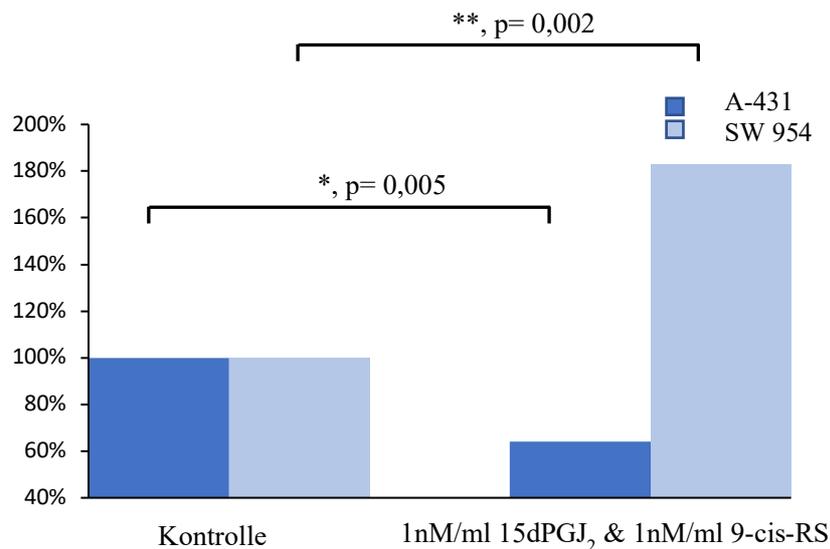
Unter der Stimulation mit 15dPGJ<sub>2</sub> konnte in beiden Vulvakarzinom-Zelllinien sowohl für die Stimulation mit 1nM/ml als auch mit 10nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> signifikante Unterschiede zu den Kontrollen gemessen werden. Die Viabilität der Zelllinie A-431 nahm unter Stimulation mit 1nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> im Vergleich zu den Kontrollen signifikant auf 68% ab ( $p=0,002$ ) (Figure 8). Im Gegensatz dazu stieg die Viabilität der Zelllinie SW 954 unter Stimulation mit 1nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> im Vergleich zu den Kontrollen signifikant auf 184% an ( $p=0,002$ ) (Figure 8). Die Zelllinien reagierten demnach gegensätzlich auf die Stimulation mit 1nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub>. Unter der Stimulation mit 10nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> reagierten beide Zelllinien mit einer starken Abnahme der Viabilität. In der Zelllinie A-431 konnte zu den Kontrollen ein signifikanter Abfall der Viabilität auf 35% ( $p=0,002$ ) beobachtet werden. In der Zelllinie SW 954 war im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls eine signifikante Abnahme auf 33% ( $p=0,002$ ) zu sehen. Durch die Quantifizierung der Viabilität unter Stimulation mit 10nM/15dPGJ<sub>2</sub> konnte gezeigt werden, dass bei dieser Konzentration noch 39% der A-431 Zellen und 21% der SW 954 Zellen am Leben waren (sh. Kapitel 3.4.).



**Figure 8: Vergleich der Viabilität der Vulvakarzinomzellen A-431 und SW 954 unter Stimulation mit 15dPGJ<sub>2</sub>**  
 Darstellung von A-431 durch die dunklen und von SW 954 durch die hellen Balken \* Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und der Stimulation mit 1nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> in der Zelllinie A-431 gemessen. \*\* Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und der Stimulation mit 1nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> in der Zelllinie SW 954 gemessen.

### 3.5.3 Stimulation der Zelllinien A-431 und SW 954 mit 15dPGJ<sub>2</sub> und 9-cis-Retinsäure

Unter der Stimulation mit 1nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> und 1nM/ml 9-cis-Retinsäure konnte in der Zelllinie A-431 ein signifikanter Abfall der Viabilität ( $p=0,005$ ) von 100% in den Kontrollen auf 64% unter Stimulation gemessen werden (Figure 9). Im Gegensatz dazu war in der Zelllinie SW 954 unter Stimulation mit 1nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> und 1nM/ml 9-cis-Retinsäure eine signifikante Zunahme der Viabilität ( $p=0,002$ ) auf 183% im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten (Figure 9). Bei der Stimulation mit 10nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> und 10nM/ml 9-cis-Retinsäure war in beiden Zelllinien ein signifikanter Rückgang der Viabilität zu sehen. Die Viabilität der A-431 Zellen nahm im Vergleich zu den Kontrollen signifikant von 100% auf 35% ab ( $p=0,002$ ). In den SW 954 Zellen war ein Abfall von 100% auf 51% zu beobachten ( $p=0,002$ ).

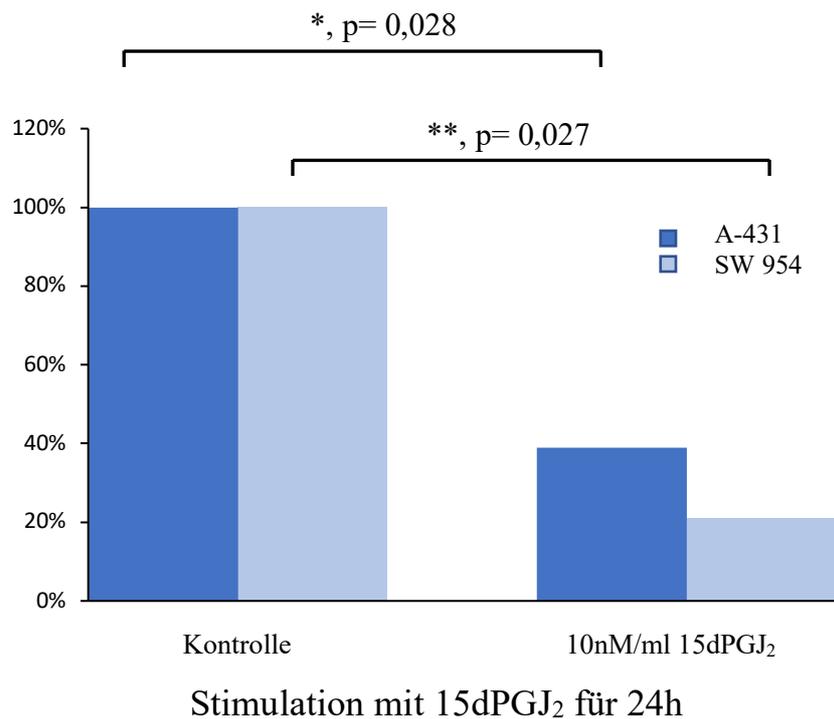


### Stimulation mit 15dPGJ<sub>2</sub> & 9-cis-Retinsäure für 24h

**Figure 9: Vergleich der Viabilität der Vulvakarzinomzellen A-431 und SW 954 unter Stimulation mit 15dPGJ<sub>2</sub> und 9-cis-Retinsäure**, Darstellung von A-541 durch die dunklen und von SW 954 durch die hellen Balken, \* Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und der Stimulation mit 1nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> und 1nM/ml 9-cis-Retinsäure in der Zelllinie A-431 gemessen. \*\* Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und der Stimulation mit 1nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> und 1nM/ml 9-cis-Retinsäure in der Zelllinie SW 954 gemessen.

### 3.6 Quantifizierung der Viabilität der Zelllinien A-431 und SW 954 unter Stimulation mit 10nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub>

Eine Zellzählung beider Zelllinien unter Stimulation mit 10nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> im Vergleich zu den auf 100% normierten Kontrollen ergab für A-431 einen signifikanten Rückgang der lebenden Zellen um 61% (p= 0,028) und für SW 954 einen signifikanten Rückgang um 79% (p= 0,027) (Figure 10).



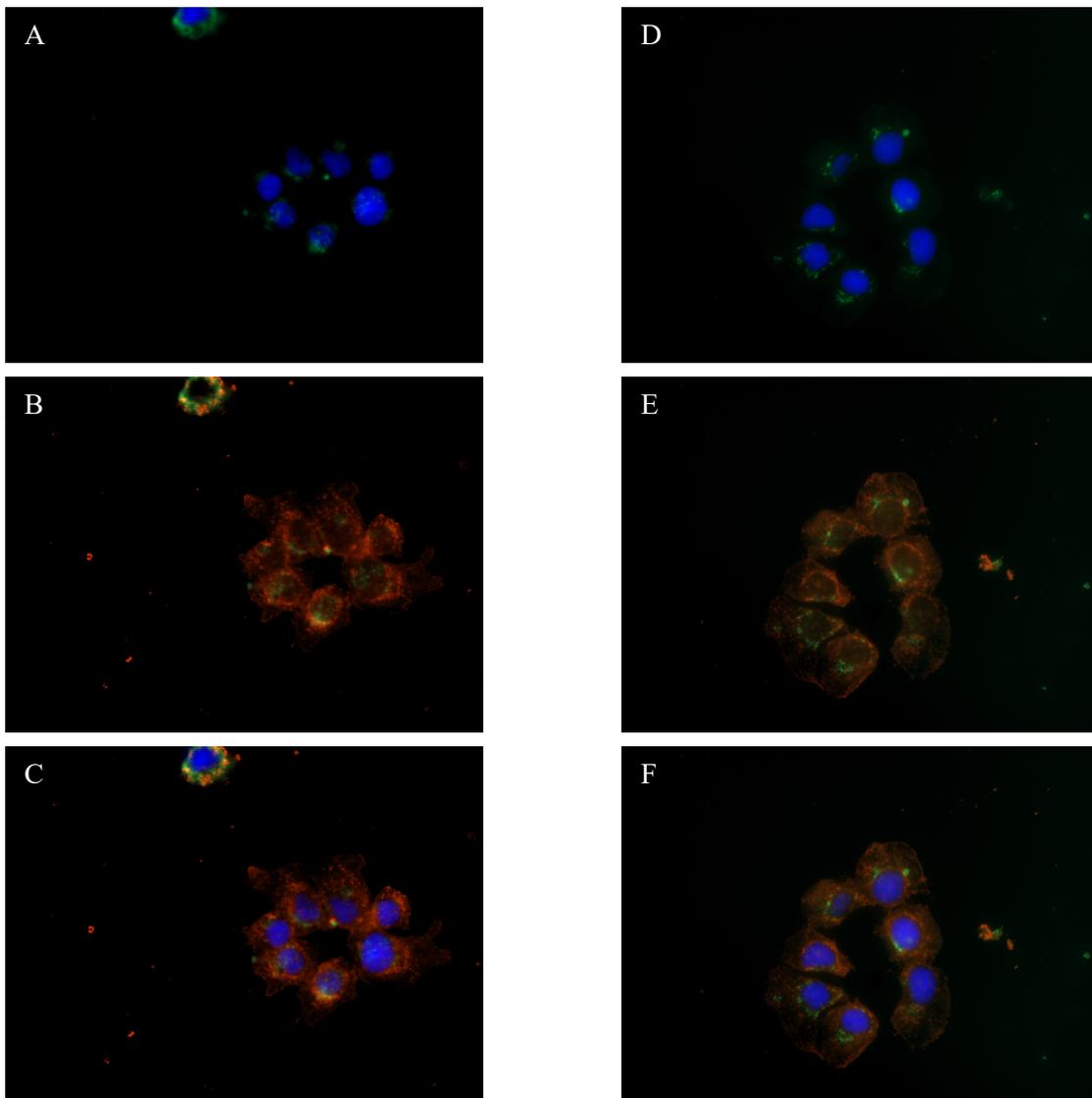
**Figure 10: Quantifizierung der Zellviabilität von A-431 und SW 954 unter Stimulation mit 10nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub>.** Darstellung von A-431 durch die dunklen und von SW 954 durch die hellen Balken, \*Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der lebenden A-431-Zellen in den Kontrollen im Vergleich zur Stimulation unter 10nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> festgestellt. \*\*Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der lebenden SW 954-Zellen in den Kontrollen im Vergleich zur Stimulation unter 10nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> festgestellt.

### 3.7 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurde auf Grund von Unterschieden in der Viabilität der Zelllinien A-431 und SW 954 unter Stimulation mit 1nM/ml 15dPGJ<sub>2</sub> gemacht. Es fiel auf, dass die Viabilität in der Zelllinie SW 954 zunahm, wohingegen sie in der Zelllinie A-431 zurück ging. Dafür wurde die Expression von LCoR und PPARgamma-Ser112 im Kern und im Zytoplasma beurteilt. Prostaglandine wie 15dPGJ<sub>2</sub> binden an PPARgamma und aktivieren den kernständigen Rezeptor, der dann wiederum als Transkriptionsfaktor fungiert und so die Transkription diverser Gene beeinflusst (78). LCoR fungiert überwiegend als Repressor der Transkription, indem er Kernrezeptoren und Transkriptionsfaktoren beeinflusst (79). Dabei kann er unter anderem die Aktivität von PPARgamma steigern (80).

