

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese

Expression von Inhibin-alpha, -betaA und -betaB im Endometriumkarzinom:
Inhibin-alpha als unabhängiger prognostischer Parameter

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

vorgelegt von
Silvia Worbs
aus
Ludwigsburg
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: PD Dr. Florian May

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Ioannis Mylonas

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juni 2008

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|--------------|
| Abkürzungsverzeichnis | 5 |
| 1 Einleitung | 7 |
| 1.1 Das Endometriumkarzinom | 7 |
| 1.1.1 Epidemiologie und Pathogenese | 7 |
| 1.1.2 Histologie und Differenzierungsgrad | 8 |
| 1.1.3 Prognose und Prognosekriterien | 9 |
| 1.2 Inhibin/Activin | 10 |
| 1.2.1 Molekulare Struktur | 10 |
| 1.2.2 Signaltransduktion | 12 |
| 1.2.3 Expression | 15 |
| 2 Fragestellungen | 19 |
| 3 Material und Methoden | 20 |
| 3.1 Das Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial | 20 |
| 3.1.1 Tumorphistologie | 21 |
| 3.2 Immunhistochemie | 21 |
| 3.2.1 Verwendete Primärantikörper | 22 |
| 3.2.2 Auswertung der Immunhistochemie | 22 |
| 3.2.3 Streptavidin-Biotin-Methode | 23 |
| 3.2.4 Verfahren | 25 |
| 3.2.5 Fixierung und Entparaffinierung | 25 |
| 3.2.6 Antigendemaskierung im Schnellkochtopf | 25 |
| 3.2.7 Immunhistochemische Färbung | 26 |
| 3.2.8 Chemikalien und Lösungsansätze | 27 |
| 3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 28 |
| 3.4 Statistik | 28 |
| 4 Ergebnisse | 30 |
| 4.1 Klinisch-pathologische Aspekte | 30 |
| 4.1.1 Alter bei Diagnose | 32 |
| 4.1.2 Tumorstadium | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.3 Tumorhistologie | 32 |
| 4.2 Erkrankungs- und Überlebensstatus | 33 |
| 4.3 Auswertung der Gewebeschnitte | 33 |
| 4.3.1 Inhibin-alpha in normalem und malignem Endometrium | 33 |
| 4.3.2 Inhibin-betaA und -betaB in normalem und malignem Endometrium | 36 |
| 4.3.3 Überlebensanalyse | 43 |
| 5 Diskussion | 48 |
| 6 Zusammenfassung | 57 |
| 7 Literaturverzeichnis | 59 |
| 8 Anhang | 72 |
| 8.1 Vorabpublikationen | 72 |
| Danksagung | 73 |
| Curriculum vitae | 74 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| ActRI | Activin-Rezeptor Typ I |
| ActRII | Activin-Rezeptor Typ II |
| AFP | Alpha-1-Fetoprotein |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser (<i>aqua destillata</i>) |
| BG | Betaglycan |
| BMI | <i>Body Mass Index</i> |
| BMP | <i>Bone morphogenetic protein</i> |
| DAB | 3,3-Diaminobenzidin |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| EGF | <i>Epidermal growth factor</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| ER | Östrogenrezeptor |
| FAST/FoxH | <i>Forkhead activin signal transducer</i> |
| FIGO | <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i> |
| FSH | Follikel-stimulierendes Hormon |
| GDF | <i>Growth differentiating factor</i> |
| GnRH | <i>Gonadotropin-releasing hormone</i> |
| β-hCG | Beta-Choriongonadotropin |
| hCG | Humanes Choriongonadotropin |
| HE | Hämatoxylin Eosin |
| IGF-I | <i>Insulin-like growth factor</i> |
| Inh-BP | Inhibin-Rezeptor (<i>Inhibin binding protein</i>) |
| IVF | In-vitro-Fertilisation |
| LH | Luteinisierendes Hormon |
| mRNA | messenger-Ribonucleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>) |
| MSI | <i>Microsatellite Instability</i> |
| P | Phosphor |
| PAPP-A | <i>pregnancy-associated plasma protein-A</i> |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PR | Progesteronrezeptor |
| PTEN | <i>phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10</i> |
| SARA | <i>Smad anchor for receptor activation</i> |
| Smad | Second Messenger (<i>sons of mothers against decapentaplegia</i>) |
| TF | Transkriptionsfaktoren |

| | |
|--------------|--|
| TGF- β | <i>Transforming growth factor beta family</i> |
| TVU | Transvaginaler Ultraschall |
| uE3 | Freies Östriol (<i>unconjugated estriol</i>) |
| 5-JÜR | 5-Jahres-Überlebensrate |

1 Einleitung

Inhibine sind dimere Glycoproteine, die aus einer alpha-Untereinheit und einer von zwei möglichen beta-Untereinheiten bestehen. Sie spielen in der menschlichen Reproduktion und bei endokrin-aktiven Tumoren eine wichtige Rolle.

Inhibine (auch Activine) konnten nach ihrer Identifizierung in Granulosazellen des Ovars in weiteren zahlreichen Geweben identifiziert werden. Unter anderem war eine zyklische Expression im Endometrium während des Menstruationszyklus zu beobachten (103), sowie bei der Endometriumhyperplasie und Karzinomen (107,108). Eine Funktion als Tumorsuppressoren der Inhibin- α -Untereinheit wurde erstmals bei Mäusen identifiziert, nachdem man das Inhibin- α -Gen deaktiviert hatte (Inhibin- α *knock out*- Maus). Daraufhin entwickelten die weiblichen und männlichen Mäuse geschlechtsspezifische Keimdrüsen-Tumoren (86). Die tumorinduzierende Wirkung durch Mangel an Inhibinen bzw. Überschuss an Activinen im Ovar und die zyklische Expression in normalem Endometrium gaben Grund zu der Annahme, dass Inhibine auch in malignem Endometriumgewebe eine wichtige Rolle spielen könnten.

In einem ersten Ansatz wurde in dieser Arbeit zum einen durch Immunhistochemie die Expression der Inhibin-Untereinheiten im Endometriumkarzinom untersucht und mit normalem und atrophischem Endometriumgewebe verglichen. Eine weiterführende Untersuchung befasste sich mit dem immunhistochemischen Nachweis der Inhibin-Untereinheiten im Endometriumkarzinom und der möglichen Funktion der Alpha-Untereinheit als Tumorsuppressoren und der damit verbundenen Rolle in Diagnostik und Prognose bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom.

1.1 Das Endometriumkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Pathogenese

Das Endometriumkarzinom ist der häufigste gynäkologische genitale Tumor in der westlichen Welt, mit einer steigenden Inzidenz in den Industrienationen bei prä- und postmenopausalen Frauen (9,154). Die Inzidenz beträgt ca. 25 pro 100 000 Einwohner pro Jahr für die Bundesrepublik Deutschland. Die Mortalität wird auf 3 pro 100 000 Einwohner angegeben. Somit werden pro Jahr etwa 1300 am Endometriumkarzinom verstorbene Frauen gezählt (159).

Es werden derzeit zwei Entstehungsmechanismen für die sogenannten Typ-I- und Typ-II-Karzinome diskutiert (17): Bei der Entwicklung der Typ I-Karzinome spielen endokrine

Risikofaktoren besonders in Form einer prolongierten Exposition gegenüber Östrogenen eine wichtige Rolle (46).

Auf molekularer Ebene wurden unterschiedliche Veränderungen bei Typ I-Karzinomen (Endometrioid Karzinome) im Vergleich zu Typ II-Karzinomen gefunden (71,82). Endometrioid Tumore weisen häufig eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) auf (20% bis 30%) (21,24), sowie PTEN Mutationen (30% bis 50%)(138), aber kaum p53 Mutationen (<10%) (163). Im Gegensatz dazu stehen seröse Karzinome, deren Mehrzahl p53 Mutationen zeigt, als auch einen *loss of heterozygosity* (LOH) bei mehreren Chromsomen (163). Sie zeigen nur gelegentlich MSI (168).

MSI sind repetitive DNA Sequenzen, die im ganzen Genom verteilt sind. Mikrosatelliten reagieren besonders auf Replikationsfehler, die zu Insertions- oder Deletionsmutationen führen. Diese Art von Mutationen erhöht die Fähigkeit der Zellen, Replikationsfehler zu reparieren. MSI wurde in bis zu 30% der Endometriumkarzinome gefunden, besonders in endometrioiden Karzinomen (24). Die 5-JÜR bei Patientinnen mit MSI wurde als 20% besser angegeben, als bei Patientinnen ohne MSI (87). Endometrioid Karzinome mit MSI haben zusätzlich eher eine PTEN Mutation und seltener eine p53 Überexpression (87). Somit könnte dies eine Erklärung für eine günstige Prognose durch MSI auf der Ebene der molekularen Karzinogenese sein.

Es müssen jedoch weitere bisher unbekannte Pathomechanismen existieren, die mit der Expression und Wirkung von Inhibinen auf die Tumorgenese des Endometriumkarzinom in dieser Arbeit untersucht wurden.

1.1.2 Histologie und Differenzierungsgrad

Das Endometriumkarzinom kann nach folgender WHO-Klassifikation (1994) eingeteilt werden (42):

- Endometrioides Adenokarzinom
 - Sekretorische Variante
 - Flimmerepithel
 - Plattenepitheldifferenzierung (Adenoakanthom; adenosquamöses Karzinom)
- Serös
- Klarzellig
- Muzinös

- Plattenepithelial
- Gemischt
- Undifferenziert

Das endometrioides Adenokarzinom (Typ I) stellt mit 80% der Fälle die häufigste Manifestation dar. Die Prognose ist im Allgemeinen gut, abhängig von Alter, Differenzierungsgrad und chirurgischem Stadium (53). Alle anderen histologischen Subtypen fallen unter die Gruppe der nicht-endometrioiden Karzinome (Typ II). Ca. 5 % aller Fälle sind vom serösen Typ. Sie entstehen gewöhnlich auf dem Boden einer Endometriomatrophie.

Weniger als 5 % aller Endometriumkarzinome können zum Typ der klarzelligen Karzinome gezählt werden. Muzinöse, squamöse und sekretorische Karzinome sind sehr seltene Tumoren, wobei nur squamöse Karzinome eine sehr schlechte Prognose aufzeigen (53).

1.1.3 Prognose und Prognosekriterien

Wichtige Prognosefaktoren sind Tumorstadium (Myometriuminfiltration), histologischer Zelltyp und Differenzierungsgrad (7,33,46). Auch das Alter der Patientin ist ein bedeutender Prognosefaktor, dazu kommen zunehmend biologische Faktoren wie Steroidhormonrezeptoren, DNA-Gehalt, Ploidie, p53- und Her2/neu-Überexpression und Verlust von bcl-2 (53).

Die prognostischen Parameter können in uterine und extrauterine Faktoren unterteilt werden:

- Uterine Faktoren beinhalten den histologischer Zelltyp (19), den Differenzierungsgrad (Grading) (43), die Myometriuminfiltration (34), den Zervixbefall (189), vorhandene Gefäßeinbrüche (98), atypische Endometriumhyperplasie (179) sowie biologische Faktoren (Steroidhormonrezeptoren (10), DNA-Gehalt, Ploidie (18), p53-Überexpression und Her2/neu, Verlust von bcl-2 (44,128))
- Als extrauterine Faktoren gelten die peritoneale Spülzytologie (19), eine Adnexe-beteiligung (43), intraperitoneale Ausdehnung (98), befallenen pelvine und paraaortale Lymphknoten (34) sowie das Alter der Patientin (9).

Obwohl der histologische Differenzierungsgrad mit anderen prognostischen Parametern einschließlich Alter, Stadium, Tiefe der Myometriuminfiltration, korreliert, scheint der Differenzierungsgrad kein unabhängiger Prognosefaktor zu sein (129). Tatsächlich sinkt die Signifikanz des Differenzierungsgrad nach Einbeziehung der anderen Faktoren (2,188). Nichtsdestotrotz kann der Differenzierungsgrad bei fortgeschrittenen Karzinomen durchaus als Prognosekriterium gelten (72).

Auch die Ausbreitung von Tumorzellen auf das Endothel der Gefäße stellt einen starken unabhängigen Prognosefaktor in Bezug auf Rezidive und Tod durch den Tumor dar (52).

Inwieweit die Inhibine eine Rolle als unabhängiger prognostischer Faktor spielen, wird in dieser Arbeit untersucht und ausgewertet.

1.2 Inhibin/Activin

1.2.1 Molekulare Struktur

Inhibine sind dimere Glycoproteine, die aus einer alpha-Untereinheit (Inhibin- α) und einer von zwei möglichen beta-Untereinheiten (Inhibin- β A oder Inhibin- β B) bestehen. Sie dimerisieren durch Disulfidbrücken dementsprechend zu Inhibin A (Inhibin- α - β A) aus einer Inhibin- α -Untereinheit und einer Inhibin- β A-Untereinheit und zu Inhibin B (Inhibin- α - β B) aus einer Inhibin- α -Untereinheit und einer Inhibin- β B-Untereinheit (75,146).

Sowohl Inhibin A als auch Inhibin B supprimieren gezielt die FSH-Sekretion aus der Hypophyse in Zellkultur, ohne aber die LH-Sekretion zu beeinflussen (37).

Activine sind entweder Homodimere aus den Inhibin- β -Untereinheiten (Activin A: Inhibin- β A- β A, Activin B: Inhibin- β B- β B) oder Heterodimere aus den beiden unterschiedlichen beta-Untereinheiten (Activin AB: Inhibin- β A- β B). Activine wurden erstmals in folliculärer Flüssigkeit gefunden (172). Sie stimulieren die FSH Sekretion in der Hypophyse (76).

Sowohl Inhibin- α , Inhibin- β A als auch Inhibin- β B sind Mitglieder der *transforming growth factor-beta* (TGF- β) *superfamily* (63). Weitere Mitglieder sind *Müllerian inhibitory substance*, *bone morphogenetic proteins* (BMP) und *growth differentiating factor* (GDF) 9/9B. Es handelt sich um Zytokine, die Ähnlichkeiten in ihrer Primärsequenz aufweisen. Besonders Proteine mit Cysteinrest an der Carboxy-terminalen Region des Moleküls

und dimerer Struktur durch Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten (sogenannte „*double cysteine knots*“) zeigen in den meisten Fällen biologische Aktivität (142).

Ursprünglich wurden Inhibine und Activine mit unterschiedlichen Molekulargewichte aus folliculärer Flüssigkeit über Vorläuferstufen isoliert (160). Sowohl Inhibin- α - als auch Inhibin- β -Untereinheiten werden als vollständige Vorläuferproteine synthetisiert. Das Inhibin- α -Vorläuferprotein besteht aus drei unterschiedlichen Regionen, nämlich *Pro*, αN und αC . Activine bestehen hingegen aus zwei Regionen (*Pro β* und β) (136). Die proteolytische Spaltung der Proteine erfolgt sowohl intrazellulär als auch im Serum (91,147). Studien zeigten, dass die vollständigen Vorläuferstufen der Inhibin/Activin-Dimere in Bioassays von hypophysären Zellen inaktiv waren, wohingegen die gekürzten Dimere Bioaktivität zeigten (80). Auch *in vitro* wurde nachgewiesen, dass Serum-Inhibine mit höhere Molekulargewichten zu 30-kDa-Inhibin verarbeitet wurden (91). Activin A lag im Serum in seiner reifen 25-kDa Form vor (100) (**Abbildung 1**).

Die drei Untereinheiten sind Produkte unterschiedlicher Gene, die auf den Chromosomen 2 (Inhibin- α und Inhibin- βB -Untereinheit) und 7 (Inhibin- βA -Untereinheit) lokalisiert sind (142). Es konnten weitere beta-Untereinheiten isoliert werden: Inhibin- βC , Inhibin- βD und Inhibin- βE . Durch Disulfidbrücken bilden sie ebenfalls Homodimere zu Activin C, Activin D und Activin E (45,115,151). Diese Dimere haben keine Wirkung auf die FSH Sekretion. Inhibin- βC und Inhibin- βE werden stark in der Leber exprimiert; eine biologische Aktivität wurde jedoch noch nicht beschrieben (70). Inhibin- βC kann Heterodimere mit Inhibin- βA und Inhibin- βB bilden, jedoch nicht mit der alpha-Untereinheit (92).

Ein weiteres Peptid konnte identifiziert werden, was zwar keine strukturellen Gemeinsamkeiten mit Inhibinen hat, funktionell aber eine Rolle spielt. Es handelt sich um Follistatin, welches Activin binden und dadurch die FSH-stimulierende Wirkung von Activin wiederum supprimieren kann (95).

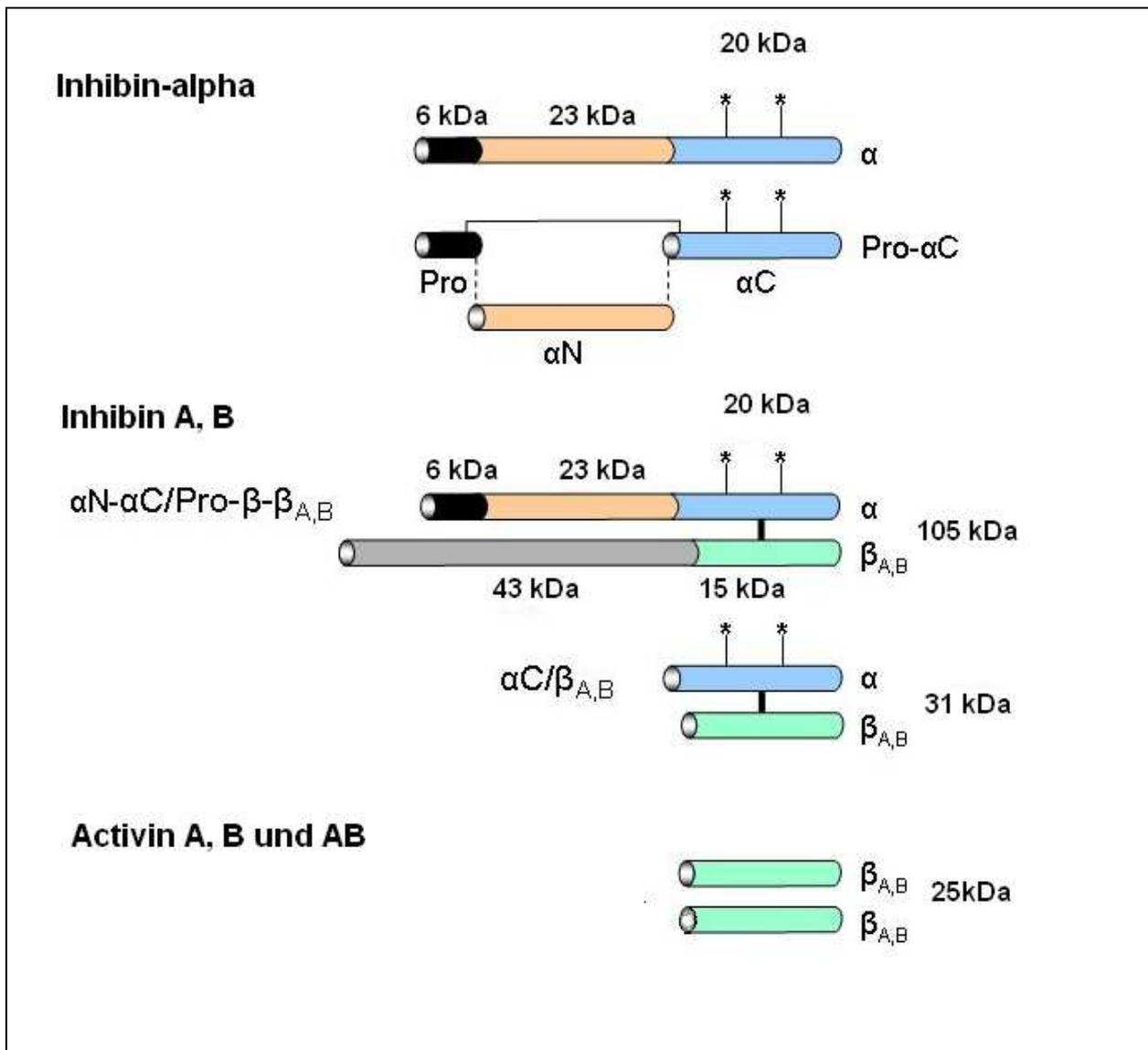


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Vorstufen und reifen Formen von Inhibin und der freien Inhibin- α -Untereinheit. Auch die reife, biologisch aktive Form von Activin wird dargestellt. Die 6 kDa Region am N-Terminus der Inhibin- α -Untereinheit ist als *Pro*, die 23 kDa Region ist als α N und die 20 kDa Region ist als α C gekennzeichnet. Die 43 kDa N-terminale Region der β -Untereinheit ist als *Pro- β* (142).

1.2.2 Signaltransduktion

Die meisten Mitglieder der TGF- β -family übertragen ihre Signale über spezifische dimere Rezeptorkomplexe, die mit einer Serin/Threoninkinase-Transduktionssystem (ActRII und ActRI) verbunden sind. Ihre biologischen Aktivitäten sind unterschiedlich, sowohl mit stimulierenden, als auch inhibitorischen Funktionen, die bei der Proliferation und Differenzierung vieler Organsysteme eine Rolle spielen (142).

Der Signalweg von Activin wurde bereits gut beschrieben (**Abbildung 2**): Activin bindet zunächst mit hoher Affinität und Spezifität an den Activin-Typ-II-Rezeptor. Es gibt zwei

Subtypen des ActRII (ActRIIA und ActRIIB). Der entstandene Komplex bindet an einen zweiten Activin-Rezeptor Typ-I (ActRIA oder ActRIB; auch als ALK4 und ALK2 bekannt) und bildet so einen Activin Typ-I-Typ-II-Rezeptorkomplex. Diese Einheit leitet die Phosphorylierung an einen Serin- oder Threonine-Typ-I-Rezeptor (ActRI) ein, was zur Aktivierung eines Second-messenger-Systems führt. Das Second-messenger-System beinhaltet Proteine der sogenannten Smads (*sons of mothers against decapentaplegia*). Die Interaktion zwischen Smads und dem Rezeptorkomplex erfordert ein membrangebundenes Protein namens SARA (Smad anchor for receptor activation) (170). Es konnten 8 Typen von Smads als Mediatoren identifiziert werden (181). Nach der Phosphorylierung geht Activin spezifisch eine Bindung mit Smad 2 und/oder Smad 3 ein und bildet heteromere Komplexe mit einem Co-Smad (Smad 4) ein. Zusammen werden sie in den Nukleus der Zelle transferiert. In Verbindung mit aktivierenden Faktoren (FoxH, TF) führt dies anschließend zur Genaktivierung. Smads brauchen die so genannten *forkhead activin signal transducer (FAST) family* (auch FoxH genannt) als DNA-Bindeglieder, um die Transkription zu regulieren (25,26,68). Smads wurden außerdem als Bestandteile der TGF- β (Smad 2 und 3) und BMP (Smad 1, 5, 8) Signalwege identifiziert (54), obwohl Mitglieder der TGF- β Signale auch mit unterschiedlichen Kombinationen der unterschiedlichen Rezeptoren und Smad Subtypen transduzieren können. Inhibitorische Smads (Smad 6 und 7) konnten ebenfalls identifiziert werden (181). Ihre Rolle ist jedoch noch unklar (142).

Der Signalweg von Inhibinen ist weitaus weniger erforscht als der von Activin. Obwohl vorgeschlagen wurde, dass Inhibin durch einen eigenen Rezeptor Signale überträgt (149), wurde weder ein spezifischer Rezeptor isoliert noch spezifische Thyreonin/Serinkinasen durch Genom-Studien identifiziert (118). Da Inhibine als Gegenspieler der Activine gelten, könnten sie ihre biologische Wirkung durch die Antagonisierung des Activins am Activinrezeptor entfalten, anstatt durch einen eigenen Inhibinrezeptor (142). Es konnte bereits mittels hoher Konzentrationen von Inhibin eine antagonistische Wirkung zu Activin durch die Bindung am ActRII dargestellt werden (73,79). Außerdem wurde beobachtet, dass die Assoziation von Inhibin mit einem *binding protein* (Betaglycan oder TGF- β -Rezeptor Typ III) die Bindung von Inhibin an ActRIIA fördert. Inhibin ist demnach ein sehr potenter Antagonist zu Activin und seiner Wirkungsweise (74). Aus diesem Grund wurde die inhibitorische Wirkungsweise von Inhibin auf die FSH-Sekretion aus der Hypophyse der Bindung von Inhibin an Betaglycan zugeschrieben, um darzustellen, wie die Stimulation der FSH-Sekretion durch Activin gehemmt wird (142).