### 3.7.1 Nukleäre Expression von LCoR und PPARgamma in der Zelllinie A-431

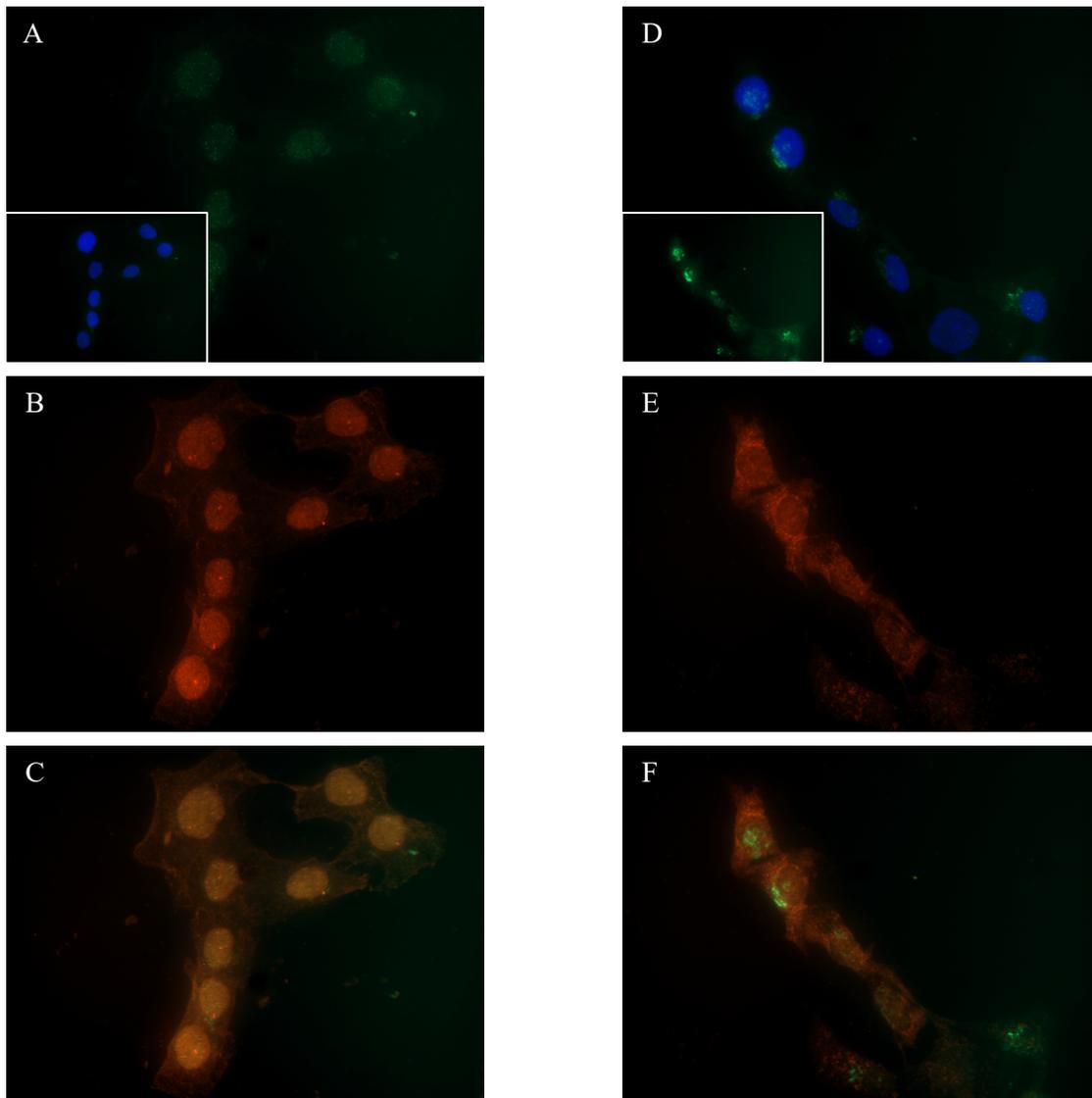
Es konnte festgestellt werden, dass die Zelllinie A-431 weder in der Kontrolle (Abbildung 13 a-c)) noch unter Stimulation mit 1nM 15dPGJ<sub>2</sub> (Abbildung 13 d-f)) LCoR (rot) und PPARgammaSer112 (grün) im Kern exprimiert. PPARgammaSer112 ist leicht im Zytoplasma exprimiert (Abbildung 13 a-c) und LCoR ist ebenfalls nur zytoplasmatisch exprimiert (Abbildung 13 b, c)). Nach Stimulation ist in der nukleären Expressierung von LCoR und PPARgammaSer112 keine Veränderung zu sehen (Abbildung 13 d-f). Die Darstellung der Kerne erfolgt durch DAPI (blau).



**Abbildung 13:** Doppelimmunfluoreszenz-Färbung mit den Primärantikörpern LCoR und PPARgamma Ser112, Kontrollen und unter Stimulation mit 1nM 15dPGJ<sub>2</sub> in der Zelllinie A-431. Kontrollen sind links (A, B, C), Stimulationen mit 1nM 15dPGJ<sub>2</sub> sind rechts (D, E, F); die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. PPARgamma Ser112 ist mit dem Cy2-Sekundärantikörper markiert und grün angefärbt (A). LCoR ist mit dem Cy3-Sekundärantikörper markiert und rot angefärbt (B). Die Dreifachfilterung zeigt eine simultane LCoR und PPARgammaSer112 Expression im Zytoplasma mit eindeutiger Aussparung des Zellkerns (C). Unveränderte PPARgammaSer112 und LCoR Expression unter Stimulation mit 1nM 15dPGJ<sub>2</sub> (D, E, F). Die Fluoreszenzbilder wurden bei einer x63 Vergrößerung aufgenommen.

### 3.7.2 Nukleäre Expression von LCoR und PPARgamma in der Zelllinie SW 954

Durch die Doppelimmunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie SW 954 sowohl PPARgammaSer112 (grün), als auch LCoR (rot) vor allem nukleär aber auch zytoplasmatisch exprimiert (Abbildung 14 a-c)). Die Co-Expressionen sind durch die Fusion des roten und grünen Farbstoffes zu einer gelben Färbung erkennbar (Abbildung 14 c, f)) Unter Stimulation ist eine Veränderung der Lokalisation von LCoR und PPARgammaSer112 zu beobachten. Die Kernexpression der beiden nimmt ab und es kommt zu einer verstärkten zytoplasmatischen Expression von LCoR und PPARgammaSer112 (Abbildung 14 e, f). Die Darstellung der Kerne erfolgt durch DAPI (blau) (Abbildung 14 d).



**Abbildung 14:** Doppelimmunfluoreszenz-Färbung mit den Primärantikörpern LCoR und PPARGamma Ser112, Kontrollen und unter Stimulation mit 1nM 15dPGJ<sub>2</sub> in der Zelllinie SW 954. Kontrollen sind links (A, B, C), Stimulationen mit 1nM 15dPGJ<sub>2</sub> sind rechts (D, E, F); die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. PPARGammaSer112 ist mit dem Cy2-Sekundärantikörper markiert und grün angefärbt. Es ist eine eindeutige nukleäre Expression zu erkennen. Der Bildausschnitt links unten stellt die Kernfärbung mit DAPI dar (A). LCoR ist mit dem Cy3-Sekundärantikörper markiert, somit rot angefärbt und es ist eine eindeutige nukleäre Expression von LCoR zu erkennen (B). Die Gelbfärbung ist durch eine simultane Expression von LCoR (rot) und PPARGammaSer112 (grün) bedingt. Man sieht eine eindeutige nukleäre Ko-Expression von LCoR und PPARGammaSer112 (C). Unter Stimulation mit 1nM 15dPGJ<sub>2</sub> liegt bei LCoR sowie PPARGammaSer112 keine Kernfärbung mehr vor (D, E, F). In D wird nochmals die Kernfärbung mit DAPI dargestellt, um die fehlende nukleäre Expression von LCoR und PPARGammaSer112 zu verdeutlichen. Die Fluoreszenzbilder wurden bei einer x63 Vergrößerung aufgenommen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass im Vulvakarzinomgewebe Veränderungen in der Expression der nukleären Rezeptor Liganden „Ligand dependent corepressor“ (LCoR) und „Receptor-interacting protein of 140 kDa“ (RIP140) auch bekannt als „Nuclear-receptor interacting protein 1“ (NRIP1) (in der weiteren Arbeit immer als NRIP1 bezeichnet) zu finden waren. Die nukleäre Expression von LCoR konnte mit den positiven prognostischen Faktoren niedriges Grading, d.h. gut differenzierten Karzinomen und einem niedrigen Tumorstadium assoziiert werden, wobei sie ebenfalls mit einer Tendenz zu multifokalen Karzinomen einherging. Seine ausgeprägte zytoplasmatische Expression war mit eher schlecht differenzierten Karzinomen, d.h. einem negativen Prognosefaktor, assoziiert. Zudem wiesen Patientinnen mit einer stärkeren nukleären Expression ein jüngeres Erkrankungsalter sowie einen allgemeinen Überlebensvorteil gegenüber der Gruppe mit niedriger nukleärer LCoR Expression auf. Dabei entspricht das Überleben mit höherer LCoR Expression dem Durchschnittsüberleben nach Daten des Robert Koch Institutes (3). Die nukleäre Expression von NRIP1 war mit gut differenzierten Karzinomen, einer kleineren Tumorgröße sowie einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert. Zudem zeigte sich, dass die nukleäre LCoR und die NRIP1 Expression im Vulvakarzinomgewebe ebenfalls miteinander assoziiert sind.

In vitro wurde mittels eines WST-Assays untersucht, wie die Vulvakarzinomzelllinien A-431 und SW 954 auf die Stimulation mit Retinsäure (in diesem Fall 9-cis-Retinsäure) und einem Prostaglandin (15dPGJ<sub>2</sub>) reagierten. Hier zeigte sich unter der Stimulation mit höher dosierter 9-cis-Retinsäure (10nM/ml) ein Abfall der Viabilität beider Zelllinien, der jedoch nur in der Zelllinie SW 954 signifikant war. Unter dem Einfluss von 15dPGJ<sub>2</sub> waren in beiden Zelllinien stark unterschiedliche Ergebnisse zu beobachten. Unter Stimulation mit niedrig dosiertem 15dPGJ<sub>2</sub> (1nM/ml) nahm die Viabilität in der Zelllinie A-431 signifikant ab, wohingegen sie in der Zelllinie SW 954 signifikant zunahm. Dieser Effekt war ebenfalls bei der parallelen Stimulation mit jeweils niedrig dosierter 9-cis-Retinsäure (1nM/ml) und niedrigdosiertem 15dPGJ<sub>2</sub> zu beobachten.

Um dieses Phänomen zu erklären, wurde unter Stimulation mit niedrig dosiertem 15dPGJ<sub>2</sub> eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit dem Peroxisom-Proliferator aktivierten Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) und LCoR durchgeführt. Diese zeigte in den Kontrollen Unterschiede in der nukleären Expression der Zelllinien. In der Zelllinie A-431 war in beiden Fällen keine nukleäre Expression für PPAR $\gamma$  und LCoR zu sehen, wohingegen die

Zelllinie SW 954 in der Kontrolle eine ausgeprägte nukleäre Coexpression von PPAR $\gamma$  und LCoR aufwies. Unter Stimulation fand hier eine Verschiebung der Expression von PPAR $\gamma$  und LCoR vom Zellkern Richtung Zytoplasma statt, was den Hinweis auf eine mögliche wachstumshemmende Wirkung von PPAR $\gamma$  und LCoR im Zellkern liefert.

#### 4.2 LCoR als prognostischer Tumormarker

LCoR wurde erstmals 2003 von Fernandes und Kollegen (79) als breitflächig im adulten und fetalen Gewebe sowie in verschiedenen Zelllinien exprimierter Korepressor nukleärer Rezeptoren identifiziert und beschrieben. Er agiert über C-terminale Bindungsproteine und die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen und moduliert so u.a. den Estrogen Rezeptor  $\alpha$ . In neueren Studien konnte die Interaktion mit dem „Krüppel-like factor 6“ (KLF6), einem mutmaßlichen Tumorsuppressor im Prostatakarzinomgewebe (81), sowie mit dem Peroxisom-Proliferator-aktiviertem Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) und dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) gezeigt werden (80). Weiterhin wurde auch deutlich, dass LCoR nicht nur als Korepressor, sondern auch als Koaktivator wirken kann (80). 2011 entdeckten Asim und Kollegen (82) im Xenograft Mausmodell, dass LCoR über Korepression des aktivierten Androgen Rezeptors (AR) das Wachstum im Prostatakarzinom inhibiert. Mittlerweile ist die immunhistochemische LCoR Expression in diversen Tumorgeweben untersucht. Vogelsang und Kollegen (83) analysierten die LCoR und NRIP1 Expression in zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) sowie deren Korrelation mit der Dedifferenzierung der CINs. Hierbei konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen gut differenzierten Vorstufen und einer hohen LCoR Expression beobachtet werden. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen im Vulvakarzinomgewebe. In einer weiteren Studie von Vattai und Kollegen (84) zur immunhistochemischen Expression von LCoR und NRIP1 im Cervixkarzinomgewebe konnte festgestellt werden, dass Patientinnen mit einer niedrigen nukleären Koexpression von LCoR und NRIP1 ein längeres Überleben aufwiesen als Patientinnen mit einer höheren Expression. Unsere Beobachtungen zum Vulvakarzinom waren hierzu gegensätzlich und ergaben für Patientinnen mit LCoR Expression ein längeres Überleben verglichen mit der Patientengruppe ohne nukleäre LCoR Expression. Wobei das Überleben der Patientengruppe mit stärkerer LCoR Expression den Daten zum Durchschnittsüberleben des Robert Koch Institutes entspricht (3). Auch im Mammakarzinomgewebe wurden LCoR und NRIP1 in verschiedenen Studien untersucht. Deckungsgleich mit unseren Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die nukleäre LCoR Expression mit niedrigeren Tumorstadien assoziiert ist (85) und eine niedrige LCoR Expression

mit einem kürzeren Überleben einher geht (75). Diese je nach Tumorgewebe unterschiedlichen Ergebnisse legen verschiedene Wirkmechanismen von LCoR nahe, die zum aktuellen Stand der Forschung nur unzureichend erklärbar sind. Aufgrund der hier gefundenen Ergebnisse, dass die nukleäre LCoR Expression mit einem niedrigen Grading, einem frühen Tumorstadium sowie einem längeren Überleben, im Vergleich zu Patientinnen mit niedriger nukleärer LCoR Expression, assoziiert ist, könnte LCoR ein vielversprechender prognostischer Marker in diversen Tumorgeweben sein und abhängig vom Signalweg Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten liefern.

#### 4.3 NRIP1 als prognostischer Tumormarker

Ähnlich wie LCoR agiert NRIP1 über die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen und über C-terminale Bindungsproteine (86) (87). NRIP1 wurde erstmals 1995 von Cavailles und Kollegen (88) als hormonabhängiger Repressor des Estrogen Rezeptors  $\alpha$  beschrieben. Seitdem konnte NRIP1 als Co-Repressor vieler weiterer nukleärer Rezeptoren, wie u.a. PPAR $\alpha/\gamma/\delta$  sowie von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (89) (90). Zudem konnte gezeigt werden, dass NRIP1 eine wichtige Rolle in der Krebsentwicklung und -progression spielt. In Colon-Karzinomen beeinflusst NRIP1 über die Stimulation der Transkription des Tumorsuppressorgens APC den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg negativ und inhibiert somit die Zellproliferation, die Epithelzellprogression und das Tumorstadium (91). Über die direkte Interaktion zwischen E2D1 und NRIP1 in Brustkrebszellen wird die Anzahl der Zellen in S-Phase reduziert und somit die Zellproliferation gehemmt (92). Dies deckt sich mit verschiedenen Studien am Mammakarzinomgewebe, in denen NRIP1 als positiver prognostischer Marker identifiziert werden konnte. Patientinnen mit einer hohen nukleären NRIP1 Expression wiesen ein niedrigeres Tumorstadium auf (85), was wir ebenfalls in unseren Ergebnissen für das Vulvakarzinom sahen, und hatten längeres Überleben im Vergleich zu Patientinnen mit niedriger NRIP1 Expression (75). Letzteres konnten wir in unseren Daten für das Vulvakarzinom nicht nachweisen, dafür war ein längeres Rezidiv freies Überleben zu beobachten. Vergleichbare Beobachtungen zum Mammakarzinom wurden von Zhang und Kollegen (93) für das hepatozelluläre Karzinom beschrieben. Es konnte eine verminderte Expression von NRIP1 im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Lebergewebe beobachtet werden. In einer in vivo Untersuchung mit in Mäuse injizierten MHCC97-Zellen (HCC-Zelllinie) mit NRIP1 Knockdown und einer Vergleichsgruppe ohne Knockdown konnte in der Knockdown Gruppe eine wesentlich stärker ausgeprägte Metastasierung beobachtet werden. Dies deckt sich mit unserer Beobachtung, dass Patientinnen mit Vulvakarzinom und NRIP1 Expression

ein längeres Rezidiv freies Überleben aufweisen. Daten zur NRIP1 Expression bei Patient/innen mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) ergaben ebenfalls ein längeres Überleben bei stärkerer Expression sowie längere Zeitintervalle bis zur medikamentösen Therapieindikation (94) (95).

#### 4.4 Interaktion von LCoR und NRIP1

Trotz unterschiedlicher Homologie rekrutieren LCoR und NRIP1 ähnliche Kofaktoren, welche in der Repression der Transkription involviert sind. Dies legt Parallelen in ihren Wirkmechanismen nahe. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass beide an der gleichen koaktivierenden Liganden-bindenden-Domäne (LBD) nukleärer Rezeptoren, die in Anwesenheit von Hormonen entsteht, binden (96). In vitro konnte von Jalaguier und Kollegen (75) an Mammakarzinomzellen beobachtet werden, dass die repressive Aktivität von LCoR in Anwesenheit von NRIP1 wesentlich verstärkt ist. Dies wurde in vivo am Mausmodell mit NRIP1 Knockout Mäusen bestätigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NRIP1 die LCoR abhängige Zellproliferation reguliert. So fand bei Mammakarzinomzellen, in denen NRIP1 herunter reguliert und LCoR über exprimiert wurde, eine gesteigerte Zellproliferation statt, wohingegen in Zellen, in denen NRIP1 nicht runter reguliert war, die Proliferation inhibiert wurde. Unsere Daten zeigten einen Zusammenhang zu gut differenzierten Karzinomen für die nukleäre NRIP1 und LCoR Expression. Des Weiteren zeigte sich für die LCoR Expression ein Zusammenhang zu einem niedrigen Tumorstadium und für die NRIP1 Expression zu einer geringen Tumorgröße. Außerdem war eine positive Korrelation zwischen der LCoR und der NRIP1 Expression zu beobachten, was ein Hinweis für deren Interaktion sein könnte. Signifikante Daten zu einem Überlebensvorteil bei kombinierter nukleärer LCoR und NRIP1 Expression konnten allerdings nicht gezeigt werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Größe des Patientenkollektivs sein.

#### 4.5 In vitro Viabilität unter 9-cis-Retinsäure in den Vulvakarzinomzelllinien A-431 und SW 954

Unter Stimulation mit der hohen Konzentration (10nM/ml) 9-cis-Retinsäure konnten wir eine Abnahme der Viabilität in beiden Zelllinien beobachten, die allerdings nur in den SW 954 Zellen signifikant war. Die 9-cis-Retinsäure gehört zu den All-trans-Retinsäuren, die aktive Vitamin A Metaboliten sind und in der Krebstherapie als Chemotherapeutika eingesetzt werden (97). Durch die Induktion von Apoptose sowie die Inhibierung von

Zellwachstum, -differenzierung und Migration üben sie eine anti-kanzerogene Wirkung aus (98). Für mögliche Vorstufen des Vulvakarzinoms wie Leukoplakien und vulvovaginale Dystrophien gab es bereits vor der Jahrtausendwende Therapieansätze mit topischer Anwendung von 13-cis-Retinsäure, was in ca. 50% der Fälle zum Erfolg führte (99) (100). Bei kutanen Plattenepithelkarzinomen können orale Präparate als Chemoprophylaxe eingesetzt werden, wohingegen es für die topische Applikation keine eindeutigen Studienergebnisse gibt (101). Mittels in vitro Versuchen mit oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien konnte die Inhibierung der Zellproliferation und die pro-apoptotische Wirkung der All-trans-Retinsäuren ebenfalls gezeigt werden (102). Ähnliche Effekte konnten in vitro an Ovarialkarzinomzellen beobachtet werden (103). Des Weiteren wurde in vitro an Zervixkarzinomzellen gezeigt, dass All-trans-Retinsäuren zu deren Strahlensensitivität in Hinblick auf eine mögliche Radiatio beitragen (104). Ebenfalls in vitro wurde an den Mammakarzinomzelllinien MCF7/C6 beobachtet, dass All-trans-Retinsäuren die Differenzierung dieser Zellen fördern und zudem ihre Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika erhöhen können (105). Somit sind All-trans-Retinsäuren bereits seit einigen Jahrzehnten Gegenstand der Krebsforschung und könnten nach unseren Ergebnissen auch ein Ansatz für die zukünftige Therapie des Vulvakarzinoms sein.

#### 4.6 In vitro Viabilität unter Stimulation mit 15dPGJ<sub>2</sub> in den Vulvakarzinomzelllinien A-431 und SW 954

Unter Stimulation mit niedriger Konzentration (1nM/ml) 15dPGJ<sub>2</sub> nahm die Viabilität in der Zelllinie A-431 signifikant ab, wohingegen sie in der Zelllinie SW 954 signifikant zu nahm. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> gehört zu der Gruppe der Prostaglandine (genauer zu den Cyclopentenonen Prostaglandinen), die durch die Cyclooxygenase 1 und 2 (COX-1, COX-2) synthetisiert werden und an einer großen Bandbreite von Mechanismen im Körper beteiligt sind. Darunter fallen ihre antivirale (106), antikanzerogene (107) und pro-apoptotische Wirkung (108) sowie ihre Beteiligung an der Hitzeschockantwort (109) und der Induktion von oxidativem Stress (110). Diese Effekte scheinen jedoch zelltyp- sowie dosisabhängig zu sein. So konnte vor allem unter Stimulation mit Cyclopentenonen Prostaglandinen eine Induktion der Zellproliferation in Mesangiumzellen (111), Brustkrebszellen (112) und in kolorektalen COX-2-Knockout Karzinomzellen (113) beobachtet werden. Olivia und Kollegen (112) konnten im in vitro Versuch mit NIH 3T3 Zellen zeigen, dass 15dPGJ<sub>2</sub> über die Aktivierung von H-Ras den Ras/Raf/MAPK-Signalweg und damit Zellproliferation, -differenzierung und -tod beeinflusst. Die antiproliferative

und pro-apoptotische Wirkung der Prostaglandine findet nach aktuellem Forschungsstand vor allem über den Peroxisom- Proliferator- aktivierten Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) statt (114) (108), was in vitro beispielsweise an Magenkarzinomzellen (115), Urothelkarzinomzellen (116), Pankreaskarzinomzellen (117) sowie Lungenkarzinomzellen (118) gezeigt werden konnte. Auch die hier erhobenen Daten lieferten diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse. So war unter niedriger Stimulation in der Zelllinie A-431 eine signifikante Abnahme der Viabilität und in der Zelllinie SW 954 eine signifikante Zunahme zu sehen, was durch die nukleäre Expression unterschiedlicher Gene und der damit gegensätzlichen Wirkung von 15dPGJ<sub>2</sub> erklärt werden könnte. Um dies näher zu betrachten wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit PPAR $\gamma$  und LCoR durchgeführt. In der Stimulation mit der höheren Konzentration war in beiden Zelllinien eine starke Abnahme der Viabilität zu sehen, womit die bereits vorbeschriebene stark dosisabhängige Wirkung beobachtet werden konnten. Dieser Effekt konnte unter anderem von Fujita und Kollegen (119) in vitro an Nierenzellkarzinomzellen beschrieben werden. In drei verschiedenen Zelllinien konnte die, durch Caspasen induzierte, Apoptose beobachtet werden. Für diese konnten in den verschiedenen Zelllinien unterschiedliche sowie dosisabhängige verantwortliche Signalwege (JNK/MAPK und Akt Signalweg) identifiziert werden. Literatur dazu, welche Mechanismen in den A-431 und SW 954 Zellen hinter diesem Effekt stehen könnten, konnte zum aktuellen Zeitpunkt nicht gefunden werden.