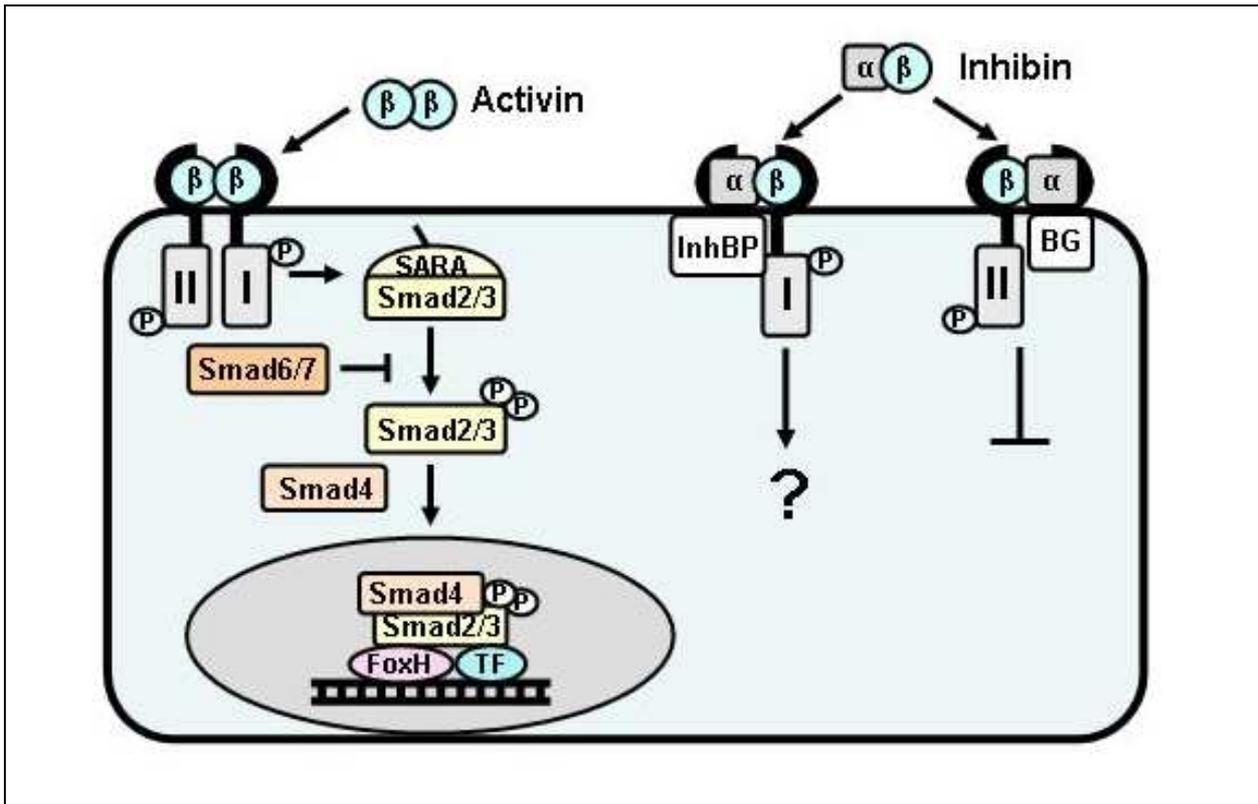


Abbildung 2: Signaltransduktion von Activin und Inhibin. Die Bindung des Activin-Liganden (β) an den Typ II Rezeptor (II) aktiviert die Activin-Signalkaskade und führt zur Aktivierung des Typ I Rezeptors (I). SARA bringt Smad2 in Position und die Phosphorylierung von Smad2 durch den Activin/Rezeptor-Komplex setzt es von SARA frei. Smad2 bindet Smad4 und der Komplex transferiert sich in den Nucleus, wo er FAST/FoxH und andere Transkriptionsfaktoren bindet, um die Transkription der auf Activin reagierenden Gene zu regulieren. Inhibin kann potentiell in die Activin Signalübertragung eingreifen, indem es Komplexe mit dem Activinrezeptor bildet; die geringe Affinität von Inhibin zu ActRII wird durch die Bindung zu Betaglycan (BG) verstärkt. Dieser Komplex aktiviert keine bekannte Signalkaskade. Es wird vorgeschlagen, dass die Bindung von Inhibin an den Inhibinrezeptor (InhBP) zur Aktivierung vom ActRI führt. Dieser Komplex könnte für die Initiierung der Inhibin-Antwort verantwortlich sein (136).

Es wurden jedoch noch weitaus komplexere Mechanismen als die Bindung von Betaglycan beschrieben. So wurden ein Faktor (p120 oder *Inhibin binding protein* (InhBP)) identifiziert (28), welcher die Funktion von Inhibin als Gegenspieler des Activins fördert, ohne tatsächlich an Inhibin zu binden (15). Das InhBP könnte auch als Inhibinrezeptor bezeichnet werden. Jedoch muss immer noch endgültig geklärt werden, ob Inhibin seine biologische Wirkung durch einen eigenen Rezeptor (d.h. entweder durch BG oder InhBP), oder durch kompetitive Hemmung (ActRII) anderer Mitglieder der TGF- β -Familie erreicht. Falls all diese Wege der Signalübertragung von Inhibin in

der Zelle existieren, würde dies bedeuten, dass Activin durch seinen Rezeptor zunächst mit einer spezifischen Signalübertragung beginnt, worauf eine spezifische biologische Antwort für Activine erfolgt. Inhibin kann die Activinantwort blockieren: entweder durch die Bindung an den Activinrezeptor oder durch die Bindung an Betaglycan, welches den Activinrezeptor blockiert. Zusätzlich bindet Inhibin an InhBP und aktiviert einen spezifischen Inhibin-Signalübertragungsweg, welcher eine spezifische Inhibinantwort hervor ruft (84,118). Es wurde zudem demonstriert, dass Inhibin auch BMP-Signalwege inhibieren kann, was eine weitere Wirkungsweise andeutet (178). Follistatine spielen ebenfalls als Bindungsproteine von Activinen und BMP-Signalwegen eine wichtige Rolle (127). Sie besitzen eine Schlüsselfunktion als Inhibitor von Activin (125).

1.2.3 Expression

Inhibine und Activine kommen in zahlreichen gesunden Geweben, aber auch in vielen endokrinen und anderen Tumoren vor: Tumoren von Ovar, Prostata, Hoden, Brust, Nebennieren, Hypophyse, Pankreas, Plazenta, Endometrium, Niere und Leber (136).

In gesundem Gewebe werden Inhibine und Activine unterschiedlich exprimiert. So wird in den Primärfollikeln, in den Granulosazellen des Ovars, Inhibin- α , Inhibin- β A und vorwiegend Inhibin- β B synthetisiert (57,140,184). Auch in Theka-Interna-Zellen wurde sowohl mRNA von Inhibin- α nachgewiesen, als auch eine positive Immunreaktivität dieser Untereinheit (94). Die Fähigkeit von Granulosazellen und Theka-Interna-Zellen, Inhibin- α zu produzieren geht mit der Beobachtung von erhöhten Spiegeln von Inhibin- α mRNA im Ovar und im Vergleich dazu niedrigeren Inhibin- β Untereinheiten einher (35,81). Ovarielle follikuläre Flüssigkeit enthält relativ gesehen mehr Inhibin- α - β als Inhibin- β - β Dimere, was die hemmende Wirkung der follikulären Flüssigkeit auf die FSH-Sekretion erklärt (171). Wie bereits erwähnt, wird die Inhibinproduktion der Granulosazellen von FSH reguliert. Zusätzlich zu FSH haben weitere Hormone und Wachstumsfaktoren die Funktion, die Inhibinproduktion zu beeinflussen. LH erhöht die Inhibinproduktion in Granulosazellen nach Besetzung des LH-Rezeptors (185). IGF-I und *vasoactive intestinal peptide*, die beide im Ovar zu finden sind, können die Inhibinproduktion stimulieren. Auch Östradiol könnte einen positiven intraovariellen Effekt auf die Inhibinproduktion ausüben, da es die Sekretion von immunoreaktivem Inhibin in hypophysectomierten Ratten stimuliert (16,81,191). In menschlichen Ovarien deckten Studien durch *in situ* Hybridisierung/Immunhistochemie auf, dass sowohl Inhibin und Activin als auch Follistatin in Theka-Interna-Zellen und Granulosazellen

synthetisiert werden können (141). Humane Theka-Zellen, die mit LH/IGF-I vorbehandelt waren, zeigten einen Zuwachs der Androgensynthese als Antwort zu Inhibin A, wohingegen Activin die Androgenproduktion hemmte (185). In Inhibin-behandelter Zellkultur wurde das relative Übergewicht von C₁₉Steroiden im Vergleich zu Progesteron als Hinweis auf die Stimulation von 17 α -Hydroxylase-Aktivität gewertet (55). Außerdem scheinen Androgene und Inhibine eine wechselseitige Interaktion mit signifikanter Steigerung der FSH-stimulierten Inhibinproduktion in humanen Granulosazellen *in vitro* durch Testosteron und Dihydrotestosteron, aber nicht durch Östrogen, zu bewirken (55).

Während des Menstruationszyklus werden Inhibine im Ovar und Endometrium unterschiedlich exprimiert. In der späten lutealen und frühen folliculären Phase steigen die FSH-Spiegel. Inhibin B im Serum steigt unter der FSH-Stimulation an, bis der negative Feedback-Mechanismus greift und die FSH-Spiegel vor der Ovulation wieder fallen. Der dominante Follikel, der nun auf LH reagieren kann, produziert mehr Inhibin A als Inhibin B. Nach der LH-Welle produziert das Corpus luteum Inhibin- α und Inhibin- β A- Untereinheiten, was sich in erhöhtem Inhibin A im Serum während der lutealen Phase des Zyklus widerspiegelt (136). Im Endometrium wurde eine zyklische Expression aller drei Inhibin-Untereinheiten festgestellt (103). Inhibin- α wurde primär in glandulären Epithelzellen während aller Phasen des Menstruationszyklus entdeckt. Die Inhibin- β -Untereinheiten kamen zusätzliche in Stromazellen vor und waren in der späten sekretorischen Phase höher als in der proliferativen und frühen sekretorischen Phase. Die unterschiedliche Expression im Endometrium weist deswegen auch auf eine wichtige Rolle von Inhibin- α bei humaner Implantation hin. Inhibin- β -Untereinheiten könnten dagegen durch autokrine/parakrine Signalwege die Reifung des Endometriums hinsichtlich Angiogenese, Dezidualisation und Gewebeumbau beeinflussen (103).

Wie bereits erwähnt, werden Inhibine in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert. Bei Frauen mit Ovarialkarzinom finden sich erhöhte Spiegel der Inhibine im Serum, besonders bei Granulosazelltumoren sind Inhibin A, Inhibin B, Inhibin-pro- α C signifikant erhöht (136). Auch andere geschlechtsspezifische Keimdrüsentumore beim Mann, einschließlich Sertolizell- und gemischte Sertolizell/Leydigzelltumore waren für Inhibin- α - und Inhibin- β A-Untereinheiten positiv (136). Fibrome und Thekazelltumore waren in der immunhistochemischen Färbereaktion für Inhibin- α positiv, jedoch nicht für die Inhibin- β A-Untereinheit. Klinisch konnte so immunhistochemisch zwischen Keimdrüsentumoren und anderen Tumoren wie z.B. endometrioiden Karzinomen unterschieden werden (64,83). Epithelzellkarzinome, die mit 90% die weitaus größte

Gruppe der Ovarialkarzinome repräsentieren, sind in seröse, muzinöse und endometrioiden Karzinome unterteilt. Untersuchungen zeigten, dass Serumspiegel von Inhibin- α durchweg bei 90% der postmenopausalen Frauen mit muzinösen Ovarialkarzinomen erhöht waren (143,144). Dimere Formen von Inhibin und Activin waren ebenfalls erhöht (69). Bei serösen Karzinomen, die mit 40% den häufigsten Ovarialtumor darstellen, wurde eine Immunaktivität von Inhibin- β A und Inhibin- β B durch Immunhistochemie bei über 70% der serösen Tumoren identifiziert (182,192). Im Gegensatz dazu stand die Inhibin- α Untereinheit, die kaum immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte (183)

Die Expression von Inhibin und Activin in der Prostata wurde an Ratten-Prostatagewebe untersucht (186). Alle drei Untereinheiten (Inhibin- α , Inhibin- β A und Inhibin- β B) wurden immunhistochemisch in gesundem Prostatagewebe nachgewiesen. Beim höhergradigen Prostatakarzinomen zeigte sich eine starke Expression von Inhibin- β A und Inhibin- β B (165), wohingegen die Inhibin- α -Untereinheit nicht mehr exprimiert war (93).

Bei Männern wurden die Hoden als wichtigster Ort der Inhibinproduktion lokalisiert (56). Inhibin B ist hauptsächlich im männlichen Blutkreislauf und in der Keimflüssigkeit zu finden (11,38). Die Inhibin- α und Inhibin- β B-Untereinheiten werden vorwiegend in den Sertolizellen des Hodens exprimiert, aber auch in Leydigzellen (12,14). Eine Immunaktivität von Activin A wurde in Keimplasma beobachtet und die Expression von Inhibin- β A wurde in Sertoli- und Leydigzellen lokalisiert (12). Bei Patienten mit Hodenkarzinomen, besonders Sertolizellentumoren, wurden erhöhte Plasmaspiegel von Inhibinen festgestellt (166).

Die drei Inhibin-Untereinheiten wurden auch immunhistochemisch in Epithelzellen von normalem Brustgewebe nachgewiesen (39). Diese Studie beschrieb außerdem eine reduzierte Expression aller Untereinheiten in benignen Neoplasien der Brust, wobei die Expression von Inhibin- α im Mammakarzinom sich weiter vermindert darstellte. Die Inhibin- β A- und Inhibin- β B-Expression wurde bei Mammakarzinomen verstärkt festgestellt (102).

In der Nebenniere wurde die Untereinheiten Inhibin- β A und Inhibin- β B exprimiert, was auf eine Synthese der Untereinheiten in diesem Organ hinwies (99). Frühe Untersuchungen entdeckten eine Inhibin- α -Immunreaktivität in hyperplastischem Gewebe und Nebennierenrindenneoplasien (36), was sich bei Patienten mit Nebennierenrindenneoplasien bestätigte (90,99). Dabei stellt die Inhibin- α -Immunreaktivität einen diagnostischen Marker dar, der zwischen

Nebennierenrindentumoren und histologisch ähnlichen Tumoren, wie z.B. dem Phäochromozytom sowie Leberzell- oder Nierenzellkarzinom differenzieren kann (136). Diese Rolle von Inhibin- α , bzw. die fehlende Expression der Inhibin- α -Untereinheit bei fortgeschritteneren Nebennierenrindenzellkarzinomen wird als eine Funktion in der malignen Tumorprogression diskutiert (99,136).

Immunreaktivität von Inhibin- α und Inhibin- β A wurde innerhalb FSH- und LH-sezernierenden Gonadotropinen der Hypophyse lokalisiert, wobei Immunaktivität von Inhibin- β A und den Activinrezeptoren (ActRIB und ActRII) in der Vorderhypophyse vorhanden war (139). Um die Expression der Inhibin-Untereinheiten in der neoplastischen Hypophyse zu bestimmen, wurde meist Gewebe oder Zellen aus Adenomen untersucht. Bei Hypophysenadenomen wurde mRNA für Inhibin- α und Inhibin- β B (nicht Inhibin- β A) und die Activinrezeptoren (ActRIA, ActRIIB und Varianten von ActRIB) gemessen (8).

Einen weiteren Ort der Inhibinexpression stellt das Pankreas dar. So wurde beim Pankreaskarzinom die Expression von Inhibin- β A festgestellt, jedoch keine Expression von Inhibin- α (67). Bei der kleineren Gruppe der Karzinome des exokrinen Pankreas wurde Inhibin- α hingegen exprimiert (134). Dabei handelt es sich um zystisch-muzinöse Pankreaskarzinome, die den muzinösen Ovarialkarzinomen nicht unähnlich sind, weswegen auch eine ähnlich verlaufende Tumorgenese unterstellt wurde (190).

In der Plazenta spielen Inhibine ebenfalls eine Rolle. Während einer Schwangerschaft sind die Spiegel von Inhibin A höher als während des normalen Menstruationszyklus; die Plazenta ist dann Quelle für Inhibine (136). Inhibin- α konnte in der Plazenta sowohl in Zytotrophoblasten als auch in Synzytiotrophoblasten immunhistochemisch lokalisiert werden (89,96,123). Allgemein kann gesagt werden, dass die immunhistochemische Färbereaktion von Inhibin- α in fast allen schwangerschaftsbedingten Trophoblastenläsionen (hydatide Mole, invasive Mole, Chorionkarzinom, trophoblastischer Tumor der Plazenta) beobachtet werden konnte (155).

Bei der Niere ergaben einige frühe Studien erhöhte Spiegel von Activin und Follistatin bei Patienten mit chronischem Nierenversagen (156). Adenokarzinome der Niere exprimierten die Inhibin- α -Untereinheit, wohingegen Nierenzellkarzinome negativ für Inhibin- α waren, was die Diagnose durch die Immunhistochemie erleichtern könnte (47). Wie bereits erwähnt, wurde in einigen Studien die Diagnose von Nebennierenrindenneoplasien durch die immunhistochemische Färbereaktion von Inhibin- α vorgeschlagen. Dabei war bei Nebennierenrindenneoplasien Inhibin- α positiv, für Nierenzellkarzinome und hepatozelluläre Karzinome überwiegend negativ (47). In

Granulosazellkarzinomen des Ovars wurden aber Foci hepatischer Zellen identifiziert, weil sie keine Expression für Inhibin- α aufwiesen (4). Deswegen könnte die immunhistochemische Färbereaktion von Inhibin- α auch hier von diagnostischem Nutzen sein, weil Leberkarzinome keine Inhibin- α -Immunreaktivität zeigten. Die Beobachtungen bei Inhibin-defizienten Mäusen spielen ebenfalls eine Rolle: Wie anfangs geschildert, entwickelten die Mäuse Keimdrüsentumoren mit nachfolgender Tumorkachexie (85). Dieses Syndrom war mit hepatozellulären Nekrosen um die Zentralvene assoziiert, was mit den vorhergehenden Berichten über die Effekte von erhöhtem Activin A in Ratten-Hepatozyten vereinbar war (152). Nachfolgende Studien bestätigten, dass die Tumorkachexie durch erhöhte Activin-Spiegel induziert werden konnte (30).

Wie schon erwähnt, werden Inhibine während des Menstruationszyklus unterschiedlich exprimiert (103). Durch Immunhistochemie konnten Inhibin- α , Inhibin- β A und Inhibin- β B in normalem Endometrium als auch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (61). Die Produktion von Inhibin A, Inhibin B und Activin A wurde in Epithel- und Stromazellen des Endometriums *in vitro* und in uterinen Spülzytologien festgestellt (122). Früh wurden auch schon signifikant erhöhte Activin-Spiegel in Flüssigkeit aus der Gebärmutter und dem Serum der Patientinnen mit endometrioidem Adenokarzinom gemessen, die nach der Operation wieder reduziert waren (122).

2 Fragestellungen

Ziele dieser Arbeit waren einerseits die immunhistochemische Evaluation der Expression der Inhibin- α -, Inhibin- β A- und Inhibin- β B-Untereinheiten und deren Verteilungsmuster im malignen Endometriumgewebe.

Außerdem stellte sich die Frage nach der Verwertbarkeit der Inhibin-Untereinheiten als Tumormarker beim endometrioiden Adenokarzinom. Hat die Expression der Inhibin/Activin-Untereinheiten einen Einfluss auf Prognose und Überleben?

3 Material und Methoden

3.1 Das Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial

Grundlage der vorliegenden Arbeit waren Krankenakten und malignes Endometriumgewebe aus archivierten Gewebeblöcken von 302 Patientinnen, die zwischen 1990 und 2002 an der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Gynäkologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München behandelt worden waren. Die Frauen hatten eine Hysterektomie oder Kürettage erhalten, wobei Patientinnen mit einem endometrioiden Adenokarzinom eine modifizierte radikale Hysterektomie, eine Adnexektomie oder eine selektive pelvine Lymphadenektomie, ohne oder mit paraaortaler Lymphadenektomie erhielten. Lymphknotenbiopsien wurden bei allen Patientinnen mit tiefer myometrialer Infiltration und/oder schlecht differenzierten oder besonders aggressiven histologischen Eigenschaften vorgenommen.

Adipositas, höheres Lebensalter und ausgeprägte Nebenbefunde waren für die nicht exakte chirurgische Beurteilung verantwortlich.

Außerdem konnte auf die Datenbank des Tumorzentrums München zurückgegriffen werden. Das Tumorzentrum München registriert Basisdaten der betroffenen Patientinnen einschließlich demographischer Daten, Diagnose, weiterer Erkrankungen (z.B. Adipositas, Diabetes mellitus, Arterielle Hypertension) und Informationen über die Behandlung aller Patientinnen, die in der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Gynäkologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München behandelt worden waren. Archivierte Daten und verfügbarer Akten wurden zu jeder Patientin kontrolliert, um die Diagnose nochmals zu verifizieren und gegebenenfalls radiologische oder pathologische Befunde im Falle eines Erkrankungsrezidiv einzusehen. Die Patientendaten wurden anonym analysiert. Alle Krankheitsfälle waren durch radiologische Befunde oder durch Biopsien gesichert worden. Lediglich Patientinnen die an ihrer Erkrankung verstarben, wurden als unzensiert angesehen; die Akten der Patientinnen, die im Anschluss lebten oder nicht an ihrer Erkrankung (oder damit verbunden Ursachen) verstorben waren, wurden als zensiert eingestuft. Außerdem wurden Fälle, bei denen die exakte Todesursache unbekannt war, aber die Patientinnen innerhalb von zwei Jahren nach Diagnosestellung an Metastasen verstarben, als zensiert eingestuft.

Zum Vergleich wurde vorab in einer vorläufigen Untersuchung außerdem humanes Endometriumgewebe von 193 Patientinnen untersucht. Das normale humane

Endometrium wurde von prämenopausalen, nicht-schwangeren Patientinnen entnommen, die auf Grund einer benignen Erkrankung des Uterus, hauptsächlich einem uterinen Leiomyom, eine Hysterektomie oder Kürettage erhalten hatten. Alle Frauen hatten einen normalen und regelmäßigen Menstruationszyklus ohne eine hormonelle Behandlung drei Wochen vor dem chirurgischen Eingriff erhalten zu haben. Alle hyperplastischen Endometriumproben wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Endometriumproben wurden nach anamnestischen und histologischen Kriterien in proliferative (Tag 1 bis 14; n=27), frühe sekretorische (Tag 15 bis 22; n=10) und späte sekretorische Phase (Tag 23 bis 28; n=9) eingeteilt. Zusätzlich wurden 8 Gewebeproben von atrophischem Endometrium postmenopausaler Frauen untersucht, die sich einer Hysterektomie oder einer Kürettage auf Grund einer benignen Erkrankung, hauptsächlich einem urogenitalen Prolaps, unterzogen hatten.

3.1.1 Tumorhistologie

Im Rahmen dieser Untersuchung erfolgte eine Überprüfung aller HE-Gewebeschnitte mit maligner Tumorhistologie in Bezug auf Diagnose, histologischem Zelltyp, Differenzierungsgrad, FIGO-Stadium, Lymphangiosis und Hämangiosis durch einen Gynäkologen/Pathologen (Naim Shabani und Doris Mayr) (158). Frauen mit einem Uterussarkom wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt.

Die pathologische Tumorklassifikation und die Bestimmung des histologischen Zelltyps erfolgte bei jeder Patientin nach den FIGO-Kriterien von 1988 (1).

Die histologische Klassifikation der endometrioiden Adenokarzinome wurde nach Richtlinien der World Health Organisation in unterschiedliche Differenzierungsgrade in „gut differenziert“ (G1; n = 160), „mäßig differenziert“ (G2; n = 80) und „schlecht differenziert“ (G3; n = 51) eingeteilt.

3.2 Immunhistochemie

Es wurden je 10 Schnitte a 2 µm Dicke sowohl mit repräsentativem Tumorgewebe aus den 301 Gewebelöcken als auch mit normalen Endometrium der 193 Patientinnen und mit den 8 atrophischen Gewebeproben mit dem Schlittenmikrotom (ehemals Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland; heute Leica Microsystems GmbH Nussloch, Deutschland) angefertigt und nach Glättung im Streckbad in 45°C warmen Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) auf speziell für die Immunhistochemie

beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland) aufgezogen. Zur besseren Anhaftung wurden die Schnitte zusätzlich zur Beschichtung über Nacht bei 56-58°C im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) aufgetrocknet. Nun wurde zunächst eine Hämatoxylin-Eosin-Kontrolle angefertigt und die restlichen Schnitte bis zur immunhistochemischen Färbung in Objektträgermappen aufbewahrt.

Für jede Färbereihe wurde eine Positivkontrolle in Form von histologischen Schnitten von prämenopausalen Ovarialgewebe mitgeführt, wobei spezifisch Theka- und Granulosazellen angefärbt wurden.

3.2.1 Verwendete Primärantikörper

Für den immunhistochemischen Nachweis der Inhibin/ Activin- Untereinheiten im Tumormaterial wurden Primärantikörper gegen folgende Epitope verwendet:

- Anti Human Inhibin Alpha; Klon R1 (mouse IgG2a); Firma: Serotec; Bestellnummer: MCA951S; Verdünnung 1:50
- Anti Human Inhibin Beta A; Klon E4 (mouse IgG2a); Firma Serotec; Bestellnummer: MCA950S; Verdünnung 1:50
- Anti Human Inhibin Beta B; Klon C5 (mouse IgG2a); Firma: Serotec; Bestellnummer MCA1661; Verdünnung 1:10

Die Verdünnung der Primärantikörper war bei 2 bis 10 µg/ml festgelegt.

3.2.2 Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskops (Leica, Solms, Deutschland) durch zwei unabhängige Begutachter, einschließlich eines Gynäkologen und Pathologen (Naim Shabani.) Zunächst wurde das Tumorgewebe bei Lupenvergrößerung (10-fach) aufgesucht und anschließend bei stärkerer Vergrößerung (25-fach) beurteilt. Mitgeführte Positiv- und Negativkontrollen aus jeder Färbereihe bestätigten die immunhistochemische Färbereaktion.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte nach dem immunoreaktiven Score (IRS) von Remmele und Stegner (133). Der genannte Semiquantitative immunoreaktive Score berücksichtigt die Parameter Färbeintensität (Staining Intensity = SI) und den Prozentsatz der immunhistochemisch positiven Zellen (PP) und wird aus dem Produkt beider Parameter errechnet.

Die Färbeintensität (SI) wird wie folgt unterteilt:

- 0 = keine Färbereaktion
- 1 = schwache Färbereaktion
- 2 = mäßige Färbereaktion
- 3 = starke Färbereaktion

Der Prozentsatz positiver Zellen (PP) wird eingeteilt in:

- 0 = keine positiven Zellen
- 1 = < 10% positive Zellen
- 2 = 10-50% positive Zellen
- 3 = 51-80% positive Zellen
- 4 = > 80% positive Zellen

Durch Multiplikation beider Parameter kann der IRS – Score einen Wert zwischen 0 und einem Maximalwert von 12 annehmen.

Die Auswertung der Ergebnisse ergab folgende Expressionsgrade:

- 0 = keine Expression
- 1 – 3 = geringe Expression
- 2 – 8 = mäßige Expression
- 9 -12 = starke Expression

Mit Hilfe einer digitalen Kamera (Olympus, Tokyo, Japan) konnten Abbildungen gemacht werden. Der IRS-Score von sowohl Inhibin- α , Inhibin- β A und Inhibin- β B beim Endometriumkarzinom wurde anhand des Kruskal-Wallis-Tests nach Rangwerten (65) verglichen. Der Mann-Whitney Rangsummen-Test wurde genutzt, um die Mittelwerte der Färbeintensität (SI) zu vergleichen. Die Signifikanz der Unterschiede wurde bei einem p-Wert von <0,05 beidseitig festgelegt.

3.2.3 Streptavidin-Biotin-Methode

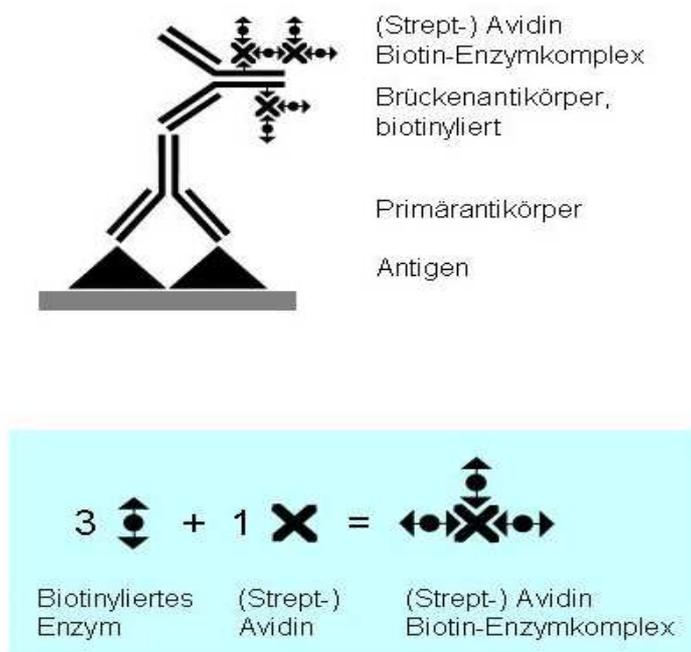
Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) basiert auf der Affinität von Avidin zu Biotin.

Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glycoprotein (Tetramer) mit einem Molekulargewicht von 68kDa (114). Es hat vier Bindungsstellen für Biotin. Da es teilweise zu unspezifischen Reaktionen bei der Verwendung von Avidin kommt, wurde auf gentechnischem Weg ein reineres Produkt gewonnen. Dieses Produkt heißt Streptavidin und wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert. Für die ABC-Methode verwendet man einen Brückenantikörper, der biotinyliert ist, das heißt mit Biotin markiert wurde.

Bei Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin der Gruppe B, das sich gut an einen Brückenantikörper koppeln lässt und somit die Verbindung zum ABC-Komplex herstellt. Es wird dabei ein Multi-Link-Antikörper benutzt. Dabei handelt es sich um eine Lösung, die sich aus Brückenantikörpern verschiedener Tierspezies (z.B. Maus, Kaninchen, etc.) zusammensetzt.

An den biotinierten Brückenantikörper bindet sich der Avidin-Biotin-Komplex (**Abbildung 3**). Der Komplex wird so produziert, dass an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ein Molekül Biotin gebunden wird. An den Komplex ist ein Enzym gekoppelt, nämlich in diesem Fall die Peroxidase.

Abbildung 3 (114) :



Das Enzym Peroxidase für die Konjugation eines Komplexes wird aus der Wurzel des Meerrettichs gewonnen und hat ein Molekulargewicht von 40 kDa. Endogene

Peroxidase findet sich hauptsächlich in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten, weniger in Dünndarmgewebe und in Nervenzellen. Es kommt zu einer Farbreaktion, indem das Enzym Peroxidase mit dem Substratpuffer H_2O_2 als Katalysator und dem jeweiligen Chromogen (DAB) ein farbiges Endprodukt bildet. Im Falle von DAB ist dieses in organischen Lösungsmitteln unlöslich (114).

3.2.4 Verfahren

Die Detektion der monoklonalen Primärantikörper erfolgte mit Hilfe der Streptavidin-Biotin-Methode. Es wurde das Detektionssystem Vectastain Elite mouse-IgG-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) verwendet.

3.2.5 Fixierung und Entparaffinierung

Die Paraffinschnitte wurden zunächst für 15 Minuten in Xylol (J. T. Baker, Deventer, Holland) entparaffiniert und anschließend je 2 mal 2 Minuten in 100%igen Ethanol (Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität München, München, Deutschland) gespült. Die endogene Peroxidase (Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität München, München, Deutschland) wurde durch 20-minütiges Einwirken in 3%igem H_2O_2 in Methanol (= 3 ml 30%iges H_2O_2 + 97 ml Methanol) blockiert. Im Folgenden wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe von 100%igen, 96%igen und 70%igem Ethanol durch zweimaliges 2-minütiges Spülen rehydriert und Ethanolreste mit Aqua dest. heraus gewaschen.

3.2.6 Antigendemaskierung im Schnellkochtopf

Zur Darstellung bestimmter Antigene ist es unumgänglich eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung vorzunehmen. Durch diese Art der Antigenmaskierung können Antikörper auch Epitope erkennen, die zuvor durch Aldehydvernetzung maskiert waren.

Die durch Formalin verursachte Proteinvernetzung wird durch das Erhitzen der Schnitte in einer kalziumpräzipitierenden Lösung (Citrat-Puffer pH 6,0) wieder aufgehoben (114):

Die Antigenmaskierung erfolgte durch Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf mit einem Na-Citratpuffer; pH 6,0. Der Dampfkochtopf wurde mit Puffer gefüllt und die Platte auf 12 gestellt. Nach 7 Minuten fing der Puffer an zu kochen und die Schnitte wurden eingestellt, der Deckel verschlossen, und nach 4 Minuten konnte die Herdplatte

auf 4 heruntergeregelt werden. Nach weiteren 5 Minuten wurde der Topf in ein Wasserbecken gestellt und konnte langsam abdampfen. Nach Öffnen des Deckels wurde vorsichtig Leitungswasser zum Puffer laufen gelassen. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua. dest gespült und 2 mal 2 Minuten in PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewaschen.

3.2.7 Immunhistochemische Färbung

Das Blockierserum wurde mit einer Einwirkzeit von 20 Minuten aufgetragen und danach wieder abgeschüttet.

Das Blockierserum sättigt elektrostatische Ladungen im Gewebe ab und verhindert, dass Immunoglobuline sich durch hydrophobe Bindungen unspezifisch an Membranen oder Fettgewebe binden; somit wird eine unspezifische Anfärbung verhindert.

Anschließend wurde der Primärantikörper mit einer Einwirkzeit von 120 Minuten aufgetragen, dann 2 mal 2 Minuten in PBS gewaschen. Nun wurde der Sekundärantikörper für 30 Minuten Einwirkzeit aufgetragen und anschließend wieder 2 mal 2 Minuten in PBS gewaschen. Im Folgenden wurde der ABC-Komplex (Einwirkzeit 30 Minuten) aufgetragen und in PBS gewaschen (2 mal 2 Minuten).

Die Substratfärbung erfolgte mit DAB (Dako North America, Carinteria, USA) für 8-10 Minuten, danach wurden die Schnitte 2 mal 2 Minuten in Aqua dest. gewaschen.

Die Substrat-Chromogen-Reaktion kann nicht unterscheiden, ob die Peroxidase endogen, d.h. im Gewebe lokalisiert ist, oder ob sie nachträglich zugegeben wurde (ABC-System mit Peroxidase). Um endogene Peroxidase außer Kraft zu setzen, werden die Schnitte in H_2O_2 inkubiert. Erschienen Erythrozyten nach der immunhistochemischen Färbung farblos, war die Blockierung erfolgreich.

Das Chromogen kann mit Hilfe des Substratpuffers und des Katalysators H_2O_2 folgenden Farbkomplex bilden:

DAB (3,3 Diaminobenzidin)

- braunes Farbprodukt
- in organischen Lösungsmitteln unlöslich
- kann die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol durchlaufen und mit Einschlussmittel eingedeckt werden
- Gegenfärbung: saures Hämalaun nach Mayer

Anschließend wurden die Präparate mit saurem Hämalaun (Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Deutschland) nach Mayer mit einem pH von 4,5 für 2 Minuten gegengefärbt und danach 5 Minuten in Leitungswasser gebläut.

Bei diesem pH-Wert werden nur die Kerne gefärbt, da nur sie noch eine negative Ladung haben. Dabei lagern sich die positiv geladenen basischen Farbstoffionen an die negativ geladene Phosphatgruppe der DNA im Kern an.

Das Auswaschen und Bläuen erfolgt in Leitungswasser in alkalischem Milieu.

Zum Schluss wurden die fertig gefärbten Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%igen, 96%igem und 100%igem Ethanol) dehydriert und anschließend erfolgte die Aufhellung in Carbolxylol (Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Deutschland) und Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland). Die Präparate wurden zum Schluss zur Haltbarmachung mit Einschlussmittel „Consul-Mount“ (Shandon, Pittsburgh, USA) eingedeckt. Für das Einschlussmittel gilt, dass es den gleichen Brechungsindex wie Glas haben muss, damit die Färbung nicht beeinflusst wird.

Negativkontrollen wurde ermittelt, indem der Primärantikörper durch normales *Mausserum* in der gleichen Lösung, die für die Inhibin-Detektion verwendet wurde, ersetzt wurde.

Positive Zellen zeigten eine bräunliche Färbereaktion, die Negativkontrollen so wie ungefärbte Zellen waren blau.

3.2.8 Chemikalien und Lösungsansätze

- Na-Citratpuffer-Gebrauchslösung: 18ml Lösung A + 82ml Lösung B + 900ml Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Lösung A: 21.01g 0,1M Zitronensäure (Merck#244, Darmstadt, Deutschland)) + 1l Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Lösung B: 29, 41g 0,1M Na-Citrat (Merck #6448, Darmstadt, Deutschland) + 1l Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Vectatain Elite mouse-IgG-Kit:
 - Blockierserum = 3 Tropfen Normalserum auf 10 ml steriles PBS

Sekundärantikörper = biotinierter Link-Antikörper, der den ABC-Komplex bindet = 3 Tropfen Normalserum + 1 Tropfen Antimouse-Ig (blaue Flasche) + 10 ml PBS

- ABC-Komplex = Ansetzten aus 4 Tropfen Reagenz A + 4 Tropfen Reagenz B + 10ml steriles PBS (die Lösung muss 30 Minuten vor Gebrauch ruhen)
- DAB (3,3 Diaminobenzidin) = 2 Tropfen Pufferkonzentrat + 2 Tropfen DAB Chromogen + 2 ml Aqua dest.

3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Jeweils ein Gewebeschnitt wurde zunächst im Xylolbad für 15 Minuten entparaffiniert und danach in einer absteigenden Alkoholreihe durch jeweils zweimaliges kurzes Eintauchen der Gewebeschnitte in 100%igem, 70%igem und 50%igem Alkohol rehydriert und anschließend mit Aqua dest. gespült. Im Folgenden wurden die Schnitte für 8 Minuten in eine Hämalaun-Lösung (Apotheke Klinikum Innenstadt Ludwig-Maximilian-Universität München, München, Deutschland) gestellt, dann für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Präparate für 5 Minuten in eine Eosin-Lösung (Chroma Gesellschaft, Köngen, Deutschland) getaucht und die Farbe kurz mit Leitungswasser ausgespült. Dann folgte die Dehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe von 70%igem zu 100%igem Alkohol und endete mit dem Eintauchen in Carbolxylol und Xylol. Am Ende wurden die fertig gefärbten Präparate mit Hilfe eines Einschlussmittels „Consul-Mount“ (Shandon, Pittsnurgh, USA) und Deckgläsern (R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland) eingedeckt.

Diese Färbemethode erzeugt eine blaue Kernfärbung durch die Hämalaun-Lösung nach Mayer und eine rote Zytoplasmafärbung durch die Eosin-Lösung.

3.4 Statistik

Für die statistische Überlebensanalyse wurden Inhibin/Activin-Untereinheiten erhöht betrachtet, wenn die immunhistochemische Färbereaktion der Gewebeprobe höher als der Median aller Gewebeproben war (Median: 0 = Inhibin- α , 4 = Inhibin- β A, 6 = Inhibin- β B) . Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Vierfeldertest und dem exakten Test nach Fisher wurde die steigende/positive immunhistochemische Färbereaktion gegen die nicht steigende/negative immunhistochemische Färbung verglichen.

Die analysierten Ergebnisvariablen bei malignem Endometrium waren das metastasenfremie Überleben, das tumorabhängige Überleben und das Gesamtüberleben.

Mit der Kaplan-Meier Überlebenskurve wurde die eindimensionale Analyse durchgeführt. So wurde das Überleben eingeschätzt (62) und mittels des Log-Rang-Test (193) verglichen. Prognostische Modelle nutzten die multivariate Cox-Regressionsanalyse (194) für die multivariaten Überlebensanalysen. Die Variablen wurden schrittweise eingegeben (32). Für die Cox-Regressionsanalyse wurden Daten betreffend Alter, FIGO-Stadium, WHO-Einteilung, Lymphknotenbeteiligung, Lymphangiosis, Hämangiosis, ungünstige Histologie (endometrioide versus serös/klarzellige Karzinome), arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, anti-Hormon Therapie und Radiotherapie berücksichtigt. Die Lymphknotenbeteiligung wurde als kategorische Variable eingegeben. Sie wurde folgendermaßen definiert: keine Lymphknotenbeteiligung, positive Lymphknoten, unbekannter Status.

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerstatistikprogramms SPSS für Windows® (Social Sciences computer software version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Die Signifikanz der Unterschiede wurden bei einem p-Wert von $<0,05$ beidseitig festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Klinisch-Pathologische Aspekte

Tabelle 2a und 2b gibt einen Überblick über sämtliche klinisch-pathologischen Eigenschaften der ausgewerteten Endometriumkarzinome.

Tabelle 2a: Klinisch-pathologische Eigenschaften der ausgewerteten Endometriumkarzinome

| | | Gesamt (n=302) | Endometrioide Adenokarzinome | | |
|--------------------------|-----------|-------------------|------------------------------|----------------|-----------------|
| | | | endometrioid (n=221) | muzinös (n=14) | gemischt (n=34) |
| Alter (Jahre) | < 65 | 156 (51.7%) | 114 (51.6%) | 7 (50%) | 21 (61.8%) |
| | > 65 | 146 (48.3%) | 107 (48.4%) | 7 (50%) | 13 (38.2%) |
| Differenzierung (WHO) | Grad 1 | 160 (54.6%) | 138 (62.4%) | 10 (71.4%) | 11 (32.4%) |
| | Grad 2 | 80 (27.3%) | 58 (26.2%) | 4 (28.5%) | 14 (41.2%) |
| | Grad 3 | 51 (17.4%) | 25 (11.3%) | 0 (0%) | 9 (26.5%) |
| FIGO Stadium | FIGO I | 225 (74.5%) | 176 (79.6%) | 12 (85.7%) | 19 (55.9%) |
| | FIGO II | 22 (7.3%) | 15 (6.8%) | 0 (0%) | 4 (11.8%) |
| | FIGO III | 46 (15.2%) | 22 (10%) | 2 (14.3%) | 11 (32.3%) |
| | FIGO IV | 9 (3.0%) | 8 (3.6%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Lymphknoten- Status | negativ | 193 (63.9%) | 145 (65.6%) | 9 (64.3%) | 17 (50%) |
| | positiv | 25 (8.3%) | 13 (5.9%) | 1 (7.1%) | 6 (17.6%) |
| | unbekannt | 84 (27.8%) | 63 (28.5%) | 4 (28.6%) | 11 (32.4%) |
| Lymphangiosis | negativ | 272 (90.1%) | 202 (91.4%) | 13 (92.9%) | 29 (85.3%) |
| | positiv | 30 (9.9%) | 19 (8.6%) | 1 (7.1%) | 5 (14.7%) |
| Hämangiosis | negativ | 294 (97.4%) | 215 (97.3%) | 14 (100%) | 33 (97.1%) |
| | positiv | 8 (2.8%) | 6 (2.7%) | 0 (0%) | 1 (2.9%) |
| Diabetes | negativ | 268 (88.7%) | 193 (87.3%) | 14 (100%) | 32 (94.1%) |
| | positiv | 34 (11.3%) | 28 (12.7%) | 0 (0%) | 2 (5.9%) |
| Adipositas | negativ | 198 (65.6%) | 139 (62.9%) | 8 (57.1%) | 27 (79.4%) |
| | positiv | 104 (34.4%) | 82 (37.1%) | 6 (42.9%) | 7 (20.6%) |
| Hypertonie | negativ | 183 (60.6%) | 129 (58.4%) | 5 (35.7%) | 26 (76.5%) |
| | positiv | 119 (39.4%) | 92 (41.6%) | 9 (64.3%) | 8 (23.5%) |
| Radiotherapie | negativ | 177 (58.6%) | 136 (61.5%) | 9 (64.3%) | 13 (38.2%) |
| | positiv | 119 (39.4%) | 79 (35.7%) | 5 (35.7%) | 21 (61.8%) |
| | abgelehnt | 6 (2.0%) | 6 (2.7%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Anti-Hormon- Therapie | negativ | 293 (97.0) | 216 (97.7%) | 14 (100%) | 32 (94.1%) |
| | positiv | 9 (3.0%) | 5 (2.3%) | 0 (0%) | 2 (11.3%) |
| | abgelehnt | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

Tabelle 2b: Klinisch-pathologische Eigenschaften der ausgewerteten Endometriumkarzinome

| | | nicht-endometrioides Karzinome | | |
|------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|-----------------------|
| | | serös (n=22) | klarzellig (n=6) | undifferenziert (n=5) |
| Alter (Jahre) | < 65 | 7 (31.8%) | 4 (66.7%) | 3 (60%) |
| | > 65 | 15 (68.2%) | 2 (33.3%) | 2 (40%) |
| Differenzierung (WHO) | Grad 1 | 5 (22.7%) | 1 (16.7%) | 0 (0%) |
| | Grad 2 | 5 (22.7%) | 2 (33.3%) | 0 (0%) |
| | Grad 3 | 12 (54.5%) | 3 (50%) | 5 (100%) |
| FIGO Stadium | FIGO I | 13 (59.1%) | 2 (33.3%) | 3 (60%) |
| | FIGO II | 0 (0%) | 3 (50%) | 0 (0%) |
| | FIGO III | 8 (36.4%) | 1 (16.7%) | 2 (40%) |
| | FIGO IV | 1 (4.5%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Lymphknoten-Status | negativ | 15 (68.2%) | 5 (83.3%) | 2 (40%) |
| | positiv | 3 (13.6%) | 1 (16.7%) | 1 (20%) |
| | unbekannt | 4 (18.2%) | 0 (0%) | 2 (40%) |
| Lymphangiosis | negativ | 19 (86.4%) | 6 (100%) | 3 (60%) |
| | positiv | 3 (13.6%) | 0 (0%) | 2 (40%) |
| Hämangiosis | negativ | 22 (100%) | 6 (100%) | 4 (80%) |
| | positiv | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (20%) |
| Diabetes | negativ | 20 (90.9%) | 6 (100%) | 3 (60%) |
| | positiv | 2 (9.1%) | 0 (0%) | 2 (40%) |
| Adipositas | negativ | 15 (68.2%) | 6 (100%) | 3 (60%) |
| | positiv | 7 (31.8%) | 0 (0%) | 2 (40%) |
| Hypertension | negativ | 16 (72.7%) | 5 (83.3%) | 2 (40%) |
| | positiv | 6 (27.3%) | 1 (16.7%) | 3 (60%) |
| Radiotherapie | negativ | 14 (61.5%) | 4 (66.7%) | 1 (20%) |
| | positiv | 8 (36.4%) | 2 (33.3%) | 4 (80%) |
| | abgelehnt | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Anti-Hormon-Therapie | negativ | 20 (90.9%) | 6 (100%) | 5 (100%) |
| | positiv | 2 (9.1%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| | abgelehnt | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

4.1.1 Alter bei Diagnose

Das mediane Alter der Patientinnen bei Diagnose betrug 64,5 Jahren. Bei einer Spannweite von 52,4 Jahren reichte das Alter der Patientinnen von 35,5 bis 87,9 Jahre.

4.1.2 Tumorstadium

Mit insgesamt 225 Fällen (74,5%) befand sich die Mehrzahl der Patientinnen im FIGO-Stadium I. Bei 22 Patientinnen (7,3%) wurde das Stadium II, bei 46 (15,2%) Patientinnen das Stadium III und bei 9 (3%) das Stadium IV (Metastasen) diagnostiziert.

4.1.3 Tumorhistologie

269 (87,7%) Patientinnen der 302 analysierten Gewebeschnitten hatten eine endometrioide Tumorhistologie. Unter den histologischen Subtypen war das endometrioide Adenokarzinom mit 221 Fällen (83,4%) das häufigste gefolgt von 33 (12,3%) serösen, klarzelligen oder undifferenzierten Karzinomen. 5,3% waren vom muzinösen Typ und 12,8% zählten zu den gemischten Endometriumkarzinomen nach WHO-Klassifikation der Tumoren des Corpus Uteri (1994).

Lymphknotenbiopsien wurden bei allen Patientinnen mit tiefer Myometriuminfiltration und/oder schlecht differenzierten oder aggressiven histologischen Eigenschaften durchgeführt. So wurden Biopsien aus pelvinen und/oder paraaortalen Lymphknoten bei 218 Patientinnen (72,2%) durchgeführt, wobei 25 Patientinnen (11,5%) Lymphknotenmetastasen aufwiesen.

Eine Lymphangiosis carcinomatosa war in 30 Fällen (9,9%) vorhanden. In 272 Fällen (90,1%) konnte keine Lymphangiosis carcinomatosa nachgewiesen werden.

Eine Hämangiosis carcinomatosa konnte in 8 Fällen (2,8%) identifiziert werden. Nicht nachweisbar war die Hämangiosis carcinomatosa in 294 Fällen (97,4%).

4.2 Erkrankungs- und Überlebensstatus

Bei 84 Patientinnen (27,8%) konnte aus verschiedenen Gründen wie einem niedrigen FIGO-Stadium (FIGO Ia), Adipositas, höherem Lebensalter und weiteren Erkrankungen keine komplette chirurgische Stadieneinteilung vorgenommen werden

Weniger als die Hälfte der Frauen waren mit 104 Fällen (34,4%) adipös. An einem Diabetes Mellitus Typ 2 litten 34 Patientinnen (11,3%); an einer arteriellen Hypertonie waren 119 Patientinnen (39,4%) erkrankt.

119 der 302 analysierten Patientinnen (39,4%) erhielten eine Radiotherapie, wobei sechs Patientinnen (2%) die empfohlene Radiotherapie ablehnten. Eine Anti-Hormon Behandlung erhielten neun Patientinnen (3%).

40 Patientinnen (13,2%) waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung am Endometriumkarzinom verstorben.

4.3 Auswertung der Gewebeschnitte

Die Ergebnisse der Immunhistochemie der Endometriumkarzinomschnitte sind in **Tabelle 3a und 3b** zusammengefasst.

4.3.1 Inhibin-alpha in normalem und malignem Endometrium

Inhibin- α -, Inhibin- β A- und Inhibin- β B-Untereinheiten wurden in normalem Endometrium nachgewiesen und waren hauptsächlich in glandulären und luminalen Epithel lokalisiert, was frühere Ergebnisse bestätigte (103,106,107). Inhibin- α zeigte keine oder nur minimale Expression während der proliferativen Phase (**Abbildung 4a**). Die Expression stieg im Verlauf des Menstruationszyklus an (**Abbildungen 4b und 4c**).