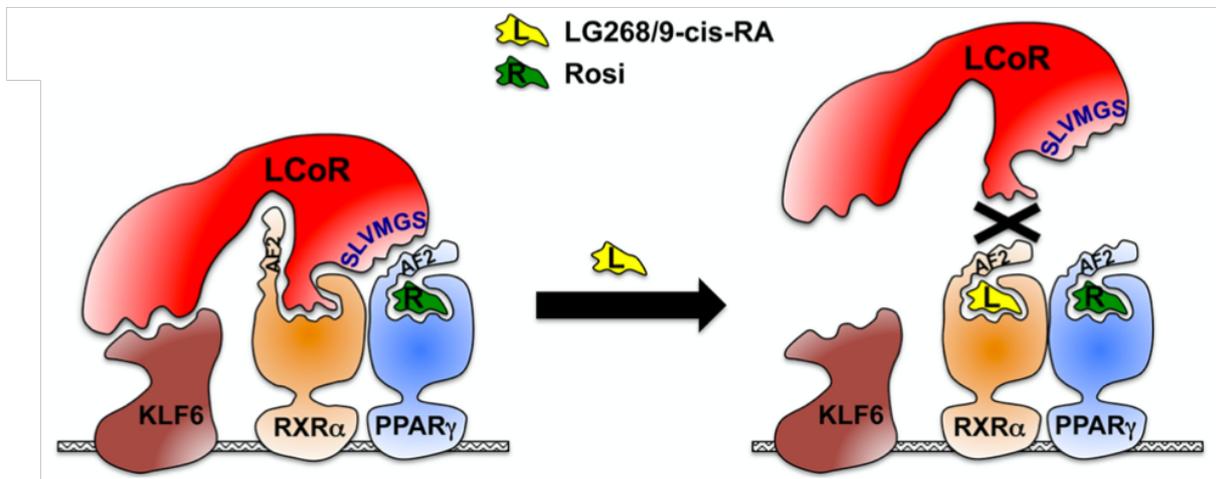
#### 4.7 In vitro Viabilität unter Stimulation mit 15dPGJ<sub>2</sub> und 9-cis-Retinsäure in den Vulvakarzinomzelllinien A-431 und SW 954

Unter der parallelen Stimulation mit jeweils niedrig dosierter 9-cis-Retinsäure und niedrig dosiertem 15dPGJ<sub>2</sub> konnte in der Zelllinie A-431 ein signifikanter Abfall und in der Zelllinie SW 954 ein signifikanter Anstieg der Viabilität beobachtet werden. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen mit alleiniger Stimulation von 15dPGJ<sub>2</sub>. Kim und Kollegen (120) untersuchten den Einfluss von All-trans-Retinsäuren auf die Produktion von Prostaglandinen und konnten im in vitro Versuch in Mikrogliazellen der Ratte zeigen, dass zwar die Produktion von PGE<sub>2</sub> gesteigert war, die Produktion von 15dPGJ<sub>2</sub> jedoch kaum beeinflusst wurde. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre eine höhere Affinität von 15dPGJ<sub>2</sub> gegenüber entscheidenden Rezeptoren in der Regulation der Viabilität, für den zum aktuellen Zeitpunkt keine Daten vorliegen. In Pankreaskarzinomzellen PANC-1 konnten von Dong und Kollegen (121) eine kombinierte inhibierende Wirkung auf die Proliferation beobachten, was zu den Beobachtungen unter Simulation in der Zelllinie A-431 passt.

#### 4.8 Verlust von nukleärer LCoR und PPAR $\gamma$ Expression in der Doppelimmunfluoreszenzfärbung in SW 954 Zellen unter Stimulation mit 15dPGJ<sub>2</sub>

Unter Stimulation mit niedrigdosiertem 15dPGJ<sub>2</sub> der Vulvakarzinomzelllinien A-431 und SW 954 konnte in der anschließenden Doppelimmunfluoreszenz mit PPAR $\gamma$  und LCoR beobachtet werden, dass die Zelllinie A-431 in der Kontrolle, im Gegensatz zu den SW 954 Zellen, keine nukleäre Expression von PPAR $\gamma$  und LCoR aufwies. Unter Stimulation war in den A-431 Zellen weiterhin keine nukleäre Expression zu sehen, wohingegen in den SW 954 Zellen eine Verschiebung der Expression von PPAR $\gamma$  und LCoR von nukleär nach zytoplasmatisch zu beobachten war. Demnach führte die Zunahme der zytoplasmatischen PPAR $\gamma$  und LCoR Expression in der Zelllinie SW 954 zu einer signifikanten Steigerung der Viabilität der Karzinomzellen. Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) bildet zusammen mit PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  und PPAR $\delta$  die Gruppe der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren, die zu den nukleären Rezeptoren gehören und erstmals 1990 identifiziert wurden (122). Sie bilden, mit ihrem obligatem Bindungspartner RXR (Retinoid-X-Rezeptor), einen Heterodimer. Als solcher fungieren sie als Transkriptionsfaktoren mittels der Rekrutierung von Kofaktoren, welche als Koaktivatoren oder Korepressoren wirken. Darüber sind sie an multiplen Prozessen wie Entzündungsreaktionen, dem Glucose- und Lipidmetabolismus sowie Zellproliferation, -differenzierung und -überleben beteiligt (122). Es konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl LCoR (z.B. in Mammakarzinomzellen (75)) als auch PPAR $\gamma$  (z.B. in oralen Plattenepithelkarzinomzellen (123), Magenkarzinomzellen (115) u.a.) eine inhibierende Wirkung auf die Zellproliferation ausüben können. Die Steigerung der Viabilität in den SW 954 Zellen könnte durch den Wegfall dieser inhibierenden Wirkung zu erklären sein. Zudem kann die je nach Zelltyp- und Dosis abhängige Wirkung von 15dPGJ<sub>2</sub> in beiden Zelllinien unterschiedliche Effekte verursachen, deren genaue Ursache zum aktuellen Zeitpunkt noch unzureichend erklärbar ist. Ein möglicher Ansatz könnte auf in vitro Beobachtungen von Shalom-Barak und Kollegen (80) zur Interaktion von LCoR, PPAR $\gamma$  und dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) am Muc1 Promotor in Plazentazellen basieren. Es wurde gezeigt, dass LCoR in Anwesenheit eines PPAR $\gamma$  Liganden und in Abwesenheit eines RXR-Liganden den PPAR $\gamma$ -RXR-Rezeptorkomplex bindet und darüber als Koaktivator am Muc-1 Promotor fungiert. Bei Anwesenheit eines RXR-Liganden, in diesem Fall 9-cis-Retinsäure, kommt die Bildung des Komplexes nicht zu Stande und die Aktivierung von Muc-1 wird supprimiert. Die nicht vorhandene Bindung und Aktivität von LCoR im Zellkern könnte zu einer fehlenden Expression im Zellkern und einer primären

Expression im Zytoplasma führen. Schematisch ist dies in Abbildung 15 dargestellt. Außerdem könnte die fehlende Bildung des Komplexes zu einer gesteigerten Viabilität und Proliferation der SW 954 Zellen führen.



**Abbildung 15:** Modell von LCoR als PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  Koaktivator. Schematische Darstellung modifiziert nach (80); L=9-cis-Retinsäure, R= Rosiglitazon (wird in dieser Beschreibung vernachlässigt); erstmalig von diesen Autoren gezeigt an der Plazenta der Maus.

## 5 Zusammenfassung

Mit jährlich ca. 44.000 Neuerkrankungen weltweit (1) gehört das Vulvakarzinom zu den selteneren Krebserkrankungen der Frau, dessen Zahlen in den letzten zwei Jahrzehnten jedoch deutlich angestiegen sind. In Deutschland hat mit 2,5 auf 4,5 pro 100.000 Einwohner zwischen den Jahren 2000 und 2016 nahezu eine Verdopplung der Inzidenz stattgefunden (2), wobei der Zuwachs der Fallzahlen vor allem in der Gruppe der jüngeren Frauen < 60 Jahren zu beobachten war (4). Maßgeblich prognosebestimmend sind dabei das Tumorstadium bei Erstdiagnose, einschließlich des Lymphknotenstatus (3). Durch die zunehmenden Fallzahlen des Vulvakarzinoms ist dieses in den letzten zwei Jahrzehnten für die Forschung interessanter geworden. Ziel dieser Arbeit war es mit den nukleären Rezeptormodulatoren LCoR und NRIP1 zwei mögliche prognostische Marker zu identifizieren, die in anderen Krebsgeweben bereits vielversprechende Ergebnisse geliefert haben.

Für diese Arbeit wurden immunhistologische Schnitte aus dem Vulvakarzinomgewebe von 157 Patientinnen verwendet. Zunächst wurde die Expression von LCoR und NRIP1 mittels immunohistochemischer Färbung im Tumorgewebe untersucht. Ergänzend dazu wurde in der Zellkultur unter Stimulation die Auswirkung auf die Viabilität der

Vulvakarzinomzellen analysiert. Zuletzt wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung der Zellen durchgeführt, um die viabilitätssteigernden Prozesse zu verstehen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe nukleäre LCoR Expression mit positiven prognostischen Faktoren wie gut differenzierten Karzinomen und einem geringen Tumorstadium sowie einem besseren Überleben (entsprechend dem Durchschnittsüberleben in Deutschland nach Daten des RKI (3)), im Vergleich zur niedrigen nukleären Expression, assoziiert war. Zudem fand sich eine hohe nukleäre LCoR Expression vor allem bei multifokalen Karzinomen und Patientinnen mit einem jüngeren Erkrankungsalter. Eine hohe nukleäre NRIP1 Expression war mit positiven Prognosefaktoren wie gut differenzierten Karzinomen, einem kleinen Tumordurchmesser und einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert. Zudem konnten eine positive Korrelation zwischen der Expression von NRIP1 und LCoR gezeigt werden. In den *in vitro* Versuchen konnte beobachtet werden, dass sich die Vulvakarzinomzellen nach Kontakt mit Stimulanzen für mögliche therapeutische Ansätze teilweise unterschiedlich verhielten. Unter Kontakt mit 9-cis-Retinsäure war in beiden Zelllinien ein Rückgang der Viabilität zu beobachten, wohingegen die Viabilität der SW 954 Zellen nach Kontakt mit 15dPGJ<sub>2</sub> stieg und in der Zelllinie A-431 abfiel. Hierfür war über die Doppelimmunfluoreszenz mit LCoR und PPAR $\gamma$  ein möglicher Erklärungsansatz zu finden. In der Kontrolle war in den SW 954 Zellen eine nukleäre Expression von LCoR und PPAR $\gamma$  zu sehen, wohingegen die Zelllinie A-431 lediglich eine zytoplasmatische Expression aufwies. Nach Stimulation mit 15dPGJ<sub>2</sub> fehlte in der Zelllinie SW 954 die nukleäre Expression, wobei in den A-431 Zellen keine Veränderung zu beobachten war. Somit könnte die nukleäre Expression von LCoR und PPAR $\gamma$  eine hemmende Wirkung auf die Viabilität der Karzinomzellen haben, die durch deren Verschiebung in das Zytoplasma wiederum gesteigert ist.

Die Beobachtungen zur LCoR und NRIP1 Expression am Vulvakarzinomgewebe zeigen sie als potentielle prognostische Marker, deren genauer Einfluss auf die Kanzerogenese noch näher untersucht werden muss. Des Weiteren liefern die *in vitro* Beobachtungen Hinweise auf mögliche therapeutische Ansätze. Allgemein ergab diese Studie wichtige Vorkenntnisse und erste mechanistische Ansätze, um die Prognosebestimmung des Vulvakarzinoms sowie dessen Therapie durch weitere Studien zu verbessern.

## Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgen Rezeptor
CIN	zervikalen intraepithelialen Neoplasie
15dPGJ <sub>2</sub>	15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J <sub>2</sub>
dVIN	differenzierte vulväre intraepitheliale Neoplasie
HPV	Humanes Papilloma Virus
HSIL	high-grade squamous intraepithelial lesion
KLF6	Krüppel-like factor 6
LBD	Liganden-bindenden-Domäne
LS	Lichen sclerosus
LSC	Lichen simplex chronicus
LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion
LCoR	Ligand dependent corepressor
NRIP1	Nuclear receptor-interacting protein 1
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator aktivierten Rezeptor $\gamma$
RIP140	Receptor-interacting protein of 140 kDa
RKI	Robert Koch Institut
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
uVIN	undifferenzierte vulväre intraepitheliale Neoplasie
VIN	vulväre intraepitheliale Neoplasie
WST	water soluble tetrazolium

## Tabellen

*Tabelle 3: Geräte*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Axiocam	Zeiss
Brutschrank	Heraeus
Co <sub>2</sub> Flasche	Linde
Dampfkochtopf vitavit	Fissler
Elektrische Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf
ELISA-Reader DYNEX MRX II	Dynatech
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss
Gefrierschrank -80°C Forma 900 Series	Thermo Scientific
Gefrierschränke -20°C	Siemens, LIEBHERR
Kühlschränke 4°C Zellkultur	Siemens, LIEBHERR
Lichtmikroskop Immunhistochemie Type 307-148.001 514 686	Leitz
Lichtmikroskop Zellkultur	Leitz
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
pH Meter	Schott
Pipette (10, 100, 500, 1000)	Eppendorf
Steril Bank Uniflow UV 1200 mini	Kendro Laboratory Products
Stickstofftank	Taylor Wharton GmbH
Vortex Genie 2	Bender & Hobein
Waage Kern 572	Kern & Sohn GmbH
Wärmeschrank	Binder GmbH
Zentrifuge mini Spin	Eppendorf
Zentrifuge Z323K	HERMLE

**Tabelle 4: Chemikalien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
0,1M Zitronensäure	Merck
0,1M Na-Citrat	Merck
15dPGJ <sub>2</sub> (15-Deoxy- $\Delta$ 12,14prostaglandin J <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Aceton	AppliChem
AEC+High Sensitivity Substrate Chromogen Ready to Use	Dako
Aqua ad iniectabilia	Braun
Aqua dest.	Apothekenbedarf der LMU
Aquatex	Merck
9- <i>cis</i> -Retinsäure	Sigma-Aldrich
Dako Antibody Diluent	Dako
Digitonin 1:100 in PBS gelöst	Sigma-Aldrich
DMEM	Biochrom AG
Ethanol 50%, 70%, 96%, 100%	Apothekenbedarf der LMU
FCS	Biochrom AG
Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%	Otto Fischar GmbH & Co. KG
Hämalaun	Apothekenbedarf der LMU
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung: 6ml 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung + 194ml Methanol	Apothekenbedarf der LMU
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
KOH	Merck
Liquid DAB+Substrate Chromogen System	Dako
Methanol	Sigma-Aldrich
NaCl	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NP40 0,2%	Sigma-Aldrich
Roticlear®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Saures Hämalaun nach Mayer	Apothekenbedarf der LMU
Tryptanblaulösung 0,4%	Sigma-Aldrich