Eine positive immunhistochemische Färbereaktion für Inhibin-alpha wurde bei 71 Patientinnen (23,5%) aus 302 Gewebeproben mit Endometriumkarzinom beobachtet (**Abbildung 4 d und 4e**). Eine positive Reaktion lag vor, wenn etwas 10% der Zellen eine schwache bis moderate Färbeintensität aufwiesen. Es zeigte sich jedoch eine geringere immunhistochemischen Färbeintensität als bei normalem Endometrium (**Abbildungen 4d und 4e**). Schlecht differenzierte Karzinome (G3) zeigten keine Inhibin-alpha Immunreaktion (**Abbildung 4f**).

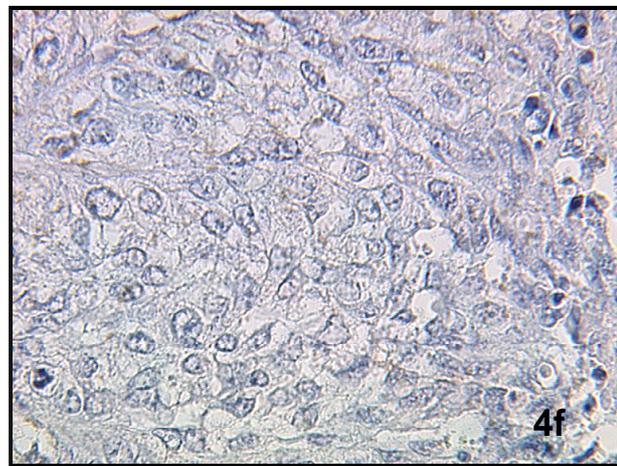
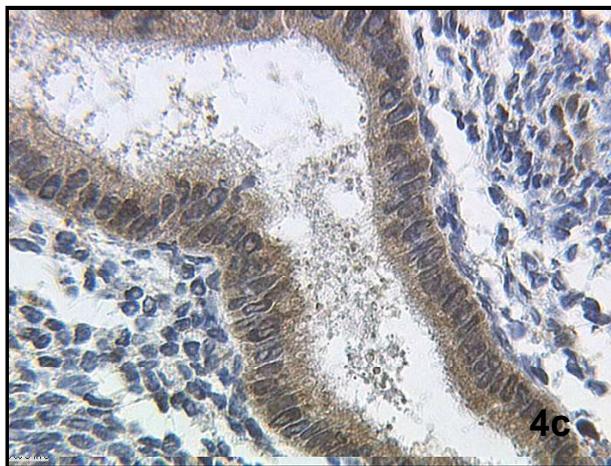
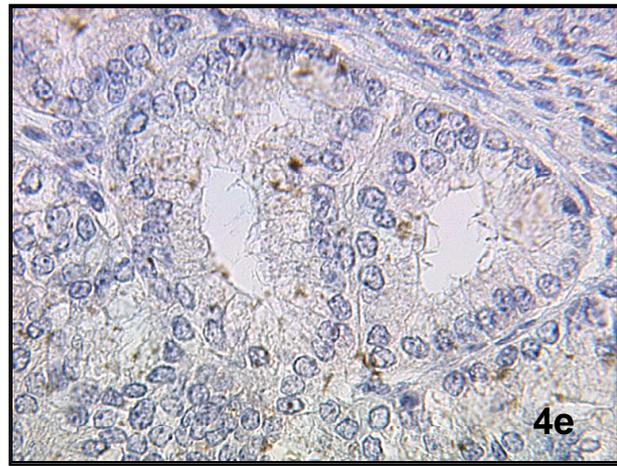
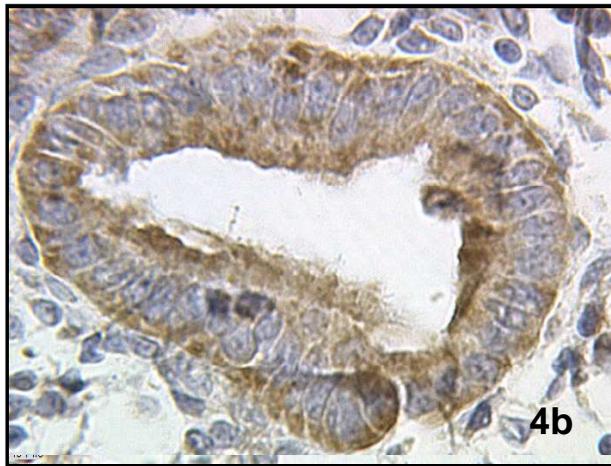
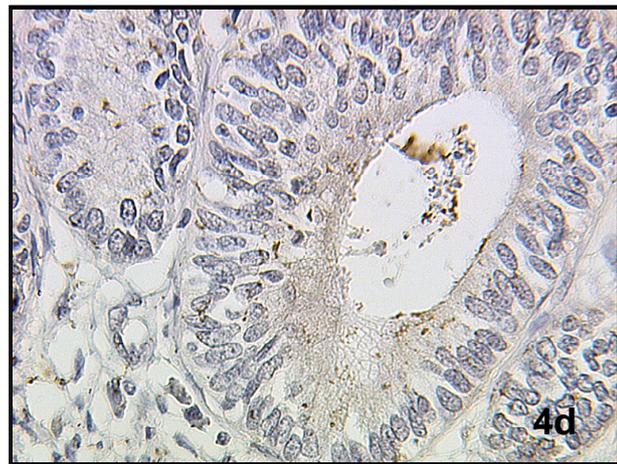
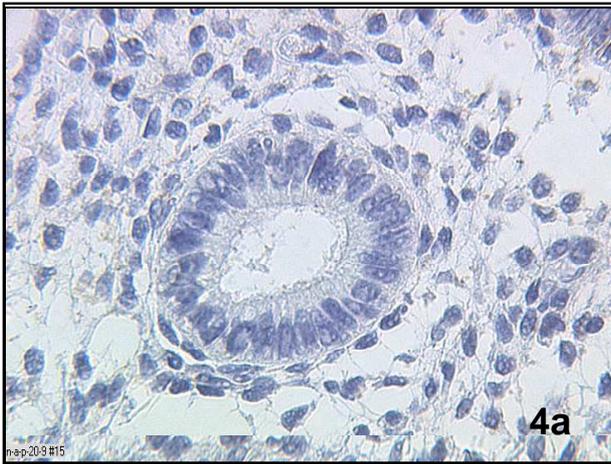


Abbildung 4a bis 4f: Expression von Inhibin- α in normalem und malignem humanem Endometriumgewebe. Inhibin- α zeigte eine minimale bis moderate Expression während der proliferativen Phase (4a), die während des Menstruationszyklus aber zunahm (4b bis 4c). Inhibin- α zeigte eine minimale bis moderate Expression in gut differenziertem (G1) Endometriumkarzinom (4d bis 4e) wohingegen schlecht differenzierte Karzinome keine Inh- α -Immunreaktion zeigten (4f) Vergrößerung x250.

Die immunhistochemische Expression von Inhibin- α war während der frühen sekretorischen ($p < 0.05$) und späten sekretorischen Phase ($p < 0.001$) signifikant höher im Vergleich zu proliferativen Endometrium (**Abbildung 5**).

Bei endometrioiden Adenokarzinomen wurde eine kontinuierliche Abnahme der Inhibin- α -Expression von G1 und G2-Karzinomen zu G3-Karzinomen beobachtet (jeweils $p < 0.05$) (**Abbildung 5**). Atrophisches Endometriumgewebe zeigte eine signifikante Abnahme im Vergleich zur frühen sekretorischen ($p < 0.05$) und späten sekretorischen Phase ($p < 0.01$).

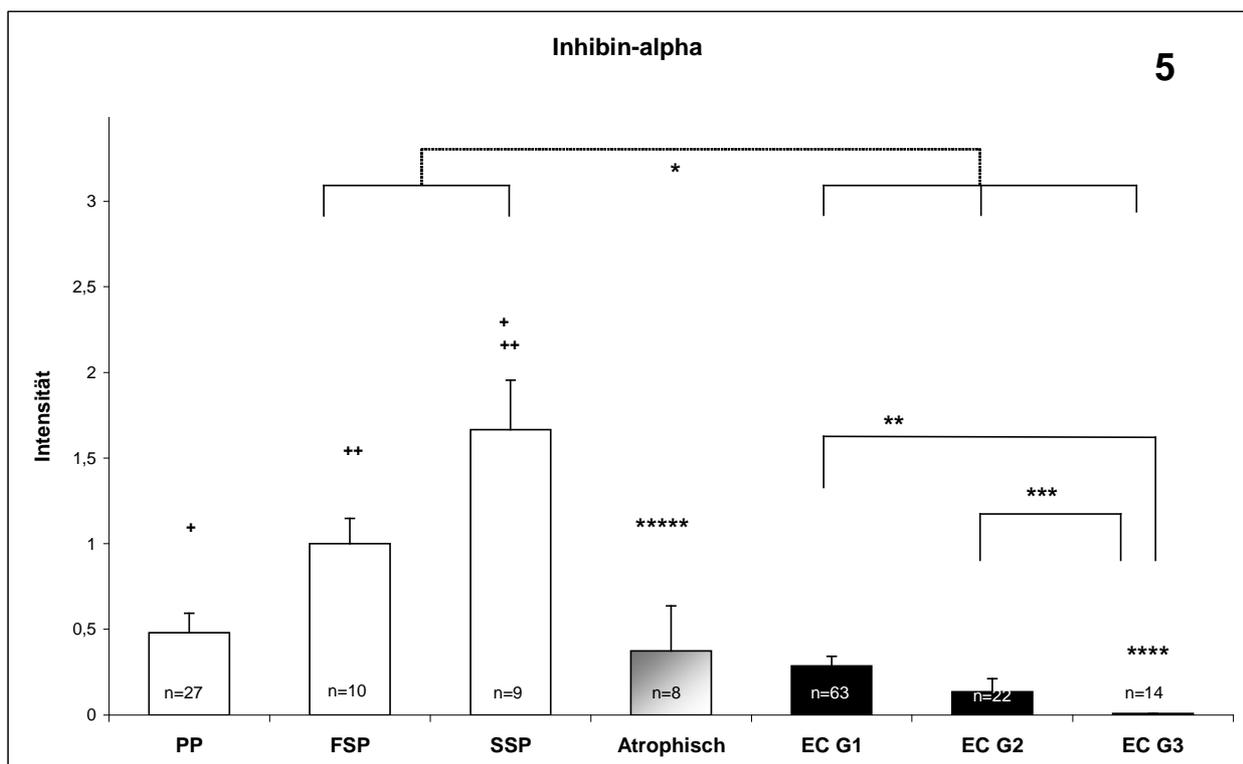


Abbildung 5: Inhibin- α in humanem Endometriumgewebe. Die immunhistochemische Expression von Inhibin- α war während frühen sekretorischen (FSP; $p < 0.05$) und späten sekretorischen Phase (SSP; $p < 0.001$) signifikant höher als in der proliferativen Phase (PP). Schlecht differenzierte Endometriumkarzinome (EC) G3 zeigten keine Inhibin- α -Expression, und war aus dem Grund signifikant niedriger im Vergleich zu allen anderen analysierten Gruppen (****). Eine kontinuierliche Abnahme wurde von EC G1 bis EC G3 ($**p < 0.05$) und EC G2 bis EC G3 ($***p < 0.05$) beobachtet. Atrophisches Endometriumgewebe (*****) zeigte eine signifikante Abnahme im Vergleich zu FSP ($p < 0.05$) und SSP ($p < 0.01$), was mehr als EC G3 war, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0.56$).

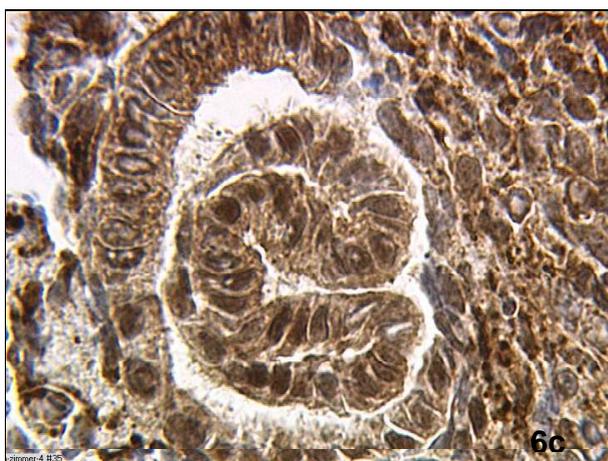
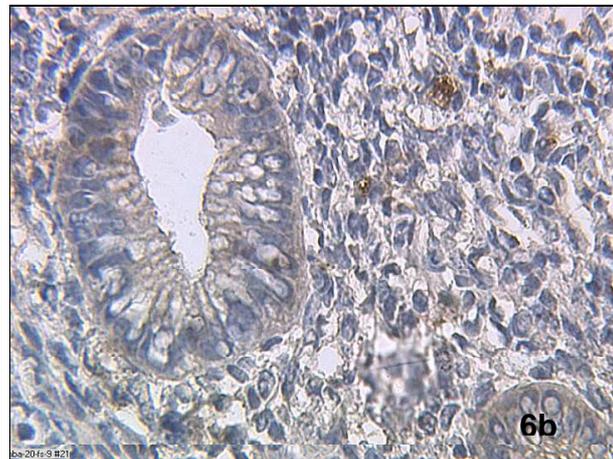
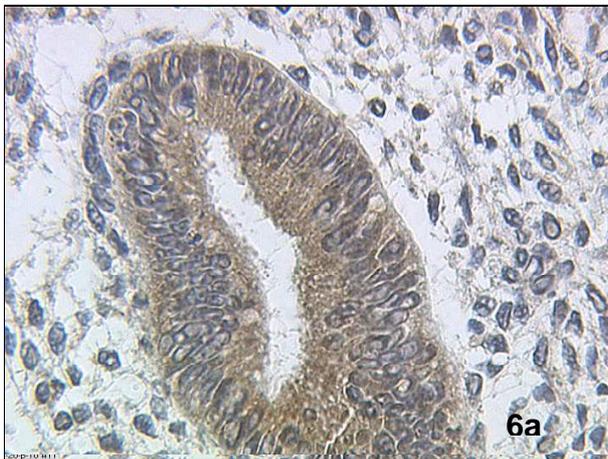
Zu den Abbildungen 5, 8 und 9: Die Angaben sind Mittelwert +/- Standardabweichung. Signifikanz wird bei einem p-Wert von $p < 0.05$ (Sterne) angegeben. PP=proliferative Phase; FSP=frühe sekretorische Phase; SSP=späte sekretorische Phase; EC=endometrioides Adenokarzinom

Es wurde kein signifikanter Unterschied der Inhibin-alpha Expression zwischen den einzelnen Subtypen des Endometriumkarzinoms gefunden (Kruskal-Wallis $p=0,793$). Die Expression von Inhibin- α im Endometriumkarzinom wies eine signifikante Assoziation zu Patientenalter ($p<0,01$), Differenzierungsgrad ($p<0,001$), FIGO-Stadium ($p<0,001$), Lymphknotenstatus ($p<0,05$) und Diabetes mellitus Typ2 ($p<0,01$) auf, was an Hand des Chi-Quadrat-Vierfeldertest (**Tabelle 4**) beurteilt werden konnte.

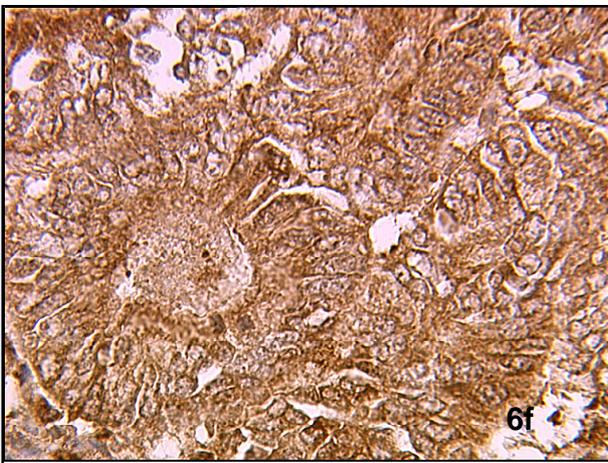
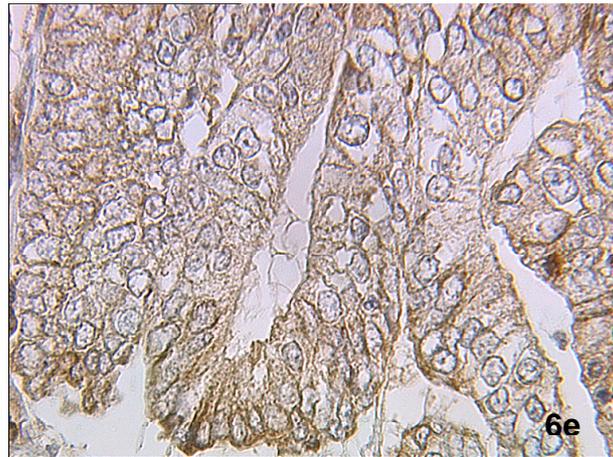
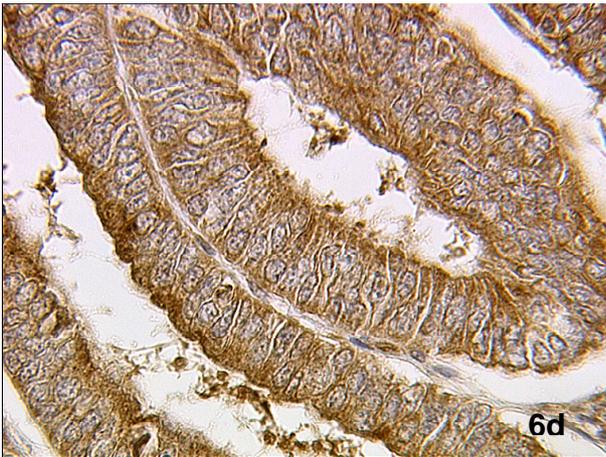
4.3.2 Inhibin-betaA und -betaB in normalem und malignem Endometrium

In normalem Endometrium wurde die Inhibin- β A-Untereinheit ebenfalls exprimiert (**Abbildungen 6a bis 6c**), wobei sich in der späten sekretorischen Phase die stärkste Färbeintensität auftrat (**Abbildung 6c**).

Endometrioide Adenokarzinom waren für Inhibin- β A positiv (**Abbildungen 6d bis 6f**).

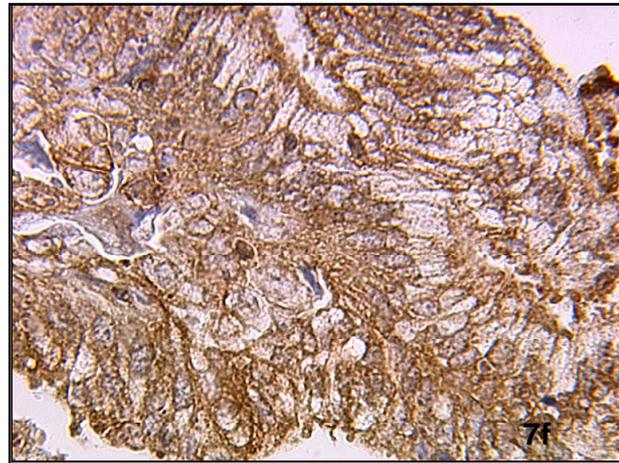
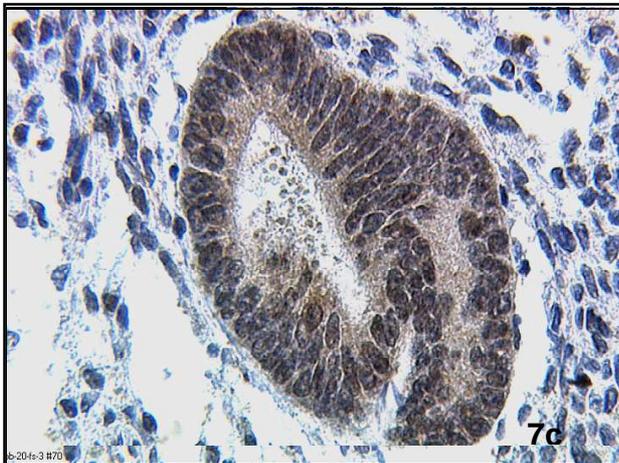
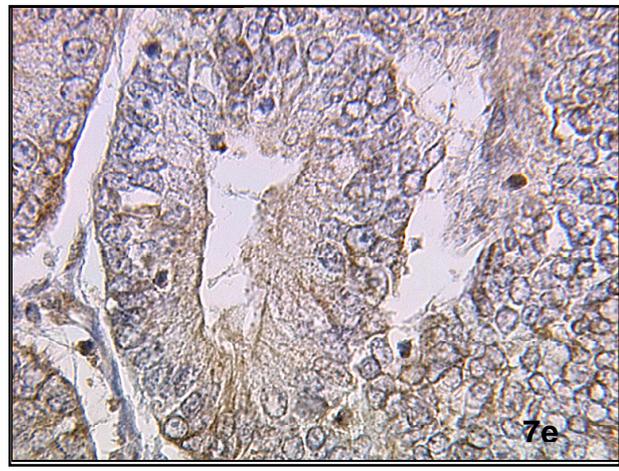
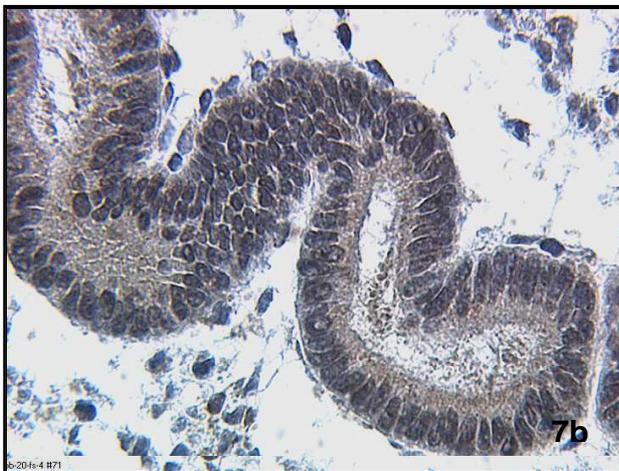
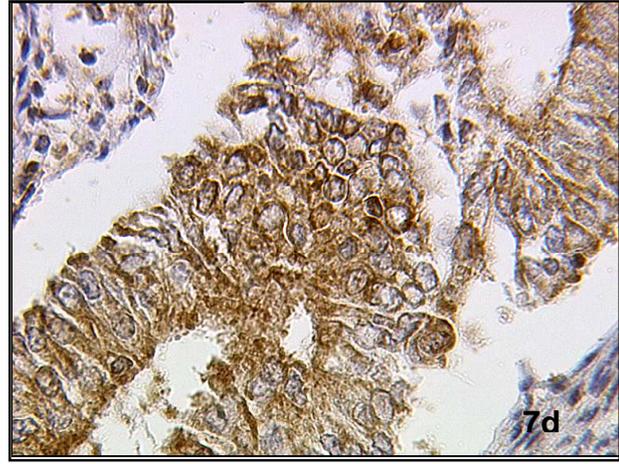
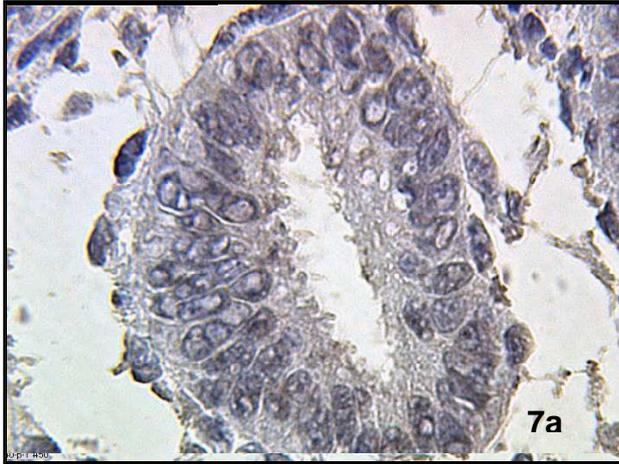


Abbildungen 6a bis 6c: Expression von Inhibin- β A in normalem humanem Endometrium. In normalem Endometrium wurde die Inhibin- β A-Untereinheit exprimiert (6a bis 6c), wobei in der späten sekretorischen Phase die Färbeintensität am stärksten war (6c). Vergrößerung x250.



Abbildungen 6d bis 6f: Expression von Inhibin- β A in malignem Endometrium. Endometrioides Adenokarzinome waren positiv für Inhibin- β A (6d bis 6f), Vergrößerung x250.

Die positive immunhistochemische Färbereaktion wurden für die Inhibin- β B-Untereinheit sowohl für normales, als auch für malignes Endometrium beobachtet (**Abbildungen 7a bis 7f**), wobei eine stärkere Färbeintensität bei endometrioiden Adenokarzinomen G2 und G3 zu beobachten war (**Abbildungen 7e und 7f**). Es konnte eine positive immunhistochemische Färbereaktion von Inhibin- β A (**Abbildung 6d bis 6f**) und Inhibin- β B (**Abbildung 7d bis 7f**) in 296 Fällen je Untereinheit beobachtet werden.