Trypsin	Biochem
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories
Vectastain Elite ABC mouse IgG Kit	Vector Laboratories
Vectastain Elite ABC rabbit IgG Kit	Vector Laboratories
Xylol	Roth
ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit) 3x100ml Reagent 1: Blocking Solution Reagent 2: Post Block Reagent 3: HRP-Polymer	Zytomed Systems GmbH

*Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific (Menzel Gläser)
Falcons 50ml	Sarstedt
Färbegestell, Färbekasten, Färbetrog	Roth
Feuchtkammer	Aus Eigenherstellung
Lab-Tec Chamber Slide	Nunc
Pipettenspitze Plastik 1ml Safe Seal Tips Premium	Biozym
Pipettenspitze Plastik 10µl, 100µl Premium Tips	Biozym
Pipettenspitze Plastik 5ml epTips Dualfilter	Eppendorf
QuadriPERM (Zellkulturgefäß)	Greiner Bio-One GmbH
Safe Lock Tubes Eppendorf Tubes, 2ml	Eppendorf
Serologische Pipettenspitze 5/10/25ml	BD Biosciences
Super Frost Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflasche 75cm <sup>2</sup>	BD Biosciences
Zellkulturflasche 175cm <sup>2</sup>	BD Biosciences
Zellschaber	Sarstedt

*Tabelle 6: Antikörper und Zellen*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
A-431	ECACC
Anti-Phospho PPAR-gamma (Ser112), Mouse IgG1, monoklonal	Millipore
Cy2, Goat-Anti-Mouse IgG	Jackson Immuno Research
Cy3, Goat-Anti-Rabbit IgG	Jackson Immuno Research
SW 954	ATCC
LCoR, Rabbit IgG, polyklonal, 0,05mg/ml	Novus Biologicals
LCoR, Rabbit IgG, polyklonal, 0,05mg/ml	Novus Biologicals
NRIP1 (RIP140), Rabbit IgG, po- lyklonal, 0,2mg/ml	Sigma Aldrich

## Literaturverzeichnis

1. **WHO.** International Agency for Research on Cancer. *Fact Sheet: Vulva*. [Online] 2018. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/21-Vulva-fact-sheet.pdf>.
2. **Robert Koch Institut.** Zentrum für Krebsregisterdaten. *Krebs der Vulva (Vulvakarzinom)*. [Online] 17. 12 2019. <https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Vulvakrebs/vulvakrebs.html>.
3. —. Krebs in Deutschland. *Vulva-C51*. [Online] 2015/16. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2019/kid\\_2019\\_c51\\_vulva.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c51_vulva.pdf?__blob=publicationFile).
4. *Trends in incidence and survival of Dutch women with vulvar squamous cell carcinoma.* **Schuurman, M.S., van den Einden, L.C.G., Massuger, L.F.A.G., et al.** 2013, *European Journal of Cancer*, Bd. 49, S. 3872–80.
5. *Vulvar Squamous Cell Carcinoma is a Multifactorial Disease Following Two Separate and Independent Pathways.* **van der Avoort, I.A.M., Shirango, H., Hoevenaars, B.M., et al.** 1, Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, Januar 2006, *International Journal of Gynecological Pathology*, Bd. 25, S. 22–29.
6. **Gross, G., Becker, N., Brockmeyer, N.H., et al.** S3-Leitlinie zur Impfprävention HPV-assoziiierter Neoplasien. *HPV Impfleitlinie*. [Online] 01. Dezember 2013. [https://www.hpv-impfleitlinie.de/doc/2013\\_langfassung\\_082-0021\\_Impfpraevention\\_HPV\\_assoziiierter\\_Neoplasien\\_2013-12.pdf](https://www.hpv-impfleitlinie.de/doc/2013_langfassung_082-0021_Impfpraevention_HPV_assoziiierter_Neoplasien_2013-12.pdf).
7. *A review of human carcinogens—Part B: biological agents.* **Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., et al.** 4, 2009, *The Lancet Oncology*, Bd. 10, S. 321,22.
8. *Carcinogenicity of human papillomaviruses.* **Cogliano, V., Baan R., Straif, K., et al.** 4, April 2005, *The Lancet Oncology*, Bd. 6, S. 204.
9. *Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva.* **de Sanjosé, S., Alemany, L., Ordi, J., et al.** 2013, *European Journal of Cancer*, Bd. 49, S. 3450–61.
10. *Prevalence and type distribution of human papillomavirus in squamous cell carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva.* **Faber, M.T., Sand, F.L., Albieri, V., et al.** 2017, *International Journal of Cancer*, Bd. 141, S. 1161–69.
11. *Vulvar Lichen Sclerosus and Squamous Cell Carcinoma: A Cohort, Case Control, and Investigational Study With Historical Perspective; Implications for Chronic Inflammation and Sclerosis in the Development of Neoplasia.* **Carlson, J.A., Ambros, R., Malfetano, J., et al.** 9, September 1998, *Human Pathology*, Bd. 29, S. 932–48.
12. *Vulvar Acanthosis With Altered Differentiation A Precursor to Verrucous Carcinoma?* **Nascimento, A.F., Granter, S. R., Cviko, A., et al.** 5, Mai 2004, *The American Journal of Surgical Pathology*, Bd. 28, S. 638–43.
13. *Vulvar Intraepithelial Neoplasia of the Simplex (Differentiated) Type A Clinicopathologic Study Including Analysis of HPV and p53 Expression.* **Yang, B., Hart, W.R.** 3, Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2000, *The American Journal of Surgical Pathology*, Bd. 24, S. 429–41.
14. *p53 Expression in Vulvar Carcinoma, Vulvar Intraepithelial Neoplasia, Squamous Cell Hyperplasia and Lichen Sclerosus.* **Hantschmann, P., Sterzer, S., Jeschke, U., et al.** 3A, Mai 2005, *Anticancer Research*, Bd. 25, S. 1739-46.
15. *Cancers of the Anogenital Region in Renal Transplant Recipients. Analysis of 65 Cases.* **Penn, I.** 3, August 1986, *Cancer*, Bd. 58, S. 611-6.
16. *HIV infection and the risk of cancers with and without a known infectious cause.* **Silverberg, M.J., Chao, C., Leyden, W.A., et al.** 17, s.l. : Lippincott Williams & Wilkins, 2009, *AIDS*, Bd. 23, S. 2337-45.
17. *Cofactors With Human Papillomavirus in a Population-Based Study of Vulvar Cancer.* **Madeleine, M.M., Daling, J.R., Carter, J.J. et al.** 20, Oktober 1997, *Journal*

- of the National Cancer Institute, Bd. 89, S. 1516-23.
18. *Clinical and molecular classification of vulvar squamous pre-cancers*. **Cohen, P.A., Anderson, L., Eva, L., et al.** 2019, International Journal of Gynecological Cancer, Bd. 0, S. 1-8.
  19. **Bornstein, J., Bogliatto, F., Haefner, H.K., et al.** Current ISSVD Terminology and Classification of Vulvar Diseases. *ISSVD: Terminology*. [Online] 23. Januar 2016. <https://3b64we1rtwev2ibv6q12s4dd-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2016/03/TERMINOLOGY-VSIL-BORNSTEIN.pdf>.
  20. *Vulvar squamous cell carcinoma development after diagnosis of VIN increases with age*. **van de Nieuwenhof, H.P., Massuger, L.F.A.G., van der Avoort, I.A.M., et al.** 2009, European Journal of Cancer, Bd. 45, S. 851–856.
  21. *Vulvar Intraepithelial Neoplasia Aspects of the Natural History and Outcome in 405 Women*. **Jones, R.W., Rowan, D.M., Stewart, A.W.** 6, Dezember 2005, Obstetrics & Gynecology, Bd. 106, S. 1319-26.
  22. *Squamous precursor lesions of the vulva: current classification and diagnostic challenges*. **Hoang, L.N., Park, K.J., Soslow, R.A., et al.** 4, 2016, Pathology, Bd. 48, S. 291–302.
  23. *Cancer of the vulva*. **Rogers, L.J., Cuello, M.A.** 2, 2018, International Journal of Gynecology & Obstetrics, Bd. 143, S. 4–13.
  24. *Heterogeneous Etiology of Squamous Carcinoma of the Vulva*. **Trimble, C.L., Hildesheim, A., Brinton, L.A., et al.** 1996, Obstetrics & Gynecology, Bd. 87, S. 59–64.
  25. **HAMPL, M., Schnürch, H.G., et al.** Leitlinien. *AWMF online. Der Portal der wissenschaftlichen Medizin*. [Online] 01. 11 2015. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/015-059l\\_S2k\\_Vulvakarzinom\\_und\\_Vorstufen\\_Diagnostik\\_Therapie\\_2016-10.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/015-059l_S2k_Vulvakarzinom_und_Vorstufen_Diagnostik_Therapie_2016-10.pdf).
  26. *Vulvar basal cell carcinoma: retrospective study and review of literature*. **de Giorgi, V., Salvini, C., Massi, D., et al.** 2005, Gynecologic Oncology, Bd. 97, S. 192-194.
  27. *Verrucous Carcinoma of the Vulva: A 20 Year Retrospective Study and Literature Review*. **Liu, G., Li, Q., Shang, X., et al.** 1, Januar 2016, Journal of Lower Genital Tract Disease, Bd. 20, S. 114-118.
  28. *Metastatic basal cell carcinoma: case series and review of the literature*. **Tang, S., Thompson, S., Smee, R.** 2017, Australasian Journal of Dermatology, Bd. 58, S. e40–e43.
  29. *Bartholin's gland carcinoma: Epidemiology and therapeutic management*. **Ouldamer, L., Chraïbi, Z., Arbion, F., et al.** 2013, Surgical Oncology, Bd. 22, S. 117-122.
  30. *Bartholin gland cancer*. **Di Donato, V., Casorelli, A., Bardhi, E., et al.** 2017, Critical Reviews in Oncology/Hematology, Bd. 117, S. 1-11.
  31. *Paget's disease of the vulva: Prevalence of associated vulvar adenocarcinoma, invasive Paget's disease, and recurrence after surgical excision*. **Fanning, J., Lambert, L., Hale, T.M., et al.** 1, Januar 1999, American Journal of Obstetrics & Gynecology, Bd. 180, S. 24-27.
  32. *Diagnosis and management of vulvar cancer: A review*. **Tan, A., Bieber, A.K., Stein, J.A., et al.** 6, Dezember 2019, Journal of the American Academy of Dermatology, Bd. 81, S. 1387-96.
  33. **Dannecker, C., et al.** *Tumorerkrankungen der Vulva und Vagina - Leitlinienbasiertes Handbuch*. [Hrsg.] H.G., Hampl, M., Wölber Schnürch. Berlin : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2018. S. 61-63.
  34. *Incidence of vulvar high-grade precancerous lesions and cancer in Denmark before and after introduction of HPV vaccination*. **Rasmussen, C.L., Thomsen, L.T., Aalborg, G.L., et al.** 2020, Gynecologic Oncology, Bd. 157, S. 664–70.
  35. *Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and*