Abbildungen 7a bis 7f: Die Expression von Inhibin-βB in normalem und malignem humanem Endometrium: Inhibin-βB wurde in normalem und malignem Endometrium exprimiert (7a-7f), wobei in G2 und G3 endometrioiden Adenokarzinomen eine stärkere Färbeintensität zu beobachten war (7e und 7f), Vergrößerung x250.

Die Immunhistochemische Expression von Inhibin-βA war in der späten sekretorischen Phase signifikant höher im Vergleich zur proliferativen und frühen sekretorischen Phase (jeweils $p < 0.005$). In der späten sekretorischen Phase war die Inhibin-βA-Expression am höchsten im Vergleich zu endometrioiden Adenokarzinomen (**Abbildung 8**).

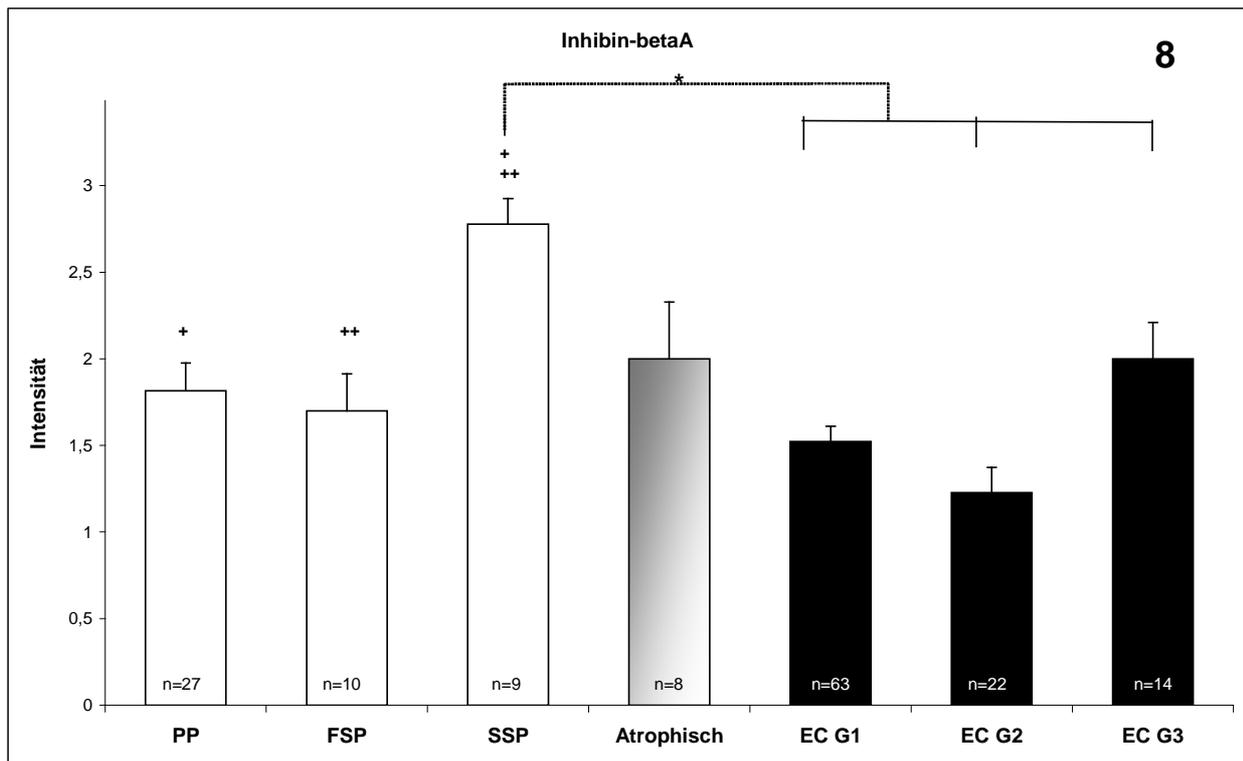


Abbildung 8: Inhibin-βB in humanem Endometriumgewebe. Die immunhistochemische Expression von Inhibin-βA war während der SSP signifikant höher als in der PP ($p < 0.005$) und FSP ($p < 0.005$). Inhibin-βA-Expression war am stärksten in SSP-Endometrium, wobei sie signifikant höher als im endometrioiden Adenokarzinom war ($p < 0.001$ in EC G1 und EC G2; (* $p < 0.05$ für EC G3). Obwohl eine Zunahme der immunhistochemischen Färbereaktion von EC G1 zu EC G3 beobachtet werden konnte, wurde keine statistische Signifikanz festgestellt. Die Angaben sind Mittelwert +/- Standardabweichung. Signifikanz wird bei einem p-Wert von $p < 0.05$ (Sterne) angegeben. PP=proliferative Phase; FSP=frühe sekretorische Phase; SSP=späte sekretorische Phase; EC=endometrioides Adenokarzinom

Inhibin-βB wurde ebenfalls in humanem Endometriumgewebe exprimiert (Abbildung 9). Die Expression von Inhibin-βB war in der späten sekretorischen Phase höher als in der proliferativen und frühen sekretorischen Phase, jedoch ohne eine statistische Signifikanz. Eine Zunahme der immunhistochemischen Färbereaktion wurde von G2- zu G3-Adenokarzinomen beobachtet ($p < 0.05$). Zusätzlich war eine signifikant geringere Inhibin-βB-Expression in atrophischem Endometriumgewebe zu beobachten als in der späten sekretorischen Phase ($p < 0.05$) (**Abbildung 9**).

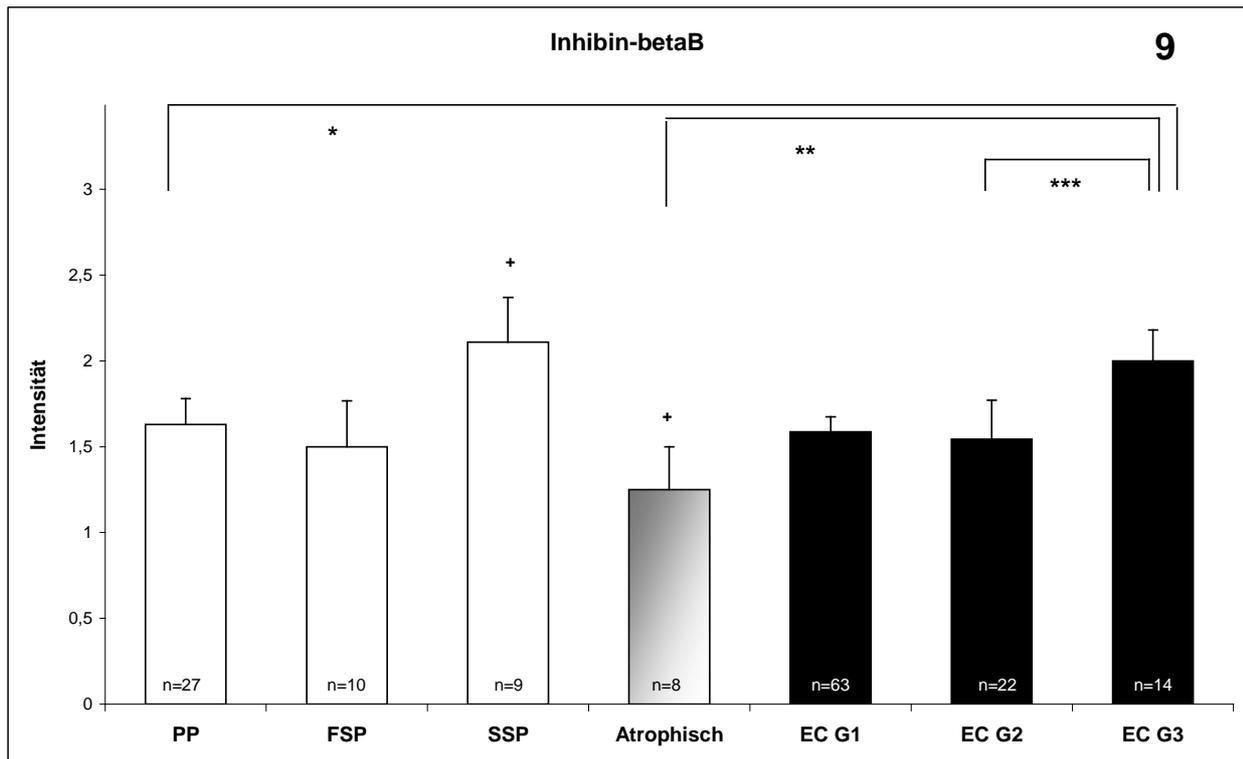


Abbildung 9: Inhibin-βB in humanem Endometriumgewebe. Die immunhistochemische Expression von Inhibin-βB war während SSP höher als in PP und FSP, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Färbeintensität von Inhibin-βB war signifikant niedriger in PP ($*p < 0.05$) und atrophischen Endometriumgewebe ($**p < 0.05$) im Vergleich zu EC G3. Eine Zunahme der immunhistochemischen Färbereaktion war von EC G2 bis EC G3 zu beobachten ($***p < 0.05$). Außerdem zeigte atrophisches Endometriumgewebe eine signifikant niedrigere Expression von Inhibin-βB als SSP ($+p < 0.05$). Die Angaben sind Mittelwert +/- Standardabweichung. Signifikanz wird bei einem p-Wert von $p < 0.05$ (Sterne) angegeben. PP=proliferative Phase; FSP=frühe sekretorische Phase; SSP=späte sekretorische Phase; EC=endometrioides Adenokarzinom

Signifikante Unterschiede in ihrer Immunreaktivität wurden bei beiden beta-Untereinheiten unter den verschiedenen Subtypen des Endometriumkarzinoms bewiesen (Kruskal-Wallis $p=0,007$ und $p<0,001$ für jeweils Inhibin- β A und Inhibin- β B). Durch die Analyse einer negativen oder positiven Expression, wie im IRS-Score als über oder unter dem Median definiert, konnte auch ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen beobachtet werden (Chi-Quadrat-Test: entsprechend $p<0,05$ und $p<0,01$). Außerdem zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression von Inhibin- β A und Inhibin- β B und Differenzierungsgrad (Chi-Quadrat-Test: jeweils $p<0,05$) (**Tabelle 4**). Es wurde zudem eine signifikante Korrelation zwischen den einzelnen Inhibin- β A und Inhibin- β B-Untereinheiten beobachtet (Spearman test: $p<0,001$).

Tabelle 3a: Zusammenfassung der immunhistochemischen Analyse der Endometriumkarzinome.

| | | Total (n=302) | Endometrioide Adenokarzinome (n=265) | | |
|----------------------|-----------------------|---------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------|
| | | | Endometrioid (n=221) | Muzinös (n=14) | gemischt (n=34) |
| Inhibin-alpha | Median | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mittelwert+/- SEM | 0.47+/-0.06 | 0.48+/-0.67 | 0.43+/-0.25 | 0.41+/-0.18 |
| | negativ | 231 (76.5%) | 166 (75.1%) | 11 (78.6%) | 28 (82.4%) |
| | positiv | 71 (23.5%) | 55 (24.9%) | 3 (21.4%) | 6 (17.6%) |
| | <i>Kruskal-Wallis</i> | 0.793 | | | |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | 0.733 | | | |
| Inhibin-betaA | Median | 4 | 4 | 4 | 8 |
| | Mittelwert+/- SEM | 6.43+/-0.18 | 6.29+/-0.21 | 4.79+/-0.63 | 6.76+/-0.43 |
| | negativ | 154 (51.0%) | 120 (54.3%) | 10 (71.4%) | 13 (38.2%) |
| | positiv | 148 (49.0%) | 101 (45.7%) | 4 (28.6%) | 21 (61.8%) |
| | <i>Kruskal-Wallis</i> | 0.007 | | | |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | 0.024 | | | |
| Inhibin-betaB | Median | 6 | 4 | 5 | 4 |
| | Mittelwert+/- SEM | 6.31/-0.2 | 6.26+/-0.23 | 5,14+/-0,69 | 6,56+/-0,56 |
| | negativ | 161 (53,3%) | 120 (54,3%) | 10 (71,4%) | 22 (64,7%) |
| | positiv | 141 (46,7%) | 101 (45,7%) | 4 (28,6%) | 12 (35,3%) |
| | <i>Kruskal-Wallis</i> | <0.001 | | | |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | <0.001 | | | |

Tabelle 3b: Zusammenfassung der immunhistochemischen Analyse der Endometriumkarzinome

| Nicht endometrioiden Karzinome (n=37) | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------|--------------|------------------|-----------------------|
| | | serös (n=22) | klarzellig (n=6) | undifferenziert (n=5) |
| Inhibin-alpha | Median | 0 | 0 | 0 |
| | Mittelwert+/-SEM | 0.55+/-0.24 | 0.67+/-0.67 | 0+/-0 |
| | negativ | 16 (72.7%) | 5 (83.3%) | 5 (100%) |
| | positiv | 6 (27.3%) | 1 (16.7%) | 0 (0%) |
| | <i>Kruskal-Wallis</i> | | | |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | | |
| Inhibin-betaA | Median | 8 | 4 | 8 |
| | Mittelwert+/-SEM | 8.36+/-0.69 | 5.17+/-1.72 | 8+/-1.265 |
| | negativ | 6 (27.3%) | 4 (66.7%) | 1 (80%) |
| | positiv | 16 (72.7%) | 2 (33.3%) | 4 (20%) |
| | <i>Kruskal-Wallis</i> | | | |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | | |
| Inhibin-betaB | Median | 8 | 2 | 8 |
| | Mittelwert+/-SEM | 9,23+/-0,62 | 3.17+/-1,05 | 8+/-0 |
| | negativ | 4 (18,2%) | 5 (83.3%) | 0 (0%) |
| | positiv | 18 (81.8%) | 1 (16.7%) | 5 (100%) |
| | <i>Kruskal-Wallis</i> | | | |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | | |

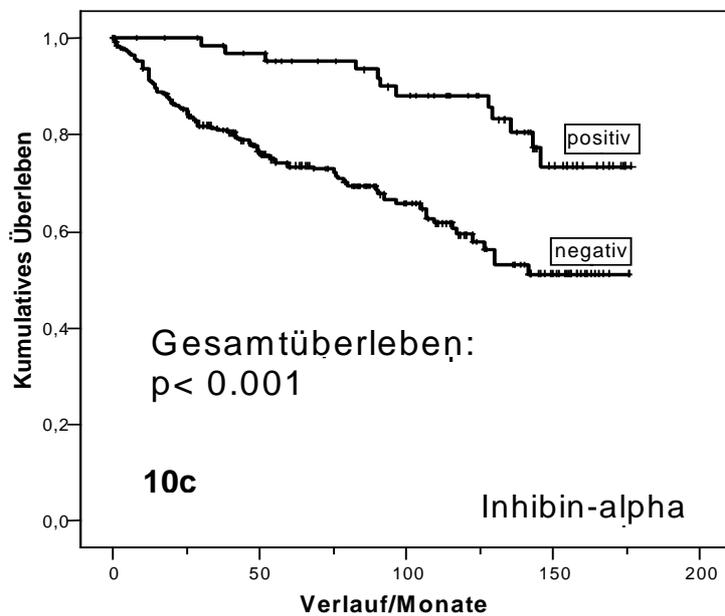
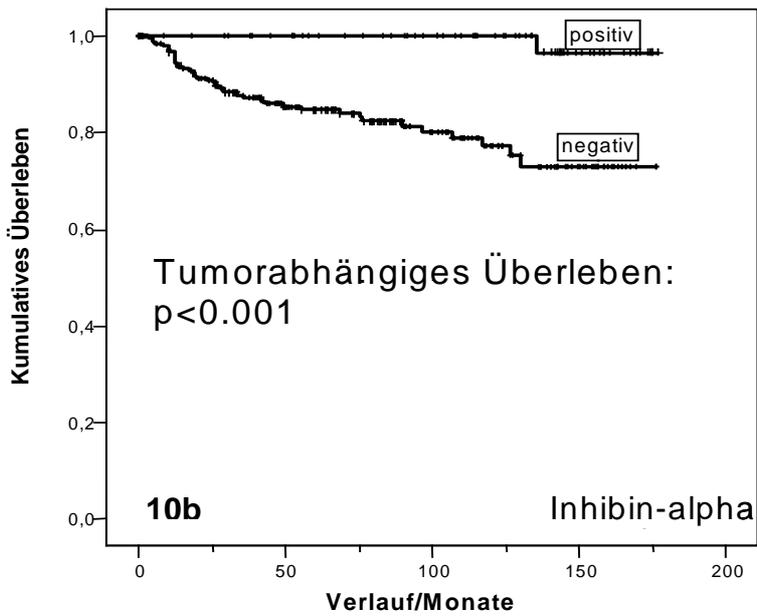
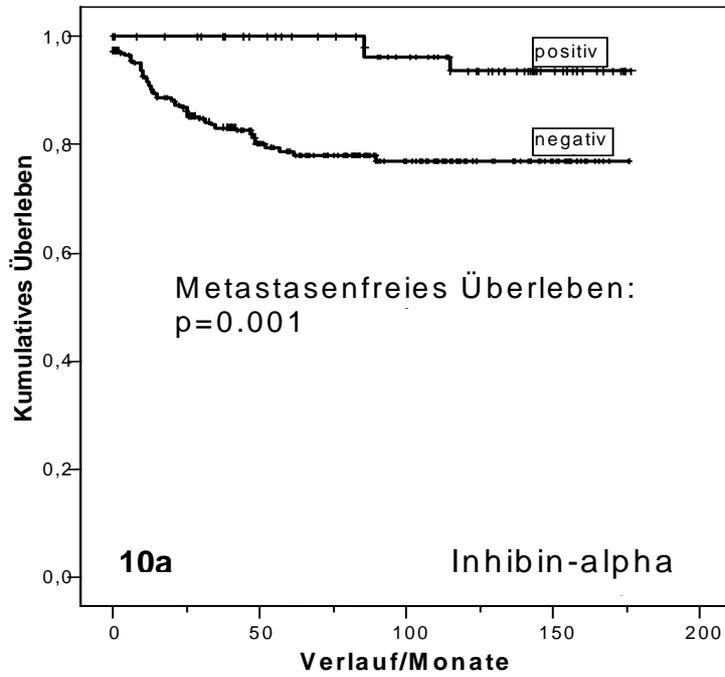
Tabelle 4: Eindimensionale statistische Analyse von Inhibin- α , - β A, - β B nach den verschiedenen klinisch-pathologischen Eigenschaften. N.S. = nicht signifikant.

| | | Gesamt (n=302) | Inhibin-alpha | Inhibin-betaA | Inhibin-betaB |
|------------------------------|--------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Alter (Jahre) | < 65 | 156 (51.7%) | 47 (30.1%) | 71 (45.5%) | 75 (48.1%) |
| | > 65 | 146 (48.3%) | 24 (16.4%) | 77 (52.8%) | 66 (45.2%) |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | 0.006 | N.S. | N.S. |
| Differenzierung (WHO) | Grad 1 + 2 | 248 (82.1%) | 68 (27.4%) | 114 (46.0%) | 108 (43.5%) |
| | Grad 3 | 54 (17.9%) | 3 (5.6%) | 34 (63.0%) | 33 (61.3%) |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | < 0.001 | 0.025 | 0.024 |
| FIGO Stadium | FIGO I + II | 247 (81.8%) | 68 (27.5%) | 119 (48.2%) | 111 (44.9%) |
| | FIGO III + IV | 55 (18.2%) | 3 (5.5%) | 29 (52.7%) | 30 (54.5%) |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | < 0.001 | N.S. | N.S. |
| Histologie | Endometrioid | 265 (87.7%) | 63 (23.8%) | 123 (48.0%) | 116 (42.8%) |
| | Nicht-endometrioid | 37 (12.3%) | 8 (21.5%) | 25 (67.6%) | 25 (67.6%) |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | N.S. | 0.022 | 0.008 |
| Lymphknoten-Status | negativ | 193 (63.9%) | 52 (26.4%) | 93 (48.2%) | 89 (46.1%) |
| | positiv | 25 (8.3%) | 1 (0.04%) | 13 (52%) | 13 (52%) |
| | unbekannt | 84 (27.8%) | 18 (21.4%) | 42 (50%) | 39 (46.4%) |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | 0.034 | N.S. | N.S. |
| Lymphangiosis | negativ | 272 (90.1%) | 68 (25%) | 135 (50.7%) | 123 (45.2%) |
| | positiv | 30 (9.9%) | 3 (10%) | 13 (43.3%) | 18 (60%) |

| | | | | | |
|---------------------------------|--------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> |
| Hämangiosis | negativ | 294 (97.4%) | 71 (24.1%) | 144 (49%) | 137 (46.6%) |
| | positiv | 8 (2.6%) | 0 (0%) | 4 (50%) | 4 (50%) |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> |
| Diabetes | negativ | 268 (88.7%) | 69 (25.4%) | 134 (50%) | 124 (46.3%) |
| | positiv | 34 (11.3%) | 2 (5.9%) | 14 (41.2%) | 17 (50%) |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | <i>0.009</i> | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> |
| Adipositas | negativ | 198 (65.5%) | 49 (24.7%) | 98 (49.5%) | 98 (49.5%) |
| | positiv | 104 (34.4%) | 22 (21.5%) | 50 (48.1%) | 43 (41.3%) |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> |
| Hypertonie | negativ | 183 (60.6%) | 50 (27.3%) | 96 (52.4%) | 93 (50.8%) |
| | positiv | 119 (39.4%) | 21 (17.6%) | 52 (43.7%) | 48 (40.3%) |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> |
| Radiotherapie | negativ | 183 (60.6%) | 46 (25.1%) | 92 (50.3%) | 84 (45.9%) |
| | positiv | 119 (39.4%) | 25 (21.9%) | 56 (47.1%) | 57 (47.9%) |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> |
| Anti-Hormon therapie | negativ | 293 (97.0) | 68 (23.2%) | 144 (49.1%) | 136 (46.4%) |
| | positiv | 9 (3.0%) | 5 (55.6%) | 4 (44.4%) | 5 (55.6%) |
| | <i>Chi-Quadrat</i> | | <i>0.036</i> | <i>N.S.</i> | <i>N.S.</i> |

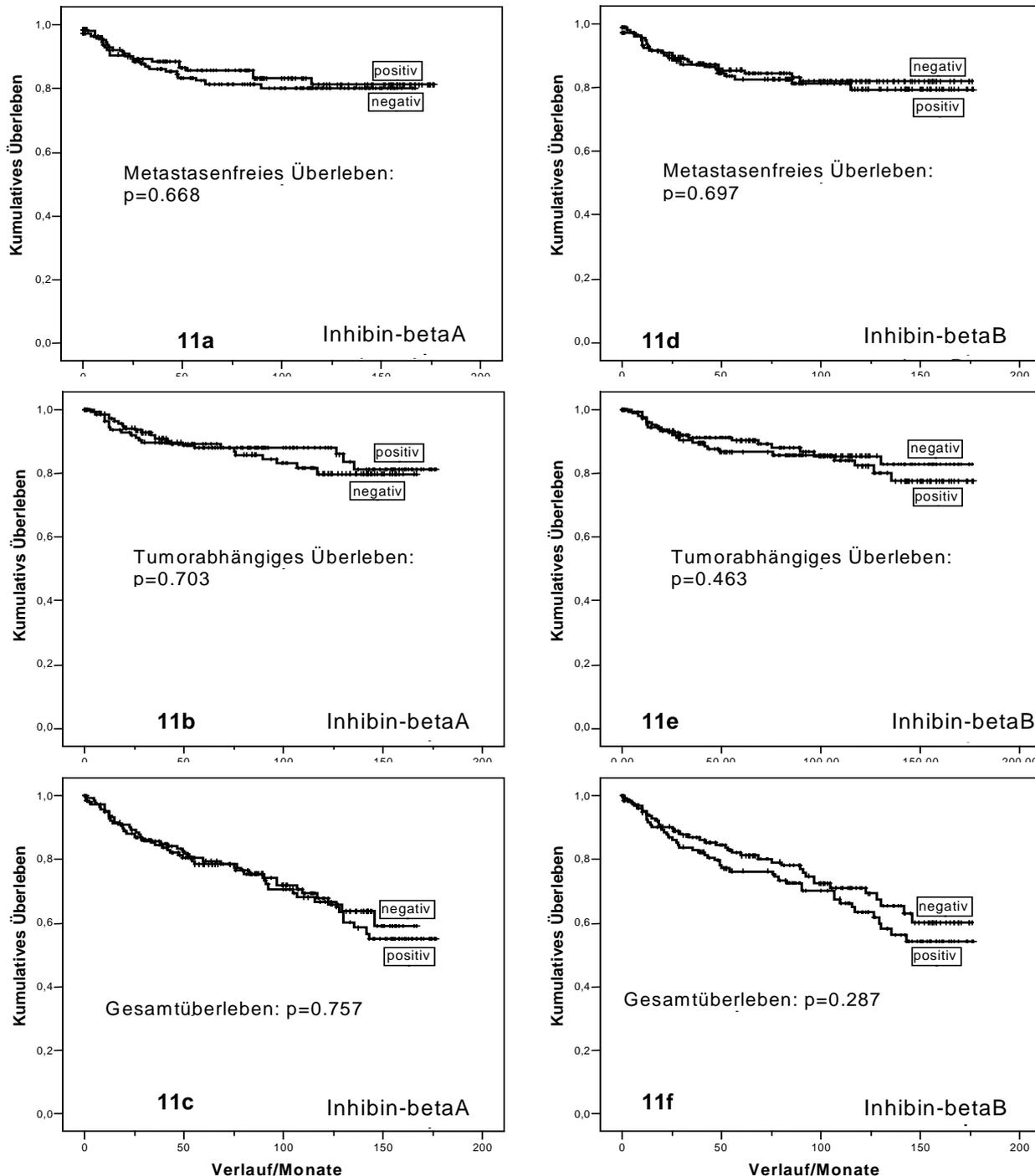
4.3.3 Überlebensanalyse

Die mediane Gesamtüberlebenszeit betrug für die unzensierte Untergruppe 39,1 Monate (Spannweite von 0,7 bis 145,7 Monaten), wobei für zensierte Patientinnen der mediane Verlauf 89,7 Monate (Spannweite von 0,3 bis 176,8 Monate) betrug. Der weitere Verlauf bis zum Auftreten von Metastasen betrug 33,8 Monate (Spannweite von 0,01 bis 145,7 Monate). Eindimensionale Überlebensanalysen verrieten, dass Patientinnen, die eine Inhibin- α -Expression aufwiesen, ein signifikant besseres metastasenfrees Überleben hatten als Patientinnen ohne die Expression dieser Untereinheit (**Abbildung 10a**) ($p=0,04$, Log-Rang-Test). Außerdem wurde bei Patientinnen ohne Inhibin- α -Expression ein signifikant geringeres tumorabhängiges Überleben (**Abbildung 10b**) und Gesamtüberleben (**Abbildung 10c**) festgestellt.