- 18) *L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials.* **Joura, E.A., Leodolter, S., Hernandez-Avila, M., et al.** Mai 2007, *The Lancet*, Bd. 369, S. 1693–702.
36. *Long-term incidence trends of HPV-related cancers, and cases preventable by HPV vaccination: a registry-based study in Norway.* **Hansen, B.T., Campbell, S., Nygård, M.** 2018, *BMJ Open*, Bd. 8, S. 1-9.
37. **Robert Koch Institut.** Epidemiologisches Bulletin Nr. 34. *Robert Koch Institut-Empfehlungen der Ständigen Impfkommission.* [Online] 22. August 2019. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/34\\_19.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/34_19.pdf?__blob=publicationFile).
38. *Evidence-based (S3) Guideline on (anogenital) Lichen sclerosus.* **Kirtschig, G., Becker, K., Günthert, A., et al.** 2015, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Bd. 29, S. e1–e43.
39. *Long-term Management of Adult Vulvar Lichen Sclerosus A Prospective Cohort Study of 507 Women.* **Lee, A., Bradford, J., Fischer, G.** 2015, *JAMA Dermatology*, S. E1-E7.
40. *Carcinoma in Situ of the Vulva: 24 Years' Experience in Southwest Florida.* **Fiorica, J.V., Cavanagh, D., Marsden, D.E., et al.** 5, 1988, *Southern Medical Journal*, Bd. 81, S. 589-593.
41. *Vulvar intraepithelial neoplasia with superficially invasive carcinoma of the vulva.* **Herod, J.J.O., Shafi, M.I., Rollason, T.P., et al.** 1996, *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, Bd. 103, S. 453-456.
42. **Schnürch, H.-G., Alt-Radtke, C.** *Tumorerkrankungen der Vulva und Vagina - Leitlinienbasiertes Handbuch.* [Hrsg.] H.G., Hampl, M., Wölber Schnürch. Berlin : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2018. S. 79-87.
43. *Normal findings in vulvar examination and vulvoscopy.* **van Beurden, M., van der Vange, N., de Craen, A.J.M., et al.** März 1997, *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, Bd. 104, S. 320-324.
44. *Microinvasive Carcinoma of the Vulva.* **Wilkinson, E.J., Rico, M.J., Pierson, K.K.** 1, 1982, *International Journal of Gynecological Pathology*, Bd. 1, S. 29-39.
45. *Risk of Occult Inguinofemoral Lymph Node Metastasis From Squamous Carcinoma of the Vulva.* **Gonzalez Bosquet, J., Kinney, W.K., Russell, A.H., et al.** 2, Oktober 2003, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, Bd. 57, S. 419-24.
46. *The accuracy of magnetic resonance imaging in staging of vulvar cancer: A retrospective multi-centre study.* **Kataoka, M.Y., Sala, E., Baldwin, P., et al.** 2010, *Gynecologic Oncology*, Bd. 117, S. 82-87.
47. *The role of preoperative ultrasound evaluation of inguinal lymph nodes in patients with vulvar malignancy.* **de Gregorio, N., Ebner, F., Schwentner, L., et al.** 2013, *Gynecologic Oncology*, Bd. 131, S. 113–117.
48. *Identification of Inguinal Lymph Node Metastases From Vulval Carcinoma by Magnetic Resonance Imaging: An Initial Report.* **Hawnaur, J.M., Reynolds, K., Wilson, G., et al.** 11, 2002, Enthält auch Ergebnisse für Clin Radiology Nur nach Clin Radiol suchen Suchergebnisse Weberggebnisse Clinical Radiology, Bd. 57, S. 995-1000.
49. *Routine computerized tomography scanning, groin ultrasound with or without fine needle aspiration cytology in the surgical management of primary squamous cell carcinoma of the vulva.* **Land, R., Herod, J., Moskovic, E., et al.** 1, 2006, *International Journal of Gynecological Cancer*, Bd. 16, S. 312-17.
50. *Prospective Evaluation of Positron Emission Tomography for the Detection of Groin Node Metastases from Vulvar Cancer.* **Cohn, D.E., Dehdashti, F., Gibb, R.K.** 2002, *Gynecologic Oncology*, Bd. 85, S. 179–184.
51. **Wittekind C, Meyer H.** *UICC TNM Klassifikation maligner Tumoren.* [Hrsg.] C. Wittekind. Weinheim : Wiley-VCH, 2017.

52. *Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium.* **Pecorelli, S.** 2009, International Journal of Gynecology & Obstetrics, Bd. 105, S. 103-104.
53. *Prognostic Value of Pathological Resection Margin Distance in Squamous Cell Cancer of the Vulva.* **Woelber, L., Choschzick, M., Eulenburg, C., et al.** 2011, Annals of Surgical Oncology, Bd. 18, S. 3811–18.
54. **Hampl, M., et al.** *Tumorerkrankungen der Vulva und Vagina - Leitlinienbasiertes Handbuch.* [Hrsg.] H.G., Hampl, M., Wölber Schnürch. Berlin : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2018. S. 87-96.
55. *Surgical Management of Vulvar Cancer.* **Dellinger, T.H., Hakim, A.A., Lee, S.J., et al.** 1, 2017, Journal of the National Comprehensive Cancer Network, Bd. 15, S. 121–128.
56. **Hallscheidt, P., Haferkamp, A.** *Urogenitale Bildgebung.* [Hrsg.] A. Haferkamp. Berlin : Springer Medizin, 2010.
57. *Sentinel Node Dissection Is Safe in the Treatment of Early-Stage Vulvar Cancer.* **Van der Zee, A.G.J., Oonk, M.H., De Hullu, J.A., et al.** 6, 2008, Journal of Clinical Oncology, Bd. 27, S. 884-89.
58. *Complete Groin Lymphadenectomy with Preservation of the Fascia Lata in the Treatment of Vulvar Carcinoma.* **Bell, J.G., Lea, J.S., Reid, G.C.** 2000, Gynecologic Oncology, Bd. 77, S. 314–318.
59. *Adjuvant Radiation for Vulvar Carcinoma- Improved Local Control.* **Faul, C.M., Mirmow, D., Huang, Q., et al.** 1997, International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, Bd. 38, S. 381-389.
60. *Sentinel lymph nodes in vulvar cancer: Management dilemmas in patients with positive nodes and larger tumors.* **Nica, A., Covens, A., Vicus, D., et al.** 2019, Gynecologic Oncology, Bd. 152, S. 94–100.
61. *Clinico-pathological and biological prognostic variables in squamous cell carcinoma of the vulva.* **Gadducci, A., Tana, R., Barsotti, C., et al.** 2012, Critical Reviews in Oncology/Hematology, Bd. 83, S. 71-83.
62. **Mehlhorn, G.** Nachsorge. [Buchverf.] H.G., Hampl, M., Wölber, L. Schnürch. *Tumorerkrankungen der Vulva und Vagina - Leitlinienbasiertes Handbuch.* Berlin : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2018, S. 130-133.
63. *Patterns of Recurrence in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Vulva A Multicenter CTF Study.* **Maggino, T., Landoni, F., Sartori, E., et al.** Juli 2000, Cancer, Bd. 89, S. 116-22.
64. *Cancer Statistics, 2016.* **Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A.** 2016, A Cancer Journal for Clinicians, Bd. 66, S. 7–30.
65. *PD-L1 expression and survival in p16-negative and -positive squamous cell carcinomas of the vulva.* **Czogalla, B., Pham, D., Trillsch, F., et al.** 3, 2020, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Bd. 146, S. 569-577.
66. *Evidence for a Role of the PD-1:PD-L1 Pathway in Immune Resistance of HPV-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.* **Lyford-Pike, S., Peng, S., Young, G.D., et al.** 6, 2013, Cancer Research, Bd. 73, S. 1733-41.
67. *Clinical impact of PD-L1 and PD-1 expression in squamous cell cancer of the vulva.* **Thangarajah, F., Morgenstern, B., Pahmeyer, C., et al.** 6, 2019, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Bd. 145, S. 1651-60.
68. *Role of Carbonic Anhydrase IX in Human Tumor Cell Growth, Survival, and Invasion.* **Robertson, N., Potter, C., Harris, A.L.** 2004, Cancer Research, Bd. 64, S. 6160 – 65.
69. *Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) in vulvar cancer is associated with tumor progression and development of locoregional lymph node metastases.* **Choschzick, M., Woelber, L., Hess, S., et al.** 2010, Virchows Archiv, Bd. 456, S. 483–

490.

70. *Assessment of Promising Protein Markers for Vulva Cancer*. **Fons, G., Burger, M.P.M., ten Kate, F.J.W., et al.** 4, 2009, International Journal of Gynecological Cancer, Bd. 19, S. 756-60.

71. *Mechanisms Leading to COX-2 Expression and COX-2 Induced Tumorigenesis: Topical Therapeutic Strategies Targeting COX-2 Expression and Activity*. **Telliez, A., Furman, C., Pommery, N., et al.** 2006, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, Bd. 6, S. 187-208.

72. *Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cellcycle*. **Musgrove, E.A., Lee, C.S.L., Buckley, M.F., et al.** 17, 1994, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Bd. 91, S. 8022-26.

73. *Role of cyclin D1 amplification and expression in vulvar carcinomas*. **Choschzick, M., Hess, S., Tennstedt, P., et al.** 2012, Human Pathology, Bd. 43, S. 1386–93.

74. **Remmele, W., Stegner, H.E.** Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*. Mai 1987, Bd. 8, 3, S. 138-40.

75. *Complex regulation of LCoR signaling in breast cancer cells*. **Jalaguier, S., Teyssier, C., Nait Achour, T., et al.** 33, 2017, Oncogene, Bd. 36, S. 4790-01.

76. *Transcriptional Regulation of the Human NR1P1/RIP140 Gene by Estrogen Is Modulated by Dioxin Signalling*. **Augereau, P., Badia, E., Fuentes, M., et al.** 4, 2006, Molecular Pharmacology, Bd. 69, S. 1338–46.

77. **Aldrich, Sigma**. Sigma Aldrich, Merck. *Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability*. [Online] <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-reagent-wst-1.html>.

78. **Korbecki, J., Bobinski, R., Dutka, M.** Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflammatory Research*. 2019, S. 443-458.

79. *Ligand-Dependent Nuclear Receptor Corepressor LCoR Functions by Histone Deacetylase-Dependent and -Independent Mechanisms*. **Fernandes, I., Bastien, Y, Wai, T., et al.** 2003, Molecular Cell, Bd. 11, S. 139–150.

80. *Ligand-Dependent Corepressor (LCoR) Is a Rexinoid-Inhibited Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ -Retinoid X Receptor  $\alpha$  Coactivator*. **Shalom-Barak, T., Liersemann, J., Memari, B., et al.** 9, 2018, Bd. 38, S. 1-17.

81. *Ligand-dependent Corepressor (LCoR) Recruitment by Krüppel-like Factor 6 (KLF6) Regulates Expression of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor CDKN1A Gene*. **Calderon, M.R., Verway, M., An, B-S., et al.** 12, 2012, Journal of Biological Chemistry, Bd. 287, S. 8662–74.

82. *Ligand-dependent Corepressor Acts as a Novel Androgen Receptor Corepressor; Inhibits Prostate Cancer Growth, and Is Functionally Inactivated by the Src Protein Kinase*. **Asim, M., Hafeez, B.B., Siddiqui, I.A., et al.** 43, 2011, Journal of Biological Chemistry, Bd. 286, S. 37108–117.

83. *Regulation of LCoR and RIP140 expression in cervical intraepithelial neoplasia and correlation with CIN progression and dedifferentiation*. **Vogelsang, T.L.R., Schmoeckel, E., Kuhn, C., et al.** 7, 2020, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Bd. 146, S. 1847-55.

84. *Investigation of RIP140 and LCoR as independent markers for poor prognosis in cervical cancer*. **Vattai, A., Cavailles, V., Sixou, S., et al.** 62, 2017, Oncotarget, Bd. 8, S. 105356-371.

85. *Importance of RIP140 and LCoR Sub-Cellular Localization for Their Association With Breast Cancer Aggressiveness and Patient Survival*. **Sixou, S., Müller, K., Jalaguier, S., et al.** 5, 2018, Translational Oncology, Bd. 11, S. 1090–96.

86. *Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition.* **Castet, A., Boulahtouf, A., Versini, G., et al.** 6, 2004, *Nucleic Acids Research*, Bd. 32, S. 1957-66.
87. *Characterization of Four Autonomous Repression Domains in the Corepressor Receptor Interacting Protein 140.* **Christian, M., Tullet, J.M.A., Parker, M.G.** 15, 2004, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 279, S. 15645–51.
88. *Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor.* **Cavaillès, V., Dauvois, S., L'Horset, F., et al.** 15, 1995, *The EMBO Journal*, Bd. 14, S. 3741-51.
89. *The nuclear receptor transcriptional coregulator RIP140.* **Augereau, P., Badia, E., Carascossa, S., et al.** 2006, *Nuclear Receptor Signaling*, Bd. 4, S. e024.
90. *Transcriptional Cofactors Exhibit Differential Preference toward Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  $\alpha$  and  $\delta$  in Uterine Cells.* **Lim, H.J., Moon, I., Han, K.** 6, 2004, *Endocrinology*, Bd. 145, S. 2886–95.
91. *RIP140 increases APC expression and controls intestinal homeostasis and tumorigenesis.* **Lapierre, M., Bonnet, S., Bascoul-Mollevi, C., et al.** 5, 2014, *The Journal of Clinical Investigation*, Bd. 124, S. 1899-1913.
92. *The Transcriptional Coregulator RIP140 Represses E2F1 Activity and Discriminates Breast Cancer Subtypes.* **Docquier, A., Harmand, P.-O., Fritsch, S., et al.** 11, 2010, *Clinical Cancer Research*, Bd. 16, S. 2959-70.
93. *Downregulation of RIP140 in hepatocellular carcinoma promoted the growth and migration of the cancer cells.* **Zhang, D., Wang, Y., Dai, Y., et al.** 2015, *Tumor Biology*, Bd. 36, S. 2077–85.
94. *Expression and role of RIP140/NRIP1 in chronic lymphocytic leukemia.* **Lapierre, M., Castet-Nicolas, A., Gitenay, D., et al.** 2015, *Journal of Hematology & Oncology*, Bd. 8, S. 20.
95. *The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia.* **van't Veer, M.B., Brooijmans, A.M., Langerak, A.W., et al.** 1, 2006, *Haematologica*, Bd. 91, S. 56-63.
96. *Corepressor Recruitment by Agonist-Bound Nuclear Receptors.* **White, J.H., Fernandes, I., Mader, S., et al.** 2004, *Vitamins and Hormones*, Bd. 68, S. 123-43.
97. *All Trans Retinoic Acid and Cancer.* **Siddikuzzaman, Guruvayoorappan, C., Berlin Grace, V.M.** 2, 2011, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, Bd. 22, S. 241–249.
98. *Retinoids as Modulators of Tumor Cells Invasion and Metastasis.* **Lotan, R.** 3, 1991, *Seminars Cancer Biology*, Bd. 2, S. 197-208.
99. *Leukoplakia of the vulva locally treated by 13-cis-retinoic acid.* **Markowska, J., Janik, P., Wiese, E., et al.** 1, 1987, *Neoplasma*, Bd. 34, S. 33-36.
100. *Dystrophy of the vulva locally treated with 13-cis retinoic acid.* **Markowska, J., Wiese, E.** 2, 1992, *Neoplasma*, Bd. 39, S. 133-35.
101. *Cutaneous squamous cell carcinoma-Management of advanced and high-stage tumors.* **Que, S.K.T., Zwald, F.O., Schmults, C.D.** 2, 2018, *Journal of the American Academy of Dermatology*, Bd. 78, S. 249-61.
102. *All-trans retinoic acid induces anti-tumor effects via STAT3 signaling inhibition in oral squamous cell carcinoma and oral dysplasia.* **Chen, X.-J., He, M.-J., Zhou, G.** 2019, *Journal of Oral Pathology & Medicine*, Bd. 48, S. 832–839.
103. *Anti-tumour effects of all-trans retinoid acid on serous ovarian cancer.* **Lokman, N.A., Ho, R., Gunasegaran, K., et al.** 1, 2019, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, Bd. 38, S. 10.
104. *Sensitization of cervical cancer cell lines to low-dose radiation by retinoic acid does not require functional p53.* **Tillmanns, T.D., Kamelle, S.A., Guruswamy, S., et al.** 2005, *Gynecologic Oncology*, Bd. 97, S. 142–150.

105. *All-trans retinoic acids induce differentiation and sensitize a radioresistant breast cancer cells to chemotherapy.* **Yan, Y., Li, Z., Xu, X., et al.** 2016, BMC Complementary and Alternative Medicine, Bd. 16, S. 113.
106. *Review Paper - Prostaglandins in the treatment of cancer.* **Sasaki, H., Fukushima, M.** 1994, Anti-Cancer Drugs, Bd. 5, S. 131-138.
107. *Antitumor Activity of 7-Prostaglandin A1 and 12-Prostaglandin J2 in Vitro and in Vivo.* **Kato, T., Fukushima, M., Kurozumi, S., et al.** 1986, Cancer Research, Bd. 46, S. 3538-42.
108. *15-PGJ2, but not thiazolidinediones, inhibits cell growth, induces apoptosis, and causes downregulation of Stat3 in human oral SCCa cells.* **Nikitakis, N.G., Siavash, H., Hebert, C., et al.** 2002, British Journal of Cancer, Bd. 87, S. 1396 – 1403.
109. *Inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B by prostaglandin A1: An effect associated with heat shock transcription factor activation.* **Rossi, A., Elia, G., Santoro, M.G.** 1997, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Bd. 94, S. 746–750.
110. *Cyclopentenone Prostaglandins as Potential Inducers of Intracellular Oxidative Stress.* **Kondo, M., Oya-Ito, T., Kumagai, T., et al.** 15, 2001, Journal of Biological Chemistry, Bd. 276, S. 12076–83.
111. *15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 regulates mesangial cell proliferation and death.* **Rovin, B.H., Wilmer, W.A., Lu, L., et al.** 2002, Kidney International, Bd. 61, S. 1293–1302.
112. *The cyclopentenone 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras.* **Olivia, J.L., Pérez-Sala, D., Castrillo, A., et al.** 8, 2003, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Bd. 100, S. 4772–77.
113. *12,14 Prostaglandin J2 and 15-Deoxy- $\Delta$  -prostaglandin J2 Induce Proliferation of Cyclooxygenase-depleted Colorectal Cancer Cells.* **Chinery, R., Coffey, R.J., Graves-Deal, R., et al.** 1999, Cancer Research, Bd. 59, S. 2739 –46.
114. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma and Growth Inhibition by Its Ligands in Uterine Endometrial Carcinoma.* **Ota, K., Ito, K., Suzuki, T., et al.** 14, 2006, Clinical Cancer Research, Bd. 12, S. 4200-208.
115. *15d-PGJ2 inhibits cell growth and induces apoptosis of MCG-803 human gastric cancer cell line.* **Chen, Y.-X., Zhong, X.-Y., Qin, Y.-F., et al.** 10, 2003, World Journal of Gastroenterology, Bd. 9, S. 2149-53.
116. *Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma and Its Ligands in Non-Neoplastic and Neoplastic Human Urothelial Cells.* **Nakashiro, K.-I., Hayashi, Y., Kita, A., et al.** 2, 2001, American Journal of Pathology, Bd. 159, S. 591-97.
117. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Induces Pancreatic Cancer Cell Apoptosis.* **Eibl, G., Wentz, M.N., Reber, H.A., et al.** 2, 2001, Biochemical and Biophysical Research Communications, Bd. 287, S. 522-29.
118. *Inhibition of Human Lung Cancer Cell Growth by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Agonists through Induction of Apoptosis.* **Tsubouchi, Y., Sano, H., Kawahito, Y., et al.** 2000, Biochemical and Biophysical Research Communications, Bd. 270, S. 400-405.
119. *Cytotoxicity of 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 through PPAR $\gamma$ -independent Pathway and the Involvement of the JNK and Akt Pathway in Renal Cell Carcinoma.* **Fujita, M., Tohji, C., Honda, Y., et al.** 7, 2012, International Journal of Medical Sciences, Bd. 9, S. 555-66.
120. *Retinoic Acid Enhances Prostaglandin E2 Production Through Increased Expression of Cyclooxygenase-2 and Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 in Rat Brain Microglia.* **Kim, B., Lee, J.-H., Yang, M.-S., et al.** 2008, Journal of Neuroscience Research, Bd. 86, S. 1353–60.
121. *Suppression of pancreatic carcinoma growth by activating peroxisome*

- proliferator-activated receptor  $\gamma$  involves angiogenesis inhibition.* **Dong, Y.-D., Wang, X.-P., Wu, K.** 2009, *World Journal of Gastroenterology*, S. 441–448.
122. *Peroxisome-proliferator-activated Receptors and Cancers: Complex Stories.* **Michalik, L., Desvergne, B., Wahli, W.** 1, 2004, *Nature Reviews Cancer*, Bd. 4, S. 61-70.
123. *PPAR Activation and Decreased Proliferation in Oral Carcinoma Cells With 4-HPR.* **Harris, G., Ghazallah, R.A., Nascene, D., et al.** 2005, *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, Bd. 133, S. 695-701.
124. *Management of primary melanoma of the female urogenital tract.* **Piura, B.** Oktober 2008, *The Lancet Oncology*, Bd. 9, S. 973-81.
125. *Management of squamous cell vulvar cancer: A review.* **Deppe, G., Mert, I., Winer, I.S.** 5, 2014, *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, Bd. 40, S. 1217–25.
126. **National Cancer Institute.** Cancer Stat Facts: Vulvar Cancer. *National Cancer Institute - Surveillance, Epidemiology, and Results Program.* [Online] 2017. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/vulva.html>.

## Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1:</b> ALTERSSTANDARDISIERTE ERKRANKUNGS- UND STERBERATEN DES VULVAKARZINOMS, DEUTSCHLAND 1999-2016/2017, PROGNOSE (INZIDENZ) BIS 2020, JE 100.000 (3).	6
<b>ABBILDUNG 2:</b> INTRAEPITHELIALE VULVÄRE NEOPLASIE (VIN) UND IHRE TERMINOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN (23).	8
<b>ABBILDUNG 3:</b> ENTSTEHUNGSWEGE DES VULVAKARZINOMS, ADAPTIERT NACH (12) (22).	9
<b>ABBILDUNG 4:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DAS TUMORSTADIUM BESTIMMENDEN AUSBREITUNG (56).	17
<b>ABBILDUNG 5:</b> REAKTIONSWEG DES TETRAZOLINIUMSALZES ZU FORMAZAN (EC = ELEKTRONENAUFNEHMER; RS = SUCCINAT-TETRAZOLINIUMREDUKTASE) (77).	26
<b>ABBILDUNG 6:</b> POSITIV- UND NEGATIVKONTROLLE FÜR LCoR. LCoR POSITIVKONTROLLE (A) UND LCoR NEGATIVKONTROLLE (B) AN DER PLAZENTA.	29
<b>ABBILDUNG 7:</b> LCoR EXPRESSION IM VULVAKARZINOM MIT GRADING 1 (VCA 54) (A) GRADING 2 (VCA 56) (B) GRADING 3 (VCA 152) (C).	30
<b>ABBILDUNG 8:</b> POSITIV- UND NEGATIVKONTROLLE FÜR NRIP 1. LCoR POSITIVKONTROLLE (A) UND LCoR NEGATIVKONTROLLE (B) AN DER PLAZENTA.	34
<b>ABBILDUNG 9:</b> NRIP1 EXPRESSION IM VULVAKARZINOM MIT GRADING 1 (VCA68) (A) GRADING 2 (VCA103) (B) GRADING 3 (VCA45) (C).	35
<b>ABBILDUNG 10:</b> POSITIVE KORRELATION DER HOHEN NUKLEÄREN LCoR (A) UND NRIP1 (B) EXPRESSION (VCA 113), POSITIVE KORRELATION DER NIEDRIGEN NUKLEÄREN LCoR (C) UND NRIP1 (D) EXPRESSION (VCA 53).	37
<b>ABBILDUNG 11:</b> POSITIVKONTROLLE: LCoR EXPRESSION IN DER MAMMAKARZINOM ZELLINIE MCF-7 (A), IN DER ZELLINIE A-431 IST LCoR STARK IM ZYTOSOL EXPRIMIERT (B), IN DER ZELLINIE SW 954 WIRD LCoR MIT MÄßIGER INTENSITÄT EXPRIMIERT (C).	40
<b>ABBILDUNG 12:</b> POSITIVKONTROLLE: NRIP1 EXPRESSION IN DER MAMMAKARZINOM ZELLINIE MCF-7 (A), IN DER ZELLINIE A-431 WIRD NRIP1 IN GERINGERER INTENSITÄT EXPRIMIERT (B), IN DER ZELLINIE SW 954 FINDET SICH EINE MÄßIGE EXPRESSION VON NRIP1 SOWOHL IM ZYTOPLASMA ALS AUCH IM NUKLEUS (C).	41
<b>ABBILDUNG 13:</b> <i>DOPPELIMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG MIT DEN PRIMÄRANTIKÖRPERN LCoR UND PPARGAMMA SER112, KONTROLLEN UND UNTER STIMULATION MIT 1nM 15DPG<sub>2</sub> IN DER ZELLINIE A-431. KONTROLLEN SIND LINKS (A, B, C), STIMULATIONEN MIT 1nM 15DPG<sub>2</sub> SIND RECHTS (D, E, F); DIE ZELLKERNE SIND MIT DAPI BLAU GEFÄRBT. PPARGAMMA SER112 IST MIT DEM Cy2-SEKUNDÄRANTIKÖRPER MARKIERT UND GRÜN ANGEFÄRBT (A). LCoR IST MIT DEM Cy3-SEKUNDÄRANTIKÖRPER MARKIERT UND ROT ANGEFÄRBT (B). DIE DREIFACHFILTERUNG ZEIGT EINE SIMULTANE LCoR UND PPARGAMMA SER112 EXPRESSION IM ZYTOPLASMA MIT EINDEUTIGER AUSSPARUNG DES ZELLKERNS (C). UNVERÄNDERTE PPARGAMMA SER112 UND LCoR EXPRESSION UNTER STIMULATION MIT 1nM 15DPG<sub>2</sub> (D, E, F). DIE FLUORESCENZBILDER WURDEN BEI EINER X63 VERGRÖßERUNG AUFGENOMMEN.</i>	46
<b>ABBILDUNG 14:</b> <i>DOPPELIMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG MIT DEN PRIMÄRANTIKÖRPERN LCoR UND PPARGAMMA SER112, KONTROLLEN UND UNTER STIMULATION MIT 1nM 15DPG<sub>2</sub> IN DER ZELLINIE SW 954. KONTROLLEN SIND LINKS (A, B, C), STIMULATIONEN MIT 1nM 15DPG<sub>2</sub> SIND RECHTS (D, E, F); DIE ZELLKERNE SIND MIT DAPI BLAU GEFÄRBT. PPARGAMMA SER112 IST MIT DEM Cy2-SEKUNDÄRANTIKÖRPER MARKIERT UND GRÜN ANGEFÄRBT. ES IST EINE EINDEUTIGE NUKLEÄRE EXPRESSION ZU ERKENNEN. DER BILDAUSSCHNITT LINKS UNTEN STELLT DIE KERNFÄRBUNG MIT DAPI DAR (A). LCoR IST MIT DEM Cy3-SEKUNDÄRANTIKÖRPER MARKIERT, SOMIT ROT ANGEFÄRBT UND ES IST EINE EINDEUTIGE NUKLEÄRE EXPRESSION VON LCoR ZU ERKENNEN (B). DIE GELBFÄRBUNG IST DURCH EINE SIMULTANE EXPRESSION VON LCoR (ROT) UND PPARGAMMA SER112 (GRÜN) BEDINGT. MAN SIEHT EINE EINDEUTIGE NUKLEÄRE KO-EXPRESSION VON LCoR UND PPARGAMMA SER112 (C). UNTER STIMULATION MIT 1nM 15DPG<sub>2</sub> LIEGT BEI LCoR SOWIE PPARGAMMA SER112 KEINE KERNFÄRBUNG MEHR VOR (D, E, F). IN D WIRD NOCHMAL DIE KERNFÄRBUNG MIT DAPI DARGESTELLT, UM DIE FEHLENDE NUKLEÄRE EXPRESSION VON LCoR UND PPARGAMMA SER112 ZU VERDEUTLICHEN. DIE FLUORESCENZBILDER WURDEN BEI EINER X63 VERGRÖßERUNG AUFGENOMMEN.</i>	48
<b>ABBILDUNG 15:</b> MODELL VON LCoR ALS PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ KOAKTIVATOR. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG MODIFIZIERT NACH (80); L=9-CIS-RETINSÄURE, R= ROSIGLITAZON (WIRD IN DIESER BESCHREIBUNG VERNACHLÄSSIGT); ERSTMALIG VON DIESEN AUTOREN GEZEIGT AN DER PLAZENTA DER MAUS.	56
<b>TABELLE 1:</b> FIGO- UND TNM-KLASSIFIKATION DES VULVAKARZINOMS (ADAPTIERT NACH (51) (52)).	15
<b>TABELLE 2:</b> STADIENVERTEILUNG BEI ERSTDIAGNOSE UND 5-JAHRES-ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT DES UICC-STADIUMS, DEUTSCHLAND 2015-2016, MODIFIZIERT NACH DATEN DES RKI (3).	18
<b>TABELLE 3:</b> GERÄTE	59
<b>TABELLE 4:</b> CHEMIKALIEN	60
<b>TABELLE 5:</b> VERBRAUCHSMATERIALIEN	61
<b>TABELLE 6:</b> ANTIKÖRPER UND ZELLEN	62