Abbildungen 10a bis 10c: Kaplan-Meier Kurven hinsichtlich der Inhibin- α -Expression für metastasenfreies Überleben (**Abb. 10a**), tumorabhängiges Überleben (**Abb. 10b**) und Gesamtüberleben (**Abb. 10c**).

Im Gegensatz dazu standen die Inhibin- β A- und Inhibin- β B-Untereinheiten, die keine signifikanten Unterschiede zwischen metastasenfremem Überleben, tumorabhängigen Überleben und Gesamtüberleben bewiesen (**Abbildung 11a-f**).



Abbildungen 11a bis 11f: Kaplan-Meier Kurven des klinischem Verlaufs hinsichtlich der Inhibin- β A-Expression für metastasenfrees Überleben (**Abb. 11a**), tumorabhängiges Überleben (**Abb. 11b**) und Gesamtüberleben (**Abb. 11c**) und die Inhibin- β B-Expression für metastasenfrees Überleben (**Abb. 11d**), tumorabhängiges Überleben (**Abb. 11e**) und Gesamtüberleben (**Abb. 11f**)

Andere klinische Parameter, einschließlich fortgeschrittenem chirurgischem Stadium (Stadium I/II versus Stadium III/IV) und fortgeschrittener histologischer Differenzierungsgrad (G3 versus G1 oder G2), die auch als prognostische Faktoren des Endometriumkarzinoms gelten, beeinflussten signifikant die Überlebensrate der ausgewerteten Patientinnen. Dies bewies auch die Validität der Patientengruppe, die in dieser Arbeit untersucht wurden (p in Log-Rang war $<0,001$ für beide ausgewerteten Parameter für jeweils das metastasenfremie Überleben, tumorabhängige Überleben und Gesamtüberleben; Daten nicht gezeigt).

Prognostische Faktoren wurden mittels des multivariaten Cox-proportionalen Hazard Modells analysiert. Für die Regressionsmodelle wurden folgende Variablen mit einbezogen: Alter, FIGO-Stadium, Differenzierungsgrad, histologischer Subtyp, Lymphknotenstatus, Lymphangiosis, Hämangiosis, Adipositas, arterielle Hypertension, Diabetes mellitus Typ 2, Radiotherapie, anti-Hormon Therapie und die Expression von Inhibin- α , Inhibin- β A und Inhibin- β B. Die nachfolgende schrittweise Elimination nach Cox-Regressionsergebnissen führte zu einem Model, welches drei unabhängige Bedingungen enthielt, die Voraussagen auf das metastasenfremie Überleben waren: Differenzierungsgrad nach WHO ($p=0,002$), FIGO-Stadium ($p<0,001$), Lymphknotenbeteiligung ($p=0,016$) und die Inhibin- α Expression ($p=0,026$) (**Tabelle 5**). Unabhängige prognostische Faktoren für das tumorabhängige Überleben waren das Alter ($p=0,004$), das FIGO-Stadium ($p<0,001$), der Differenzierungsgrad ($p=0,003$) und die Inhibin- α Expression ($p=0,025$). Das Gesamtüberleben wurde vom Alter ($p<0,001$), FIGO-Stadium ($p<0,001$), Differenzierungsgrad ($p=0,008$), Lymphknotenbeteiligung ($p<0,001$), Hämangiosis ($p=0,018$), hohem Blutdruck ($p=0,042$) und der immunhistochemischen Expression von Inhibin- α ($p=0,021$) beeinflusst (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Hazard Ratio der multivariaten Cox-Regressionsanalyse.

| | Progression | | | Tumorabhängiges Überleben | | | Gesamtüberleben | | |
|--------------------------------------|-------------|--------------|------------------|---------------------------|-------------|------------------|-----------------|-------------|------------------|
| | RR | CI (5%-95%) | p | RR | CI (5%-95%) | p | RR | CI (5%-95%) | p |
| Alter (>65Jahre) | - | - | - | 2.742 | 1.39 - 5.42 | 0.004 | 3.350 | 1.96 - 5.72 | <0.001 |
| Differenzierung (WHO) (G3 vs. G1/G2) | 2.753 | 1.46 - 5.14 | 0.002 | 2.814 | 1.43 - 5.53 | 0.003 | 1.978 | 1.19 - 3.28 | 0.008 |
| FIGO-Stadium (III/IV vs. I/II) | 14.170 | 7.11 - 28.25 | <0.001 | 4.905 | 2.47 - 9.74 | <0.001 | 3.880 | 2.06 - 7.31 | <0.001 |
| Lymphknoten-Status (neg. vs. pos.) | 0.441 | 0.23-0.86 | 0.016 | - | - | - | - | - | - |
| Hypertonie (neg. vs. pos.) | - | - | - | - | - | - | 0.617 | 0.39 - 0.98 | 0.042 |
| Hämangiosis (pos. vs. neg.) | - | - | - | - | - | - | 3.450 | 1.24 - 9.60 | 0.018 |
| Inhibin-alpha (pos. vs. neg.) | 0.259 | 0.08 - 0.79 | 0.026 | 0.101 | 0.01 - 0.76 | 0.025 | 0.469 | 0.25 - 0.89 | 0.021 |

5 Diskussion

Obwohl Inhibin und Activin primär als hormonale Regulationsfaktoren der hypophysären-hypothalamischen-gonadalen Achse isoliert und charakterisiert wurden, werden diese Peptidhormone von einer Reihe unterschiedlicher gynäkologischer Organe exprimiert, einschließlich Plazenta (110,111,121) und Endometrium (103,104,112,120). Diese Expression von Inhibin-Untereinheiten in verschiedenen weiblichen Geweben weist auf unterschiedliche autokrine bzw. parakrine Funktionen hin. So wird für diese Glycoproteine u. a. eine substantielle Funktion als parakrine Modulation in der Reproduktion und in der gonadalen Tumorgenese angenommen. Da Inhibine in einer solchen Vielzahl von Geweben eine wichtige Funktion einnehmen und besonders in geschlechtsspezifischen Keimdrüsentumoren stellte sich die Frage nach der Bedeutung von Inhibinen beim Endometriumkarzinom.

Obwohl mehr als 50% der Patientinnen mit Endometriumkarzinom im FIGO-Stadium I diagnostiziert werden, versterben mehr als 20% an ihrer Krankheit (59). Verglichen mit anderen soliden Tumoren stellt dies eine ungewöhnliche Situation dar. Es könnte das Versagen der momentanen Diagnostik bei Patientinnen mit Vorstadien des Malignoms und Endometriumkarzinompatientinnen mit schlechter Prognose widerspiegeln. Verschiedene klinische Parameter wie Alter bei Diagnose, fortgeschrittenes chirurgisches Stadium und fortgeschrittener histologischer Differenzierungsgrad sowie Lymphknotenstatus gelten als wichtige Prognosefaktoren des Endometriumkarzinom (9). Diese Faktoren beeinflussten auch signifikant das Überleben der Patientinnen dieser Studie, was die Validität der teilnehmenden Patientinnengruppe beweist. Es ist bereits bekannt, dass höheres Lebensalter und weitere Krankheiten wie arterielle Hypertension oder Diabetes mellitus mit einem geringeren Überleben assoziiert ist (9,169). Die gängigen Methoden zur Diagnostik sind aber zurzeit noch nicht effizient genug, auch Patientinnen mit einer schlechteren Prognose früh zu erkennen und entsprechend zu behandeln. Auch die frühzeitige Erkennung von Rezidiven ist derzeit nicht durch Routine-PAP-Abstriche (Klassifikation nach Papanicolaou: Zytologische Diagnostik von Abstrichen des weiblichen Genitaltrakts) und systemische Radiographie gewährleistet (97). Da für 2/3 der Kosten PAP-Abstriche und Radiographie Untersuchungen verantwortlich waren, scheint es für diese Untersuchungen weder eine klinische, noch eine finanzielle Rechtfertigung zu geben (3,97). Deswegen könnte die immunhistochemische Färbung und Auswertung spezifischer Marker helfen, Hochrisikopatientinnen früher zu identifizieren und zu einer verbesserten adjuvanten Therapie zu verhelfen.

In dieser Arbeit konnte eine immunhistochemische Expression aller drei Inhibin/Activin-Untereinheiten in normalen und malignen endometrialem Gewebe gezeigt werden. Vor allem die Inhibin- α -Untereinheit wurde vermehrt in normalem Endometrium im Vergleich zu endometrioiden Adenokarzinomen nachgewiesen. Die stetige Abnahme der immunhistochemischen Färbereaktion von Inhibin- α zwischen gut differenzierten und schlecht differenzierten endometrioiden Adenokarzinomen wurde ebenfalls beobachtet. Daraus konnte geschlossen werden, dass dieses Glycoprotein ein möglicher Parameter für die maligne Zelltransformation darstellen könnte und möglicherweise als Tumorsuppressorgen bei endometrioiden Adenokarzinomen fungieren könnte. Zusätzlich wurde in 302 Gewebeschnitten eine unterschiedliche immunhistochemische Expression der Inhibin/Activin-Untereinheiten in malignem Endometriumgewebe nachgewiesen. Die Inhibin- α -Untereinheit zeigte eine signifikante Assoziation mit histologischem Differenzierungsgrad, chirurgischem Stadium, Lymphknotenstatus und Diabetes mellitus bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom. Zudem zeigten Überlebensanalysen, dass die stärkere Inhibin- α -Immunreaktion einen signifikant unabhängigen Prognosefaktor für das metastasenfreie Überleben, das tumorabhängige Überleben sowie das Gesamtüberleben darstellt. Obwohl Inhibin- β A- und Inhibin- β B-Untereinheiten eine signifikante Assoziation zwischen den unterschiedlichen histologischen Subtypen des Endometriumkarzinom und histologischen Differenzierungsgrad zeigten, waren beide Untereinheiten nicht mit dem Überleben der Patientinnen mit Endometriumkarzinom assoziiert.

Es wurde von unterschiedlichen autokrinen und parakrinen Vorgängen der Inhibine/Activine berichtet – die exakte Rolle in humanem Endometrium ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Inhibin A und B wurden ursprünglich als Suppressor der Sekretion von FSH in Zellen der Hypophyse *in vitro* nachgewiesen, wohingegen Activine die FSH-Sekretion der Hypophyse stimulieren. Es wird somit eine Funktion der Activine als Gegenspieler von Inhibinen angenommen (171). Die Wirkung der Inhibine auf die FSH-Freisetzung benötigt eine Latenzzeit von mehreren Stunden. Eine maximale Suppression wird von acht bis zu 24 Stunden nach Exposition von Inhibinen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erreicht (171). Inhibine hemmen außerdem die GnRH-induzierte Hochregulierung der GnRH-Rezeptoren in kultivierten Zellen aus der Ratten-Hypophyse. Diese Wirkung der Inhibine findet intrazellulär nach der Ca^{2+} -Mobilisierung statt (176). Zusammenfassend ist wahrscheinlich Inhibin ein Feedback-Regulator der FSH Sekretion. Obwohl es in vielen Geweben gebildet wird, sind Ovar und Hoden die größten Quellen von Inhibin (148).

Activine spielen in vielen Organsystemen eine Rolle, wie z.B. in der Entwicklungsbiologie, Leber-, Nieren- und Knochenbiologie, Hämatopoese und Inflammation (60,124,126). Activin A stimuliert potent und selektiv die FSH-Sekretion *in vitro*. Wie bei Inhibinen ist die Wirkung der Activine auf die FSH-Freisetzung unabhängig von GnRH und erfordert eine lange Latenzzeit (172). Somit scheinen sich Inhibine und Activine funktionell zu antagonisieren: Inhibin senkt die Produktion von FSH und verdeckt die Wirkung von niedrigen Activin-Konzentrationen, wohingegen höhere Konzentrationen von Activin die Wirkung von Inhibin überwinden. Dies wiederum führt zu einer Stimulation der FSH-Sekretion. Höchstkonzentrationen von Activin verhindern vollständig die Wirkung von Inhibin (185). Die gegensätzlichen Wirkungen konnten außerdem dadurch bewiesen werden, dass Inhibin die FSH-mRNA innerhalb von 72 Stunden in unbestimmbar niedrige Spiegel reduzierte, was parallel dazu zu einer Veränderung der FSH-Sekretion in Hypophysenzellkultur von Ratten führte. Der Zusatz von Activin führte anschließend tatsächlich zu einem Anstieg der FSH-mRNA-Spiegel mit gleichzeitigem Anstieg der FSH-Sekretion. In Zellkultur zeigte Follitatin ebenfalls eine signifikante Reduktion der FSH-Sekretion.

Inhibine spielen heute vor allem in der Reproduktionsmedizin eine wichtige Rolle (78). Sie könnten aber auch in Zukunft eine wichtige Rolle als Tumormarker beim Endometriumkarzinom hinsichtlich Diagnostik, Staging und Prognose mit Bewertung des Einflusses auf das Gesamtüberleben spielen. Es bleibt noch ungewiss, ob Inhibin A und B qualitativ und quantitativ ähnliche oder andere biologische Aktivitäten besitzen. Inhibin A und B zeigen ähnliche biologische Aktivität *in vitro* bei hypophysiären Zellen von Ratten (76); jedoch zeigt Inhibin B 15% bis 20% der Aktivität von Inhibin A in hypophysiären Zellkulturen aus Schafen (145). Außerdem inhibiert Activin A die DNA-Synthese, die vom *epidermal-growth-factor* (EGF) in Primärkulturen von Ratten-Hepatozyten stimuliert wird, wohingegen Activin B keine Aktivität zeigt (113). Es bleibt unklar, ob Inhibin A und B oder die Isoformen von Activin vergleichbare Aktivitäten im Menschen oder in höheren Primaten aufweisen (142)

Bei unfruchtbaren Männern hatte man lange nach einem zuverlässigen Marker der Sertoli-Zellfunktion gesucht. Verschiedene Studien bei Ratten und Primaten bewiesen, dass die Konzentration von Inhibin B im Serum direkt mit der Anzahl von Sertolizellen im Hoden korreliert (130,153). Da FSH die Inhibinsekretion stimuliert, reflektieren die Inhibinspiegel auch den Grad der FSH-Stimulation und die Fähigkeit der Sertolizellen zu reagieren (37). So könnten in Zukunft Patienten identifiziert werden, die durch eine Stimulation von FSH profitieren und somit zu einer höheren Spermienzahl kämen (50).

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass Inhibin B ein besserer Fertilitätsmarker als FSH oder LH ist. So könnte die Konzentration von Inhibin B bei betroffenen Patienten wertvolle Informationen auf Spermatogenese geben und als höherwertiger Marker für die Spermatogenese als FSH fungieren (66). Auch beim Prostatakarzinom könnten Inhibine einen wichtigen prognostischen Marker darstellen (135,137)

Einige Studien schlagen erniedrigte Spiegel von immunreaktiven Inhibinen (187) bzw. Inhibin A (77,167) als nützliche Marker für Fehlgeburten in der Frühschwangerschaft vor.

Oft werden Progesteronzusätze zur Unterstützung des Corpus luteum bei der IVF verwendet. Da diese Zusätze die Funktion von Progesteron als Marker der Corpus-luteum-Funktion verschleiern können, könnte die Bestimmung von Inhibin A einen hervorragenden Marker der Lutealfunktion darstellen (167).

In der pränatalen Diagnostik spielt die Quantifizierung von Inhibin A während der Schwangerschaft eine Rolle. Es konnten erhöhte Serum-Spiegel von Inhibin A bei Schwangeren mit einem Fetus mit Down-Syndrom gemessen werden, wobei Inhibin-pro- α C und Inhibin B nicht erhöht waren (174,175). Die Bestimmung kann im ersten Trimenon zwischen der 8 bis 14. Schwangerschaftswoche erfolgen. Eine erhöhte Konzentration von Inhibin A deutet auf einen Fetus mit Down-Syndrom hin (5).

Die Messung von Inhibin A wird jedoch in der Pränataldiagnostik als Erweiterung des Tripletests zum sogenannten Quadrupletest zusammen mit AFP, uE3 und β -hCG bereits angewandt. Studien bewiesen eine höhere Aufklärungsrate durch Inhibin A und geringere falsch-positive Werte für das Down-Syndrom (177).

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von einigen Autoren (22), bei denen kein signifikanter Unterschied beim Screening auf Down-Syndrom mit den Markern freies β -hCG, Gesamt-hCG oder Inhibin A zur Nackentransparenzmessung und PAPP-A von der 11 bis 13 Schwangerschaftswoche bestand, obwohl das freie β -HCG in den betroffenen Schwangerschaften früher als Gesamt-hCG oder Inhibin A erhöht war.

Um Risikopatientinnen für Präeklampsie zu identifizieren, ist ein effektiver Marker notwendig. So wurden erhöhte Inhibin-A-Spiegel im mütterlichen Serum im 2. Trimenon bei Patientinnen festgestellt, die später eine Präeklampsie entwickelten (13). Auch Activin-A-Spiegel waren in einigen Studien bei hypertensiven Patientinnen während der Schwangerschaft erhöht, was ebenfalls eine Rolle von Activin in Bezug auf Prognose und Entwicklung der Präeklampsie hinweisen könnte (119,157).

Es wurde außerdem die Gen-Expression der Activin/Inhibin-Untereinheiten (Inhibin- α , Inhibin- β A, Inhibin- β B, Inhibin- β C), von Follistatin und Activin-Rezeptoren in

Plazentagewebe nachgewiesen, was weitere pathophysiologische Beweise für eine abnormale Gen-Expression bei Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zu unkomplizierten Schwangerschaften liefert (23). Neuste Studien beweisen sehr stark erhöhte Konzentrationen von Activin A und Inhibin A im Urin betroffener Patientinnen, die auf eine Erhöhung dieser Proteine bereits vor den klinischen Symptomen der Präeklampsie hinweist und somit als Marker fungieren könnten (101).

Es konnte die Expression von Inhibinen in malignem Endometrium gezeigt werden, was auf eine mögliche Funktion von Inhibin in Proliferation und Wachstum von Endometriumgewebe hinweist. Nach den Ergebnissen des transgenetischen Maus-Modells könnte die wichtigste Funktion von Inhibin- α seine Wirkung als mögliches Tumorsuppressorgen sein. Das Gen der Inhibin- α -Untereinheit wird als Tumorsuppressor angesehen. Es ist in dem transgenetischem Maus-Modell mit dem Ovarialkarzinom assoziiert (29,85,86). Bei Mäusen wurde mit der fehlenden Produktion von Inhibin- α eine erhöhte Activin-Produktion im Ovar beobachtet. Die Inhibin- α -defizienten Mäuse wiesen kachektische Symptome auf, die mit einer kompensatorisch exzessiven Sekretion von Activin einhergingen (85). In dieser Arbeit wurde keine immunhistochemische Färbereaktion der Inhibin- α -Untereinheit in G3-Adenokarzinomen beobachtet, jedoch eine stärkere Expression der Inhibin- β -Untereinheiten. Dies könnte als eine kompensatorische Activinproduktion in humanen Endometriumkarzinomzellen interpretiert werden. Da Inhibine und Activine zur TGF- β -*superfamily* gezählt werden, wurde Inhibin- α eine tumorsuppressive Funktion in benignen und frühen Stadien von Primärtumoren zugeschrieben, die mit der Tumorprogression nachlässt und als pro-onkogenetischer Faktor in fortgeschritteneren und aggressiveren Tumoren reaktiviert wird (135). Es muß noch geklärt werden, ob dies auch für das endometrioides Adenokarzinom seine Gültigkeit hat. Es könnte außerdem möglich sein, dass die Inhibin- α -Untereinheit in maligneren histologischen Typen des Endometriumkarzinoms (z.B. klarzelliges Endometriumkarzinom) exprimiert und/oder hoch reguliert wird.

Inhibine werden unter anderem in Gewebeproben aus Mammakarzinomen (102,131), Plazenta (110,111,123), humanem Endometrium (48,103,116,164), kultivierten humanen Endometriumzellen (48,105-107,117,164) exprimiert. Es konnte in dieser Arbeit eine signifikant höhere Inhibin- α -Expression in der sekretorischen Phase im Vergleich zur proliferativen Phase des Menstruationszyklus in Endometriumgewebe dargestellt werden, was vorherige immunhistochemische Studien (103,104) sowie *in vitro* Ergebnisse bestätigte (104,112). Zusätzlich wurde zum ersten mal gezeigt, dass Inhibin- α in malignem Endometriumgewebe verschiedener Differenzierungsgrade

exprimiert wird. Obwohl das endometrioidie Adenokarzinom eine positive immunhistochemische Färbereaktion mit Inhibin- α aufwies, war die Intensität der Expression signifikant geringer im Vergleich zu normalem humanem Endometriumgewebe. Es bestätigten sich damit ebenfalls vorherige Ergebnisse (48,107). Da Inhibin- α in schlecht differenzierten endometrioiden Adenokarzinom (G3) nicht beobachtet werden konnte, könnte es als Tumorsupressor dienen und damit eine entscheidende Funktion bei der Entwicklung des endometrioiden Adenokarzinom besitzen. Wie bereits andere Studien bestätigten, konnte eine geringere Inhibin- α -Expression in gut differenzierten Adenokarzinomen bewiesen werden als in normalem und hyperplastischen Endometriumgewebe (107). Deswegen kann angenommen werden, dass die geringere Expression von Inhibin- α daher rührt, dass sich die Inhibin- α - und Inhibin- β A-Untereinheit zu Inhibin A verbinden, welches wiederum eine substantielle Rolle in der malignen Zelltransformation des Endometrium spielen könnte. Es könnte jedoch auch möglich sein, dass die Überproduktion von Inhibin- β A zur Bildung von Activin A führt, was bei malignem Geschehen in größeren Mengen in den Blutkreislauf ausgeschüttet wird (120). Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass in schlecht differenzierten Adenokarzinomen (G3) keine Expression der Inhibin- α -Untereinheit mehr festgestellt werden konnte und somit eher auf eine Produktion von Activinen als von Inhibinen hinweist. Auch war die Expression von Inhibin- β -Untereinheiten in G3-Tumoren stärker als in G1-Tumoren. Inhibin- β B war in G3-Tumoren stärker exprimiert als bei mäßig differenzierten Adenokarzinomen (G2), was ebenfalls auf eine wichtige Funktion in der malignen Zelltransformation hindeutet. Inhibine konnten auch bei etlichen anderen gynäkologischen Tumoren nachgewiesen werden. So wird die Messung von Inhibin im Serum neben β -hCG bei Trophoblasterkrankungen von Nutzen sein. Vor allem könnten Messungen von Serum-Inhibin A und Activin A bei der Diagnostik und Verlauf der Molenschwangerschaft von Wert sein (49). Eine hydatide Mole mit Hyperplasie und Proliferation weist ein hohes Risiko für die Entwicklung einer persistierenden (eventuell metastasierenden) Trophoblastenstörung, einer invasiven Mole und seltener eines Chorionkarzinom auf. Untersuchungen bewiesen eine positive Reaktion der Inhibin-Untereinheiten mit Trophoblastengewebe und könnten so nützliche diagnostische Marker für die hydatide Mole mit persistierender polymorpher Trophoblastenhyperplasie sein (109).

Auch in Granulosazelltumoren spielen Inhibine und Activine eine entscheidende Rolle. Es konnten erhöhte Spiegel von Inhibinen durch Radioimmunassays und ELISA von Inhibin B bei 100% der Granulosazelltumoren nachgewiesen werden, wobei die

Mehrheit der Tumoren auch erhöhte Spiegel für Inhibin A und Inhibin-pro- α C zeigten (143). Andere Studien untersuchten die Konzentration von Inhibinen in peritonealer Flüssigkeit, welche die Konzentration im Serum weit übertraf (6). Dabei stellte sich heraus, dass relativ geringe Konzentrationen von Inhibin A und Inhibin-pro- α C in der Peritonealflüssigkeit der Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit einem fortgeschritteneren Stadium und Differenzierungsgrad einhergehen und zu einem geringeren Anteil mit einer positiven peritonealen Zytologie assoziiert sind (6).

Serum-Inhibin Messungen, die alle Inhibin-Untereinheiten nachweisen können, dienen vor allem der Früherkennung von Granulosazelltumoren und muzinösen Karzinomen (31,144). Durch eine neue Inhibin-pro- α C geführte Immunofluorometrie (Inhibin-pro- α C IFMA) zusammen mit der Messung von CA125 konnte ein wirkungsvolles Verfahren zum Screening für Ovarialtumoren zur Verfügung gestellt werden (150); (142).

Da Inhibin schon bei zahlreichen anderen Karzinomen eine tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben wird und Activin eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum hat, könnten Inhibine/Activin auch beim Mammakarzinom eine wichtige Rolle spielen (132). So wurde der Activin A als möglicher wachstumshemmender Marker in Mammakarzinomzellen identifiziert (20). Die unterschiedliche Expression der Inhibin-Untereinheiten im Mammakarzinom weist auf eine mögliche Rolle in der Karzinogenese des Mammakarzinoms hin und könnte somit als potentieller Tumormarker genutzt werden (102).

Activin A ist in der Lage die Proliferation bestimmter maligner Zelllinien zu steigern (40). In der endometrialen Tumorgenese wurde aus diesem Grund eine Rolle für Activin A diskutiert (117,162). Es wurde gezeigt, dass eine verstärkte Activin A-Produktion in humanen endometrialen Adenokarzinomzellen *in vitro* die Proliferation der Karzinomzellen nicht stimulieren oder den apoptotischen Signalweg der Karzinomzellen hemmen konnte. Die fehlende Sensitivität auf die gewohnten wachstumshemmende Signale, die von Activin A induziert werden, könnten statt dessen ein Mechanismus der Unzerstörbarkeit der Endometriumkarzinomzellen sein (161). Activin kann die Angiogenese dennoch inhibieren, wofür seine wachstumshemmende Funktion vaskulärer Endothelzellen verantwortlich ist (88). Deswegen könnte die Expression der Inhibin- β -Untereinheiten während der Karzinogenese einen wichtigen Bestandteil in der endometrialen Angiogenese in Anspruch nehmen. Activin A wurde zudem in signifikant höheren Konzentrationen in Zellkulturen uteriner Spülflüssigkeit und Serum von Patientinnen mit Endometriumkarzinom entdeckt (120), was auf die Ausschüttung von Activin A in den extrazellulären Raum und in die Zirkulation hinweist. Da Activin A

Zellwachstum, Proliferation und Apoptose regulieren kann (27), deutet dies auf eine wachstumshemmende Funktion von Activin A in der prämaligen Zelltransformation hin. Wir konnten eine unterschiedliche Expression der Inhibin- β -Untereinheiten in malignem verglichen zu normalem Endometriumgewebe darstellen. Auch die Inhibin- β -Untereinheit wurde im Vergleich von G2-Karzinomen zu G3-Karzinomen stärker exprimiert, was ebenfalls eine wichtige Beteiligung dieser Untereinheit in der Karzinogenese des Endometriumkarzinoms schließen lässt.

Wie in dieser Arbeit untersucht wurde, könnten Inhibine in Diagnostik und Prognoseeinschätzung des Endometriumkarzinoms in Zukunft von Bedeutung sein (180). Jedoch bleibt die mögliche Funktion der Inhibin- α -Untereinheit als Tumorsuppressoren am interessantesten, wie bereits in den Ergebnissen des transgenetischen Maus-Modells für Ovarialkarzinom diskutiert wurde (29,85,86). In den neusten Studien konnte eine signifikant geringere Inhibin- α -Expression im Vergleich zu normalem und hyperplastischem Endometriumgewebe in gut differenzierten Adenokarzinomen bewiesen werden (48,107). Die Ergebnisse führten außerdem zu der Hypothese, dass Inhibin- α als Tumorsuppressor mit entscheidenden Funktionen in der Pathogenese des Endometriumkarzinoms fungieren könnte. In diesen Beobachtungen korrelierten die ausbleibende Immunreaktivität von Inhibin-alpha im Tumorgewebe mit fortgeschrittenem chirurgischen Tumorstadium, histologischem Differenzierungsgrad und schlechter Prognose. Aus diesem Grund konnte darauf geschlossen werden, dass Inhibin-alpha eine tumorsuppressive Funktion beim Endometriumkarzinom erfüllt und sowohl das Fortschreiten des Tumors als auch die tumorabhängige Mortalitätsrate beeinflusst. Da die verwendete immunhistochemische Färbereaktion eine einfache und kostengünstige diagnostische Methode darstellt, kann sie als Routineparameter in jedem Labor mit einer immunhistochemischen Einrichtung durchgeführt werden. Zudem legen die signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben weitere Funktionen von Inhibin-alpha bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom nahe. Zusätzlich wurde außerdem eine signifikante Korrelation zwischen der alpha-Untereinheit und der Expression von Steroid-Rezeptoren beobachtet. Diese Tatsache würde damit eine funktionelle Beziehung zwischen Inhibinen und Steroiden vorschlagen (41,104).

Die möglichen Funktionen der Inhibin- β -Untereinheiten im Endometriumkarzinom sind umstritten und noch unklar. Da Activin A, ein Homodimer aus Inhibin- β -Untereinheiten, in der Lage ist, die Proliferation bestimmter Zelllinien zu fördern (40), wurde Activin A eine Rolle in der Tumorgenese des Endometrium zugeschrieben (117). Activin A könnte jedenfalls die Angiogenese hemmen, indem es das Wachstum vaskulärer

Endothelzellen inhibiert (88). Demzufolge könnte die Expression der Inhibin- β -Untereinheiten während der Karzinogenese in der endometrialen Angiogenese eine wichtige Rolle spielen.

Interessanterweise folgte nach dem Abfall der Inhibin- α -Produktion bei Mäusen eine deutliche Steigerung der Activin-Produktion im Ovar. So litten Mäuse mit einem Defizit an Inhibin- α an Tumorkachexie mit einer kompensatorischen massiven Sekretion von Activin (85). Darüber hinaus gibt dies nun auch Grund zu der Annahme, dass Activin kompensatorisch in Tumorzellen des Endometriumkarzinoms produziert wird. Activin A wurde unlängst in signifikant höheren Konzentrationen in Zellkulturen, uterinen Spülzytologien und im Serum von Patientinnen mit Endometriumkarzinom gefunden (120). Dies deutet auf eine Sekretion von Activin A in extrazelluläre Flüssigkeit und den Kreislauf hin. Da Activin A Zellwachstum, Proliferation und Apoptose beeinflussen kann (27), weist dies auf eine wachstumshemmende Rolle für Activin in der prä-malignen Transformation hin. Activin B wurde erst kürzlich eine Funktion als Marker bei Patientinnen mit Granulosazelltumoren des Ovars zugeschrieben (173). Inhibin B könnte jedoch einen spezifischeren Marker als Inhibin A darstellen (122). Somit wird Inhibin- β B und der damit mögliche Bildung von Inhibin B und/oder Activin B ebenfalls eine wichtige Rolle in der malignen Zelltransformation des Endometriums zugesprochen, obwohl es noch keine serologischen Daten von Tumorpatientinnen gibt. Obwohl in dieser Studie eine Assoziation zwischen den Inhibin- β -Untereinheiten und dem histologischen Differenzierungsgrad bewiesen werden konnte, war keine Assoziation mit anderen klinischen Parametern und dem Überleben zu beobachten. Deswegen stellen beide Inhibin- β -Untereinheiten keine nützlichen Marker da, um Hoch-Risiko-Patientinnen mit Endometriumkarzinom zu identifizieren und zu beurteilen.

6 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression von Inhibin- α -, Inhibin- β A- und Inhibin- β B-Untereinheiten in normalem und malignem Endometriumgewebe bewiesen werden konnte. Die stetige Abnahme der immunhistochemischen Färbereaktion von Inhibin- α zwischen gut differenzierten und schlecht differenzierten endometrioiden Adenokarzinomen wurde beobachtet. Daraus konnte geschlossen werden, dass dieses Glycoprotein ein möglicher Parameter für die maligne Zelltransformation darstellen könnte und möglicherweise als Tumorsupressorgen bei endometrioiden Adenokarzinomen fungieren könnte. Inhibin-alpha zeigte eine signifikante Assoziation zu histologischem Differenzierungsgrad, chirurgischem Stadium, Lymphknotenstatus und Diabetes mellitus bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom. Die fehlende immunhistochemische Färbereaktion von Inhibin-alpha spiegelte sich in einem geringeren Überleben der betroffenen Patientinnen wieder. Aus diesem Grund könnte Inhibin-alpha als Tumorsupressor in humanem Endometriumgewebe fungieren. Diese Funktion als Tumorsupressor der Inhibin- α -Untereinheit wurde bereits bei Mäusen im Ovarialkarzinom diskutiert. Außerdem belegten Überlebensanalysen, dass die Expression von Inhibin- α ein signifikanter prognostischer Faktor für das metastasenfreie Überleben, das tumorabhängige Überleben und das Gesamtüberleben darstellt. Im Gegensatz dazu standen die Inhibin- β A- und Inhibin- β B-Untereinheiten, die zwar eine signifikante Assoziation zwischen den unterschiedlichen histologischen Subtypen des Endometriumkarzinoms und histologischen Differenzierungsgraden zeigten, aber nicht mit dem Überleben der Patientinnen mit Endometriumkarzinom assoziiert waren. Aus den genannten Gründen könnte eine Immunhistochemische Färbung der Inhibin- α -Untereinheit als einfache, kostengünstige und sehr effiziente Methode genutzt werden, um Hoch-Risiko-Patientinnen zu identifizieren. Zudem könnte dies helfen, diese Patientinnen herauszufiltern und eine aggressivere adjuvante Therapie einzuleiten. Bei unsicher und schwer zu bestimmenden pathologischer Diagnose könnten die Inhibin-Untereinheiten nützlicher Marker in der weiteren Diagnostik und Evaluation des pathologischen Befundes darstellen. So könnte mit Hilfe der Immunhistochemie Patientinnen identifiziert werden, die ein erhöhtes Risiko haben, schlecht differenzierte Endometriumkarzinome zu entwickeln. Es könnte sich außerdem die intensive Expression der Inhibin- β -Untereinheiten in schlecht differenzierten Karzinomen im

Vergleich zu G1 und G2-Karzinomen als potentielle Tumormarker zu Nutzen gemacht werden.

Dennoch sollte die festgestellte prognostische Signifikanz der Inhibin-alpha-Untereinheit und der Nutzen der drei Inhibin-Untereinheiten als spezifische Marker in der Pathogenese des Endometrium in weiteren Studien analysiert werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Announcements: FIGO Stages - revision. *Gynecol Oncol* 35:125-127, 1989.
2. Abeler V.M., Kjørstad K.E. and Berle E. Carcinoma of the endometrium in Norway: a histopathological and prognostic survey of a total population. *Int J Gynecol Cancer* 2(1):9-22, 1992.
3. Agboola O.O., Grunfeld E., Coyle D. and Perry G.A. Costs and benefits of routine follow-up after curative treatment for endometrial cancer. *Cmaj* 157(7):879-886, 1997.
4. Ahmed E., Young R.H. and Scully R.E. Adult granulosa cell tumor of the ovary with foci of hepatic cell differentiation: a report of four cases and comparison with two cases of granulosa cell tumor with Leydig cells. *Am J Surg Pathol* 23(9):1089-1093, 1999.
5. Aitken D.A., Wallace E.M., Crossley J.A., Swanston I.A., van Pareren Y., van Maarle M., Groome N.P., Macri J.N. and Connor J.M. Dimeric inhibin A as a marker for Down's syndrome in early pregnancy. *N Engl J Med* 334(19):1231-1236, 1996.
6. Ala-Fossi S.L., Maenpaa J., Blauer M., Tuohimaa P. and Punnonen R. Inhibin A, B and pro-alphaC in serum and peritoneal fluid in postmenopausal patients with ovarian tumors. *Eur J Endocrinol* 142(4):334-339, 2000.
7. Alektiar K.M., McKee A., Lin O., Venkatraman E., Zelefsky M.J., McKee B., Hoskins W.J. and Barakat R.R. Is there a difference in outcome between stage I-II endometrial cancer of papillary serous/clear cell and endometrioid FIGO Grade 3 cancer? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54(1):79-85, 2002.
8. Alexander J.M., Bikkal H.A., Zervas N.T., Laws E.R., Jr. and Klibanski A. Tumor-specific expression and alternate splicing of messenger ribonucleic acid encoding activin/transforming growth factor-beta receptors in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 81(2):783-790, 1996.
9. Amant F., Moerman P., Neven P., Timmerman D., Van Limbergen E. and Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet* 366(9484):491-505, 2005.
10. Ambros R.A., Sherman M.E. and Zahn C.M. Endometrial intraepithelial carcinoma: A distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation. *Hum Pathol* 26:1260-1267, 1995.
11. Anawalt B.D., Bebb R.A., Matsumoto A.M., Groome N.P., Illingworth P.J., McNeilly A.S. and Bremner W.J. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 81(9):3341-3345, 1996.
12. Anderson R.A., Irvine D.S., Balfour C., Groome N.P. and Riley S.C. Inhibin B in seminal plasma: testicular origin and relationship to spermatogenesis. *Hum Reprod* 13(4):920-926, 1998.
13. Aquilina J., Barnett A., Thompson O. and Harrington K. Second-trimester maternal serum inhibin A concentration as an early marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 181(1):131-136, 1999.
14. Bergh A. and Cajander S. Immunohistochemical localization of inhibin-alpha in the testes of normal men and in men with testicular disorders. *Int J Androl* 13(6):463-469, 1990.
15. Bernard D.J., Chapman S.C. and Woodruff T.K. Inhibin binding protein (InhBP/p120), betaglycan, and the continuing search for the inhibin receptor. *Mol Endocrinol* 16(2):207-212, 2002.
16. Bicsak T.A., Tucker E.M., Cappel S., Vaughan J., Rivier J., Vale W. and Hsueh A.J. Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis. *Endocrinology* 119(6):2711-2719, 1986.

17. Bokhman J.V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* (15):10-17, 1983.
18. Bokhman J.V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 15:10-17, 1983.
19. Boronow R.C., Morrow C.P. and Creasman W.T. Surgical staging in endometrial cancer: Clinical-pathological findings of a prospective study. *Obstet Gynecol* 63:825-832, 1984.
20. Burdette J.E., Jeruss J.S., Kurley S.J., Lee E.J. and Woodruff T.K. Activin A mediates growth inhibition and cell cycle arrest through Smads in human breast cancer cells. *Cancer Res* 65(17):7968-7975, 2005.
21. Caduff R.F., Johnston C.M., Svoboda-Newman S.M., Poy E.L., Merajver S.D. and Frank T.S. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol* 148(5):1671-1678, 1996.
22. Canick J.A., Lambert-Messerlian G.M., Palomaki G.E., Neveux L.M., Malone F.D., Ball R.H., Nyberg D.A., Comstock C.H., Bukowski R., Saade G.R., Berkowitz R.L., Dar P., Dugoff L., Craigo S.D., Timor-Tritsch I.E., Carr S.R., Wolfe H.M. and D'Alton M.E. Comparison of serum markers in first-trimester down syndrome screening. *Obstet Gynecol* 108(5):1192-1199, 2006.
23. Casagrandi D., Bearfield C., Geary J., Redman C.W. and Muttukrishna S. Inhibin, activin, follistatin, activin receptors and beta-glycan gene expression in the placental tissue of patients with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 9(4):199-203, 2003.
24. Catusus L., Machin P., Matias-Guiu X. and Prat J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol* 29(10):1160-1164, 1998.
25. Chen X., Rubock M.J. and Whitman M. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature* 383(6602):691-696, 1996.
26. Chen X., Weisberg E., Fridmacher V., Watanabe M., Naco G. and Whitman M. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389(6646):85-89, 1997.
27. Chen Y.G., Lui H.M., Lin S.L., Lee J.M. and Ying S.Y. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. *Exp Biol Med (Maywood)* 227(2):75-87, 2002.
28. Chong H., Pangas S.A., Bernard D.J., Wang E., Gitch J., Chen W., Draper L.B., Cox E.T. and Woodruff T.K. Structure and expression of a membrane component of the inhibin receptor system. *Endocrinology* 141(7):2600-2607, 2000.
29. Cipriano S.C., Chen L., Kumar T.R. and Matzuk M.M. Follistatin is a modulator of gonadal tumor progression and the activin-induced wasting syndrome in inhibin-deficient mice. *Endocrinology* 141(7):2319-2327, 2000.
30. Coerver K.A., Woodruff T.K., Finegold M.J., Mather J., Bradley A. and Matzuk M.M. Activin signaling through activin receptor type II causes the cachexia-like symptoms in inhibin-deficient mice. *Mol Endocrinol* 10(5):534-543, 1996.
31. Cooke I., O'Brien M., Charnock F.M., Groome N. and Ganesan T.S. Inhibin as a marker for ovarian cancer. *Br J Cancer* 71(5):1046-1050, 1995.
32. Cox D. Regression models and life tables. *R Stat Soc B.* 34:187-220, 1972.
33. Creasman W.T., Kohler M.F., Odicino F., Maisonneuve P. and Boyle P. Prognosis of papillary serous, clear cell, and grade 3 stage I carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol* 95(3):593-596, 2004.
34. Creasman W.T., Morrow C.P., Bundy B.N., Homesley H.D., Graham J.E. and Heller P.B. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 60(8 Suppl):2035-2041, 1987.

35. Davis S.R., Dench F., Nikolaidis I., Clements J.A., Forage R.G., Krozowski Z. and Burger H.G. Inhibin A-subunit gene expression in the ovaries of immature female rats is stimulated by pregnant mare serum gonadotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 138(3):1191-1195, 1986.
36. De Jong F.H., Grootenhuis A.J., Steenbergen J., van Sluijs F.J., Foekens J.A., ten Kate F.J., Oosterhuis J.W., Lamberts S.W. and Klijn J.G. Inhibin immunoreactivity in gonadal and non-gonadal tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37(6):863-866, 1990.
37. de Kretser D.M., Hedger M.P., Loveland K.L. and Phillips D.J. Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update* 8(6):529-541, 2002.
38. de Kretser D.M., McLachlan R.I., Robertson D.M. and Burger H.G. Serum inhibin levels in normal men and men with testicular disorders. *J Endocrinol* 120(3):517-523, 1989.
39. Di Loreto C., Reis F.M., Cataldi P., Zuiani C., Luisi S., Beltrami C.A. and Petraglia F. Human mammary gland and breast carcinoma contain immunoreactive inhibin/activin subunits: evidence for a secretion into cystic fluid. *Eur J Endocrinol* 141(2):190-194, 1999.
40. Di Simone N., Crowley W.F., Jr., Wang Q.F., Sluss P.M. and Schneyer A.L. Characterization of inhibin/activin subunit, follistatin, and activin type II receptors in human ovarian cancer cell lines: a potential role in autocrine growth regulation. *Endocrinology* 137(2):486-494, 1996.
41. Di Simone N., Schneyer A.L., Caliandro D., Castellani R. and Caruso A. Regulation of endometrial adenocarcinoma cell proliferation by Activin-A and its modulation by 17beta-estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 192(1-2):187-195, 2002.
42. Diebold J. and Mayr D. Histopathologie. In: *Tumorzentrum (Ed), Malignome des Corpus uteri*. W. Zuckschwerdt Verlag, München, 2000, pp. 16-22.
43. DiSaia P.J., Creasman W.T., Boronow R.C. and Blessing J.A. Risk factors and recurrent patterns in Stage I endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 151(8):1009-1015, 1985.
44. Erdem O., Erdem M., Dursun A., Akyol G. and Erdem A. Angiogenesis, p53, and bcl-2 expression as prognostic indicators in endometrial cancer: comparison with traditional clinicopathologic variables. *Int J Gynecol Pathol* 22(3):254-260, 2003.
45. Fang J., Yin W., Smiley E., Wang S.Q. and Bonadio J. Molecular cloning of the mouse activin beta E subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun* 228(3):669-674, 1996.
46. Feige A., Rempfen A., Würfel W., Jawny J. and Rohde A. *Uterus. Frauenheilkunde*. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 2006, pp. 818-832.
47. Fetsch P.A., Powers C.N., Zakowski M.F. and Abati A. Anti-alpha-inhibin: marker of choice for the consistent distinction between adrenocortical carcinoma and renal cell carcinoma in fine-needle aspiration. *Cancer* 87(3):168-172, 1999.
48. Florio P., Ciarmela P., Reis F.M., Toti P., Galleri L., Santopietro R., Tiso E., Tosi P. and Petraglia F. Inhibin alpha-subunit and the inhibin coreceptor betaglycan are downregulated in endometrial carcinoma. *Eur J Endocrinol* 152(2):277-284, 2005.
49. Florio P., Severi F.M., Cobellis L., Danero S., Bome A., Luisi S. and Petraglia F. Serum activin A and inhibin A. New clinical markers for hydatidiform mole. *Cancer* 94(10):2618-2622, 2002.
50. Foresta C., Bettella A., Rossato M., La Sala G., De Paoli M. and Plebani M. Inhibin B plasma concentrations in oligozoospermic subjects before and after therapy with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 14(4):906-912, 1999.

51. Fukuda K., Mori M., Uchiyama M., Iwai K., Iwasaka T. and Sugimori H. Prognostic significance of progesterone receptor immunohistochemistry in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 69(3):220-225, 1998.
52. Gal D., Recio F.O., Zamurovic D. and Tancer M.L. Lymphovascular space involvement--a prognostic indicator in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 42(2):142-145, 1991.
53. Hanf V., Kreienberg R., Kaufmann M., Costa S. and Scharl A. Corpus uteri. *Die Gynäkologie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2006, pp. 368-389.
54. Heldin C.H., Miyazono K. and ten Dijke P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471, 1997.
55. Hillier S.G. Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries. *J Endocrinol* 131(2):171-175, 1991.
56. Ishida H., Tashiro H., Watanabe M., Fujii N., Yoshida H., Imamura K., Minowada S., Shinohara M., Fukutani K., Aso Y. and et al. Measurement of inhibin concentrations in men: study of changes after castration and comparison with androgen levels in testicular tissue, spermatic venous blood, and peripheral venous blood. *J Clin Endocrinol Metab* 70(4):1019-1022, 1990.
57. Jaatinen T.A., Penttila T.L., Kaipia A., Ekfors T., Parvinen M. and Toppari J. Expression of inhibin alpha, beta A and beta B messenger ribonucleic acids in the normal human ovary and in polycystic ovarian syndrome. *J Endocrinol* 143(1):127-137, 1994.
58. Jeon Y.T., Park I.A., Kim Y.B., Kim J.W., Park N.H., Kang S.B., Lee H.P. and Song Y.S. Steroid receptor expressions in endometrial cancer: Clinical significance and epidemiological implication. *Cancer Lett*, 2005.
59. Jereczek-Fossa B., Badzio A. and Jassem J. Surgery followed by radiotherapy in endometrial cancer: analysis of survival and patterns of failure. *Int J Gynecol Cancer* 9(4):285-294, 1999.
60. Jones K.L., de Kretser D.M., Patella S. and Phillips D.J. Activin A and follistatin in systemic inflammation. *Mol Cell Endocrinol* 225(1-2):119-125, 2004.
61. Jones R.L., Salamonsen L.A., Critchley H.O., Rogers P.A., Affandi B. and Findlay J.K. Inhibin and activin subunits are differentially expressed in endometrial cells and leukocytes during the menstrual cycle, in early pregnancy and in women using progestin-only contraception. *Mol Hum Reprod* 6(12):1107-1117, 2000.
62. Kaplan E. and Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Am Stat Assoc* 53:457-481, 1958.
63. Kingsley D.M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8(2):133-146, 1994.
64. Kommos F., Oliva E., Bhan A.K., Young R.H. and Scully R.E. Inhibin expression in ovarian tumors and tumor-like lesions: an immunohistochemical study. *Mod Pathol* 11(7):656-664, 1998.
65. Kruskal W.H. and Wallis W.A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Amer. Stat. Ass.* 47:583-621, 1952.
66. Kumanov P., Nandipati K., Tomova A. and Agarwal A. Inhibin B is a better marker of spermatogenesis than other hormones in the evaluation of male factor infertility. *Fertil Steril* 86(2):332-338, 2006.
67. La Rosa S., Uccella S., Billo P., Facco C., Sessa F. and Capella C. Immunohistochemical localization of alpha- and betaA-subunits of inhibin/activin in human normal endocrine cells and related tumors of the digestive system. *Virchows Arch* 434(1):29-36, 1999.