<b>FIGURE 1:</b> DIE EXPRESSION VON LCOR IM ZELLKERN NAHM MIT DEM GRADING SIGNIFIKANT AB ( $p=0.019$ ). DARSTELLUNG ALS BOXPLOT: DIE BOX ENTSPRICHT DER 25.-75. PERZENTILE, DER MEDIAN IST DIE LINIE IN DER BOX, DIE LINIEN ENTSPRECHEN DER 5.-95. PERZENTILE, DIE KREISE SIND MILDE AUSREISER MIT EINEM WERT, DER MAXIMAL 3X DER LÄNGE DER BOX ENTSPRICHT, DIE STERNCHEN SIND EXTREME AUSREISER MIT WERTEN, DIE $>3X$ DER LÄNGE DER BOX ENTSPRECHEN. ....	31
<b>FIGURE 2:</b> DIE EXPRESSION VON LCOR IM ZELLKERN NAHM MIT STEIGENDEM T-STATUS SIGNIFIKANT AB ( $p<0,001$ ). DARSTELLUNG ALS BOXPLOT: DIE BOX ENTSPRICHT DER 25.-75. PERZENTILE, DER MEDIAN IST DIE LINIE IN DER BOX, DIE LINIEN ENTSPRECHEN DER 5.-95. PERZENTILE, DIE KREISE SIND MILDE AUSREISER MIT EINEM WERT, DER MAXIMAL 3X DER LÄNGE DER BOX ENTSPRICHT, DIE STERNCHEN SIND EXTREME AUSREISER MIT WERTEN, DIE $>3X$ DER LÄNGE DER BOX ENTSPRECHEN. ....	32
<b>FIGURE 3:</b> DIE EXPRESSION VON LCOR IM ZELLKERN WAR BEI UNIFOKALEN VULVAKARZINOMEN SIGNIFIKANT NIEDRIGER ALS BEI MULTIFOKALEN ( $p=0.021$ ). DARSTELLUNG ALS BOXPLOT: DIE BOX ENTSPRICHT DER 25.-75. PERZENTILE, DER MEDIAN IST DIE LINIE IN DER BOX, DIE LINIEN ENTSPRECHEN DER 5.-95. PERZENTILE, DIE KREISE SIND MILDE AUSREISER MIT EINEM WERT, DER MAXIMAL 3X DER LÄNGE DER BOX ENTSPRICHT, DIE STERNCHEN SIND EXTREME AUSREISER MIT WERTEN, DIE 3X DER LÄNGE DER BOX ENTSPRECHEN.....	33
<b>FIGURE 4:</b> DIE EXPRESSION VON NRIP1 IM ZELLKERN NAHM MIT DEM GRADING SIGNIFIKANT AB ( $p=0,01$ ). DARSTELLUNG ALS BOXPLOT: DIE BOX ENTSPRICHT DER 25.-75. PERZENTILE, DER MEDIAN IST DIE LINIE IN DER BOX, DIE LINIEN ENTSPRECHEN DER 5.-95. PERZENTILE, DIE KREISE SIND MILDE AUSREISER MIT EINEM WERT, DER MAXIMAL 3X DER LÄNGE DER BOX ENTSPRICHT, DIE STERNCHEN SIND EXTREME AUSREISER MIT WERTEN, DIE $>3X$ DER LÄNGE DER BOX ENTSPRECHEN.....	35
<b>FIGURE 5: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSURVE:</b> BLAU: $IRS \leq 2$ , ROT: $IRS >2$ . ES ZEIGTE SICH EIN SIGNIFIKANTER ( $p=0,005$ ) ÜBERLEBENSVORTEIL FÜR PATIENTINNEN, DEREN VULVAKARZINOM EINE HÖHERE NUKLEÄRE LCOR EXPRESSION AUFWIES.....	38
<b>FIGURE 6: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSURVE:</b> BLAU: $IRS \leq 3$ , ROT: $IRS >3$ . ES ZEIGTE SICH EIN LÄNGERES REZIDIVFREIES ÜBERLEBEN FÜR PATIENTINNEN, DEREN VULVAKARZINOM EINE HÖHERE NUKLEÄRE NRIP1 EXPRESSION AUFWIES. ...	39
<b>FIGURE 7: VERGLEICH DER VIABILITÄT DER VULVAKARZINOMZELLEN A-431 UND SW 954 UNTER STIMULATION MIT 9-CIS-RETINSÄURE,</b> DARSTELLUNG VON A-431 DURCH DIE DUNKLEN UND VON SW 954 DURCH DIE HELLEN BALKEN, * ES WURDE EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN KONTROLLEN UND DER STIMULATION MIT 10NM/ML 9-CIS-RETINSÄURE IN DER ZELLLINIE SW 954 GEMESSEN. ....	42
<b>FIGURE 8: VERGLEICH DER VIABILITÄT DER VULVAKARZINOMZELLEN A-431 UND SW 954 UNTER STIMULATION MIT 15DPG<sub>2</sub></b> DARSTELLUNG VON A-431 DURCH DIE DUNKLEN UND VON SW 954 DURCH DIE HELLEN BALKEN * ES WURDE EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN KONTROLLEN UND DER STIMULATION MIT 1NM/ML 15DPG <sub>2</sub> IN DER ZELLLINIE A-431 GEMESSEN. ** ES WURDE EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN KONTROLLEN UND DER STIMULATION MIT 1NM/ML 15DPG <sub>2</sub> IN DER ZELLLINIE SW 954 GEMESSEN. ....	43
<b>FIGURE 9: VERGLEICH DER VIABILITÄT DER VULVAKARZINOMZELLEN A-431 UND SW 954 UNTER STIMULATION MIT 15DPG<sub>2</sub> UND 9-CIS-RETINSÄURE,</b> DARSTELLUNG VON A-541 DURCH DIE DUNKLEN UND VON SW 954 DURCH DIE HELLEN BALKEN, * ES WURDE EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN KONTROLLEN UND DER STIMULATION MIT 1NM/ML 15DPG <sub>2</sub> UND 1NM/ML 9-CIS-RETINSÄURE IN DER ZELLLINIE A-431 GEMESSEN. ** ES WURDE EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN KONTROLLEN UND DER STIMULATION MIT 1NM/ML 15DPG <sub>2</sub> UND 1NM/ML 9-CIS-RETINSÄURE IN DER ZELLLINIE SW 954 GEMESSEN. ....	44
<b>FIGURE 10: QUANTIFIZIERUNG DER ZELLVIBILITÄT VON A-431 UND SW 954 UNTER STIMULATION MIT 10NM/ML 15DPG<sub>2</sub>,</b> DARSTELLUNG VON A-431 DURCH DIE DUNKLEN UND VON SW 954 DURCH DIE HELLEN BALKEN, *ES WURDE EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED ZWISCHEN DER ANZAHL DER LEBENDEN A-431-ZELLEN IN DEN KONTROLLEN IM VERGLEICH ZUR STIMULATION UNTER 10NM/ML 15DPG <sub>2</sub> FESTGESTELLT. **ES WURDE EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED ZWISCHEN DER ANZAHL DER LEBENDEN SW 954-ZELLEN IN DEN KONTROLLEN IM VERGLEICH ZUR STIMULATION UNTER 10NM/ML 15DPG <sub>2</sub> FESTGESTELLT. ....	45

## Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Jeschke für das Thema meiner Dissertation sowie für die Betreuung bedanken. Er hatte stets ein offenes Ohr und ließ mich mit auch noch so kleinen Fragen und Problemen nie alleine. Trotz Lehrstuhlwechsel gegen Ende meiner Dissertation nach Augsburg hat die Kommunikation weiterhin reibungslos funktioniert und ich bin mir vollkommen bewusst, dass dies keine Selbstverständlichkeit darstellt. Die enge Zusammenarbeit hat mir immer große Freude bereitet und ich habe sie sehr zu schätzen gewusst.

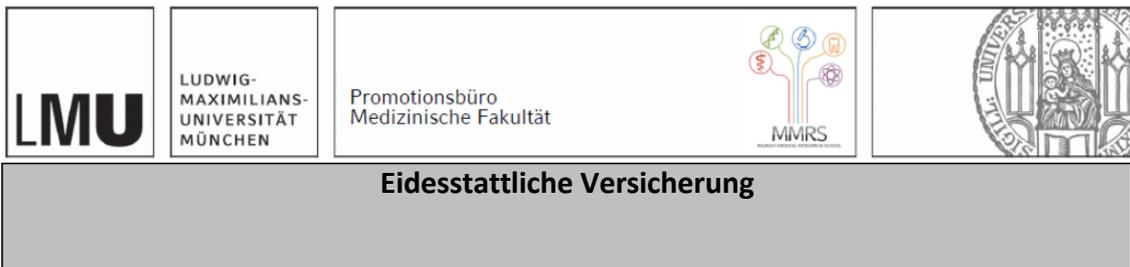
Ein weiterer großer Dank gilt Christina Kuhn und Simone Hoffmann, den Mitarbeiterinnen des Labors, die ihr Wissen und ihre Kompetenzen im Bereich des wissenschaftlichen Arbeitens, der Immunhistochemie und der Zellkultur unermüdlich an Doktoranden weitergeben. Mit ihrer offenen und freundlichen Art sorgten sie immer für eine gute Stimmung, was die Arbeit allzeit sehr angenehm machte. Auch bei meiner Betreuerin Dr. med. Helene Heidegger-Steger möchte ich mich hiermit herzlich für die Betreuung bedanken.

Ein besonders großer Dank geht auch an meine Mitdoktoranden Nadine, Nicole und Lauritz mit denen so manche Träne der Freude oder auch der Verzweiflung verdrückt wurde. Die Zeit im Labor wäre ohne euch nur halb so schön gewesen und nicht mal halb so schnell verfliegen.

Der größte Dank gilt meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden für zahllose Gespräche und Motivation. Dafür, dass sie über den gesamten Prozess an meiner Seite waren, mich aufgebaut haben, wenn ich es gebraucht habe und sich mit mir gefreut haben, wenn etwas erfolgreich war.

Vielen Dank!

## Eidesstattliche Erklärung



Bomhard, Juliane

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

### **Untersuchung von NRIP1 und LCoR zur prognostischen Bedeutung bei Patientinnen mit Vulvakarzinom**

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

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

Juliane Bomhard

München, 02. August 2022