68. Labbe E., Silvestri C., Hoodless P.A., Wrana J.L. and Attisano L. Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell* 2(1):109-120, 1998.
69. Lambert-Messerlian G.M., Steinhoff M., Zheng W., Canick J.A., Gajewski W.H., Seifer D.B. and Schneyer A.L. Multiple immunoreactive inhibin proteins in serum from postmenopausal women with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 65(3):512-516, 1997.
70. Lau A.L., Kumar T.R., Nishimori K., Bonadio J. and Matzuk M.M. Activin betaC and betaE genes are not essential for mouse liver growth, differentiation, and regeneration. *Mol Cell Biol* 20(16):6127-6137, 2000.
71. Lax S.F. and Kurman R.J. A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses. *Verh Dtsch Ges Pathol* 81:228-232, 1997.
72. Lax S.F., Kurman R.J., Pizer E.S., Wu L. and Ronnett B.M. A binary architectural grading system for uterine endometrial endometrioid carcinoma has superior reproducibility compared with FIGO grading and identifies subsets of advanced-stage tumors with favorable and unfavorable prognosis. *Am J Surg Pathol* 24(9):1201-1208, 2000.
73. Lebrun J.J., Takabe K., Chen Y. and Vale W. Roles of pathway-specific and inhibitory Smads in activin receptor signaling. *Mol Endocrinol* 13(1):15-23, 1999.
74. Lewis K.A., Gray P.C., Blount A.L., MacConell L.A., Wiater E., Bilezikjian L.M. and Vale W. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404(6776):411-414, 2000.
75. Ling N., Ying S.Y., Ueno N., Esch F., Denoroy L. and Guillemin R. Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(21):7217-7221, 1985.
76. Ling N., Ying S.Y., Ueno N., Shimasaki S., Esch F., Hotta M. and Guillemin R. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321(6072):779-782, 1986.
77. Lockwood G.M., Ledger W.L., Barlow D.H., Groome N.P. and Muttukrishna S. Identification of the source of inhibins at the time of conception provides a diagnostic role for them in very early pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 40(5):303-308, 1998.
78. Luisi S., Florio P., Reis F.M. and Petraglia F. Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Hum Reprod Update* 11(2):123-135, 2005.
79. Martens J.W., de Winter J.P., Timmerman M.A., McLuskey A., van Schaik R.H., Themmen A.P. and de Jong F.H. Inhibin interferes with activin signaling at the level of the activin receptor complex in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 138(7):2928-2936, 1997.
80. Mason A.J., Farnworth P.G. and Sullivan J. Characterization and determination of the biological activities of noncleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A. *Mol Endocrinol* 10(9):1055-1065, 1996.
81. Mason A.J., Hayflick J.S., Ling N., Esch F., Ueno N., Ying S.Y., Guillemin R., Niall H. and Seeburg P.H. Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta. *Nature* 318(6047):659-663, 1985.
82. Matias-Guiu X., Catusus L., Bussaglia E., Lagarda H., Garcia A., Pons C., Munoz J., Arguelles R., Machin P. and Prat J. Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 32(6):569-577, 2001.
83. Matias-Guiu X., Pons C. and Prat J. Mullerian inhibiting substance, alpha-inhibin, and CD99 expression in sex cord-stromal tumors and endometrioid ovarian

- carcinomas resembling sex cord-stromal tumors. *Hum Pathol* 29(8):840-845, 1998.
84. Matzuk M.M. In search of binding--identification of inhibin receptors. *Endocrinology* 141(7):2281-2284, 2000.
 85. Matzuk M.M., Finegold M.J., Mather J.P., Krummen L., Lu H. and Bradley A. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19):8817-8821, 1994.
 86. Matzuk M.M., Finegold M.J., Su J.G., Hsueh A.J. and Bradley A. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 360(6402):313-319, 1992.
 87. Maxwell G.L., Risinger J.I., Alvarez A.A., Barrett J.C. and Berchuck A. Favorable survival associated with microsatellite instability in endometrioid endometrial cancers. *Obstet Gynecol* 97(3):417-422, 2001.
 88. McCarthy S.A. and Bicknell R. Inhibition of vascular endothelial cell growth by activin-A. *J Biol Chem* 268(31):23066-23071, 1993.
 89. McCluggage W.G., Ashe P., McBride H., Maxwell P. and Sloan J.M. Localization of the cellular expression of inhibin in trophoblastic tissue. *Histopathology* 32(3):252-256, 1998.
 90. McCluggage W.G., Burton J., Maxwell P. and Sloan J.M. Immunohistochemical staining of normal, hyperplastic, and neoplastic adrenal cortex with a monoclonal antibody against alpha inhibin. *J Clin Pathol* 51(2):114-116, 1998.
 91. McLachlan R.I., Robertson D.M., Burger H.G. and de Kretser D.M. The radioimmunoassay of bovine and human follicular fluid and serum inhibin. *Mol Cell Endocrinol* 46(2):175-185, 1986.
 92. Mellor S.L., Cranfield M., Ries R., Pedersen J., Cancilla B., de Kretser D., Groome N.P., Mason A.J. and Risbridger G.P. Localization of activin beta(A)-, beta(B)-, and beta(C)-subunits in human prostate and evidence for formation of new activin heterodimers of beta(C)-subunit. *J Clin Endocrinol Metab* 85(12):4851-4858, 2000.
 93. Mellor S.L., Richards M.G., Pedersen J.S., Robertson D.M. and Risbridger G.P. Loss of the expression and localization of inhibin alpha-subunit in high grade prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 83(3):969-975, 1998.
 94. Meunier H., Cajander S.B., Roberts V.J., Rivier C., Sawchenko P.E., Hsueh A.J. and Vale W. Rapid changes in the expression of inhibin alpha-, beta A-, and beta B-subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle. *Mol Endocrinol* 2(12):1352-1363, 1988.
 95. Michel U., Farnworth P. and Findlay J.K. Follistatins: more than follicle-stimulating hormone suppressing proteins. *Mol Cell Endocrinol* 91(1-2):1-11, 1993.
 96. Minami S., Yamoto M. and Nakano R. Immunohistochemical localization of inhibin-activin subunits in hydatidiform mole and invasive mole. *Obstet Gynecol* 82(3):414-418, 1993.
 97. Morice P., Levy-Piedbois C., Ajaj S., Pautier P., Haie-Meder C., Lhomme C., Duvillard P. and Castaigne D. Value and cost evaluation of routine follow-up for patients with clinical stage I/II endometrial cancer. *Eur J Cancer* 37(8):985-990, 2001.
 98. Morrow C.P., Bundy B.N., Kurman R.J., Creasman W.T., Heller P., Homesley H.D. and Graham J.E. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 40(1):55-65, 1991.

99. Munro L.M., Kennedy A. and McNicol A.M. The expression of inhibin/activin subunits in the human adrenal cortex and its tumours. *J Endocrinol* 161(2):341-347, 1999.
100. Muttukrishna S., Child T.J., Groome N.P. and Ledger W.L. Source of circulating levels of inhibin A, pro alpha C-containing inhibins and activin A in early pregnancy. *Hum Reprod* 12(5):1089-1093, 1997.
101. Muttukrishna S., Hyett J, Paine M, Moodley J, Groome N and C. R. Uterine vein and maternal urinary levels of activin A and inhibin A in pre-eclampsia patients., 2006.
102. Mylonas I., Jeschke U., Shabani N., Kuhn C., Friese K. and Gerber B. Inhibin/activin subunits (inhibin-alpha, -betaA and -betaB) are differentially expressed in human breast cancer and their metastasis. *Oncol Rep* 13(1):81-88, 2005.
103. Mylonas I., Jeschke U., Wiest I., Hoeing A., Vogl J., Shabani N., Kuhn C., Schulze S., Kupka M.S. and Friese K. Inhibin/activin subunits alpha, beta-A and beta-B are differentially expressed in normal human endometrium throughout the menstrual cycle. *Histochem Cell Biol* 122(5):461-471, 2004.
104. Mylonas I., Jeschke U., Winkler L., Makovitzky J., Richter D.U., Briese V. and Friese K. Immunohistochemical expression of inhibin-alpha in human endometrium and the in vitro secretion of inhibin, estradiol and cortisol in cultured human endometrial glandular cells. *Arch Gynecol Obstet* 268(3):142-150, 2003.
105. Mylonas I., Makovitzky J., Fernow A., Richter D.U., Jeschke U., Briese V., Gerber B. and Friese K. Expression of the inhibin/activin subunits alpha (alpha), beta-A (betaA) and beta-B (betaB) in benign human endometrial polyps and tamoxifen-associated polyps. *Arch Gynecol Obstet* 272(1):59-66, 2005.
106. Mylonas I., Makovitzky J., Hoeing A., Richter D.U., Vogl J., Schulze S., Jeschke U., Briese V. and Friese K. Inhibin/activin subunits beta-A (-betaA) and beta-B (-betaB) are differentially localised in normal, hyperplastic and malignant human endometrial tissue. *Acta Histochem* 108(1):1-11, 2006.
107. Mylonas I., Makovitzky J., Richter D.U., Jeschke U., Briese V. and Friese K. Expression of the inhibin-alpha subunit in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue: an immunohistochemical analysis. *Gynecol Oncol* 93(1):92-97, 2004.
108. Mylonas I., Makovitzky J., Shabani N., Richter D.U., Jeschke U., Briese V. and Friese K. Parathyroid hormone-related peptide (PTH-rp) in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue: an immunohistochemical analysis. *Anticancer Res* 25(3A):1633-1638, 2005.
109. Mylonas I., Makovitzky J., Vogel M., Shabani N., Jeschke U. and Friese K. Expression of inhibin/activin subunits, sialyl-lewis A (CA 19-9, sLea) and sialyl-Lewis X (sLex) carbohydrate antigens in a hydatidiform mole with persistent polymorphic trophoblastic hyperplasia. *Anticancer Res* 25(3A):1725-1730, 2005.
110. Mylonas I., Schiessl B., Jeschke U., Vogl J., Makrigiannakis A., Kuhn C., Kunze S., Schulze S., Kainer F. and Friese K. Expression of Inhibin/activin Subunits alpha (-alpha), beta A (-beta (A)) and beta B (-beta (B)) in Placental Tissue of Normal and Intrauterine Growth Restricted (IUGR) Pregnancies. *J Mol Histol* 37(1-2):43-52, 2006.
111. Mylonas I., Schiessl B., Jeschke U., Vogl J., Makrigiannakis A., Kuhn C., Schulze S., Kainer F. and Friese K. Expression of inhibin/activin subunits alpha (-alpha), betaA (-betaA), and betaB (-betaB) in placental tissue of normal, preeclamptic, and HELLP pregnancies. *Endocr Pathol* 17(1):19-33, 2006.
112. Mylonas I., Winkler L., Jeschke U., Briese V. and Friese K. [Investigations on isolation, purification and cultivation of human endometrial cells and on the in

- vitro inhibin expression in glandular epithelial cells]. *Zentralbl Gynakol* 125(10):415-423, 2003.
113. Niimi S., Horikawa M., Seki T., Ariga T., Kobayashi T. and Hayakawa T. Effect of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 25(4):437-440, 2002.
 114. Noll S. and Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. München, Jena, Urban & Fischer, 2000.
 115. Oda S., Nishimatsu S., Murakami K. and Ueno N. Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun* 210(2):581-588, 1995.
 116. Otani T., Minami S., Kokawa K., Shikone T., Yamoto M. and Nakano R. Immunohistochemical localization of activin A in human endometrial tissues during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 91(5 Pt 1):685-692, 1998.
 117. Otani T., Minami S., Yamoto M. and Umesaki N. Production of activin A in hyperplasia and adenocarcinoma of the human endometrium. *Gynecol Oncol* 83(1):31-38, 2001.
 118. Pangas S.A. and Woodruff T.K. Activin signal transduction pathways. *Trends Endocrinol Metab* 11(8):309-314, 2000.
 119. Petraglia F., De Vita D., Gallinelli A., Aguzzoli L., Genazzani A.R., Romero R. and Woodruff T.K. Abnormal concentration of maternal serum activin-A in gestational diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 80(2):558-561, 1995.
 120. Petraglia F., Florio P., Luisi S., Gallo R., Gadducci A., Viganò P., Di Blasio A.M., Genazzani A.R. and Vale W. Expression and secretion of inhibin and activin in normal and neoplastic uterine tissues. High levels of serum activin A in women with endometrial and cervical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 83(4):1194-1200, 1998.
 121. Petraglia F., Garuti G.C., Calza L., Roberts V., Giardino L., Genazzani A.R., Vale W. and Meunier H. Inhibin subunits in human placenta: localization and messenger ribonucleic acid levels during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 165(3):750-758, 1991.
 122. Petraglia F., Luisi S., Pautier P., Sabourin J.C., Rey R., Lhomme C. and Bidart J.M. Inhibin B is the major form of inhibin/activin family secreted by granulosa cell tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83(3):1029-1032, 1998.
 123. Petraglia F., Sawchenko P., Lim A.T., Rivier J. and Vale W. Localization, secretion, and action of inhibin in human placenta. *Science* 237(4811):187-189, 1987.
 124. Phillips D.J. New developments in the biology of inhibins, activins and follistatins. *Trends Endocrinol Metab* 12(3):94-96, 2001.
 125. Phillips D.J. and de Kretser D.M. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol* 19(4):287-322, 1998.
 126. Phillips D.J., Jones K.L., Scheerlinck J.Y., Hedger M.P. and de Kretser D.M. Evidence for activin A and follistatin involvement in the systemic inflammatory response. *Mol Cell Endocrinol* 180(1-2):155-162, 2001.
 127. Phillips D.J. and Woodruff T.K. Inhibin: actions and signalling. *Growth Factors* 22(1):13-18, 2004.
 128. Pisani A.L., Barbuto D.A., Chen D., Ramos L., Lagasse L.D. and Karlan B.Y. HER-2/neu, p53, and DNA analyses as prognosticators for survival in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 85(5 Pt 1):729-734, 1995.
 129. Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 35(6):649-662, 2004.

130. Ramaswamy S., Marshall G.R., McNeilly A.S. and Plant T.M. Evidence that in a physiological setting Sertoli cell number is the major determinant of circulating concentrations of inhibin B in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Androl* 20(3):430-434, 1999.
131. Reis F.M., Cobellis L., Tameirao L.C., Anania G., Luisi S., Silva I.S., Gioffre W., Di Blasio A.M. and Petraglia F. Serum and tissue expression of activin a in postmenopausal women with breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 87(5):2277-2282, 2002.
132. Reis F.M., Luisi S., Carneiro M.M., Cobellis L., Federico M., Camargos A.F. and Petraglia F. Activin, inhibin and the human breast. *Mol Cell Endocrinol* 225(1-2):77-82, 2004.
133. Remmele W. and Stegner H. Vorschlag zur einheitlichen Definierung eines immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe* 8:138-140, 1987.
134. Ridder G.J., Maschek H., Flemming P., Nashan B. and Klempnauer J. Ovarian-like stroma in an invasive mucinous cystadenocarcinoma of the pancreas positive for inhibin. A hint concerning its possible histogenesis. *Virchows Arch* 432(5):451-454, 1998.
135. Risbridger G.P., Ball E.M., Wang H., Mellor S.L. and Peehl D.M. Re-evaluation of inhibin alpha subunit as a tumour suppressor in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 225(1-2):73-76, 2004.
136. Risbridger G.P., Schmitt J.F. and Robertson D.M. Activins and inhibins in endocrine and other tumors. *Endocr Rev* 22(6):836-858, 2001.
137. Risbridger G.P., Shibata A., Ferguson K.L., Stamey T.A., McNeal J.E. and Peehl D.M. Elevated expression of inhibin alpha in prostate cancer. *J Urol* 171(1):192-196, 2004.
138. Risinger J.I., Hayes A.K., Berchuck A. and Barrett J.C. PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 57(21):4736-4738, 1997.
139. Roberts V., Meunier H., Vaughan J., Rivier J., Rivier C., Vale W. and Sawchenko P. Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 124(1):552-554, 1989.
140. Roberts V.J., Barth S., el-Roeiy A. and Yen S.S. Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 77(5):1402-1410, 1993.
141. Roberts V.J., Barth S., el-Roeiy A. and Yen S.S. Expression of inhibin/activin system messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles from women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 79(5):1434-1439, 1994.
142. Robertson D.M., Burger H.G. and Fuller P.J. Inhibin/activin and ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer* 11(1):35-49, 2004.
143. Robertson D.M., Cahir N., Burger H.G., Mamers P. and Groome N. Inhibin forms in serum from postmenopausal women with ovarian cancers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50(3):381-386, 1999.
144. Robertson D.M., Cahir N., Burger H.G., Mamers P., McCloud P.I., Pettersson K. and McGuckin M. Combined inhibin and CA125 assays in the detection of ovarian cancer. *Clin Chem* 45(5):651-658, 1999.
145. Robertson D.M., Cahir N., Findlay J.K., Burger H.G. and Groome N. The biological and immunological characterization of inhibin A and B forms in human follicular fluid and plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 82(3):889-896, 1997.

146. Robertson D.M., Foulds L.M., Leversha L., Morgan F.J., Hearn M.T., Burger H.G., Wettenhall R.E. and de Kretser D.M. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 126(1):220-226, 1985.
147. Robertson D.M., Giacometti M., Foulds L.M., Lahnstein J., Goss N.H., Hearn M.T. and de Kretser D.M. Isolation of inhibin alpha-subunit precursor proteins from bovine follicular fluid. *Endocrinology* 125(4):2141-2149, 1989.
148. Robertson D.M., Hayward S., Irby D., Jacobsen J., Clarke L., McLachlan R.I. and de Kretser D.M. Radioimmunoassay of rat serum inhibin: changes after PMSG stimulation and gonadectomy. *Mol Cell Endocrinol* 58(1):1-8, 1988.
149. Robertson D.M., Hertan R. and Farnworth P.G. Is the action of inhibin mediated via a unique receptor? *Rev Reprod* 5(3):131-135, 2000.
150. Robertson D.M., Stephenson T., Pruyers E., Burger H.G., McCloud P., Tsigos A., Groome N., Mamers P., McNeilage J., Jobling T. and Healy D. Inhibins/activins as diagnostic markers for ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol* 191(1):97-103, 2002.
151. Schmitt J., Hotten G., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G., Pohl J. and Schrewe H. Structure, chromosomal localization, and expression analysis of the mouse inhibin/activin beta C (Inhbc) gene. *Genomics* 32(3):358-366, 1996.
152. Schwall R.H., Robbins K., Jardieu P., Chang L., Lai C. and Terrell T.G. Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. *Hepatology* 18(2):347-356, 1993.
153. Sharpe R.M., Turner K.J., McKinnell C., Groome N.P., Atanassova N., Millar M.R., Buchanan D.L. and Cooke P.S. Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to adulthood: effect of experimental manipulation of Sertoli cell number. *J Androl* 20(1):94-101, 1999.
154. Sherman M.E. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Mod Pathol* 13(3):295-308, 2000.
155. Shih I.M. and Kurman R.J. Immunohistochemical localization of inhibin-alpha in the placenta and gestational trophoblastic lesions. *Int J Gynecol Pathol* 18(2):144-150, 1999.
156. Shiozaki M., Sakai R., Tabuchi M., Shinohara M., Kosaka M., Saito S. and Eto Y. The existence of activin A/erythroid differentiation factor and its inhibitor in human serum: comparison of normal and chronic renal failure sera. *Biochem Biophys Res Commun* 183(1):273-279, 1992.
157. Silver H.M., Lambert-Messerlian G.M., Star J.A., Hogan J. and Canick J.A. Comparison of maternal serum total activin A and inhibin A in normal, preeclamptic, and nonproteinuric gestationally hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 180(5):1131-1137, 1999.
158. Sobin L.H. and Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*, ed 6. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, 2002.
159. Stauber M., Weyerstahl T., Bob A. and Bob K. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart, Thieme, 2001.
160. Sugino K., Nakamura T., Takio K., Miyamoto K., Hasegawa Y., Igarashi M., Titani K. and Sugino H. Purification and characterization of high molecular weight forms of inhibin from bovine follicular fluid. *Endocrinology* 130(2):789-796, 1992.
161. Tanaka T., Toujima S., Otani T., Minami S., Yamoto M. and Umesaki N. Expression and function of activin receptors in human endometrial adenocarcinoma cells. *Int J Oncol* 23(3):657-663, 2003.
162. Tanaka T., Toujima S. and Umesaki N. Activin A inhibits growth-inhibitory signals by TGF-beta1 in differentiated human endometrial adenocarcinoma cells. *Oncol Rep* 11(4):875-879, 2004.

163. Tashiro H., Isacson C., Levine R., Kurman R.J., Cho K.R. and Hedrick L. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 150(1):177-185, 1997.
164. Teni T.R., Sampat M.B. and Sheth N.A. Inhibin (10.7 kD prostatic peptide) in normal, hyperplastic, and malignant human endometria: an immunohistochemical study. *J Pathol* 168(1):35-40, 1992.
165. Thomas T.Z., Wang H., Niclasen P., O'Bryan M.K., Evans L.W., Groome N.P., Pedersen J. and Risbridger G.P. Expression and localization of activin subunits and follistatins in tissues from men with high grade prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 82(11):3851-3858, 1997.
166. Toppari J., Kaipia A., Kaleva M., Laato M., de Kretser D.M., Krummen L.A., Mather J.P. and Salmi T.T. Inhibin gene expression in a large cell calcifying Sertoli cell tumour and serum inhibin and activin levels. *Apmis* 106(1):101-112; discussion 112-103, 1998.
167. Treetampinich C., O'Connor A.E., MacLachlan V., Groome N.P. and de Kretser D.M. Maternal serum inhibin A concentrations in early pregnancy after IVF and embryo transfer reflect the corpus luteum contribution and pregnancy outcome. *Hum Reprod* 15(9):2028-2032, 2000.
168. Tritz D., Pieretti M., Turner S. and Powell D. Loss of heterozygosity in usual and special variant carcinomas of the endometrium. *Hum Pathol* 28(5):607-612, 1997.
169. Truong P.T., Kader H.A., Lacy B., Lesperance M., MacNeil M.V., Berthelet E., McMurtrie E. and Alexander S. The effects of age and comorbidity on treatment and outcomes in women with endometrial cancer. *Am J Clin Oncol* 28(2):157-164, 2005.
170. Tsukazaki T., Chiang T.A., Davison A.F., Attisano L. and Wrana J.L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF-beta receptor. *Cell* 95:779-791, 1998.
171. Vale W., Hseuh A., River C. and Yu J. The inhibin/activin family of hormones and growth factors. In: Sporn M. and Roberts A. (Eds), *Peptide growth factors and their receptors: handbook of experimental physiology*. Springer-Verlag, Berlin, 1990, pp. 211-248.
172. Vale W., Rivier J., Vaughan J., McClintock R., Corrigan A., Woo W., Karr D. and Spiess J. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321(6072):776-779, 1986.
173. Vihko K.K., Blauer M., Puistola U. and Tuohimaa P. Activin B in patients with granulosa cell tumors: serum levels in comparison to inhibin. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82(6):570-574, 2003.
174. Wallace E.M., Crossley J.A., Riley S.C., Balfour C., Groome N.P. and Aitken D.A. Inhibin-B and pro-alphaC-containing inhibins in amniotic fluid from chromosomally normal and Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn* 18(3):213-217, 1998.
175. Wallace E.M., Grant V.E., Swanston I.A. and Groome N.P. Evaluation of maternal serum dimeric inhibin A as a first-trimester marker of Down's syndrome. *Prenat Diagn* 15(4):359-362, 1995.
176. Wang Q.F., Farnworth P.G., Findlay J.K. and Burger H.G. Inhibitory effect of pure 31-kilodalton bovine inhibin on gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-induced up-regulation of GnRH binding sites in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 124(1):363-368, 1989.
177. Wenstrom K.D., Owen J., Chu D.C. and Boots L. Alpha-fetoprotein, free beta-human chorionic gonadotropin, and dimeric inhibin A produce the best results in

- a three-analyte, multiple-marker screening test for fetal Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 177(5):987-991, 1997.
178. Wiater E. and Vale W. Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 278(10):7934-7941, 2003.
 179. Wilson T.O., Podratz K.C. and Gaffey T.A. Evaluation of unfavorable histological subtypes in endometrial adenocarcinomas. *Am J Obstet Gynecol* 162:418-423, 1990.
 180. Worbs S., Shabani N., Mayr D., Gingelmaier A., Makrigiannakis A., Kuhn C., Jeschke U., Kupka M.S., Friese K. and Mylonas I. Expression of the inhibin/activin subunits (-alpha, -betaA and -betaB) in normal and carcinogenic endometrial tissue: possible immunohistochemical differentiation markers. *Oncol Rep* 17(1):97-104, 2007.
 181. Wrana J.L. and Attisano L. The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Review* 11:5-13, 2000.
 182. Yamashita K., Yamoto M., Shikone T., Minami S., Imai M., Nishimori K. and Nakano R. Production of inhibin A and inhibin B in human ovarian sex cord stromal tumors. *Am J Obstet Gynecol* 177(6):1450-1457, 1997.
 183. Yamashita K., Yamoto M., Shikone T., Minami S. and Nakano R. Immunohistochemical localization of inhibin and activin subunits in human epithelial ovarian tumors. *Am J Obstet Gynecol* 180(2 Pt 1):316-322, 1999.
 184. Yamoto M., Minami S., Nakano R. and Kobayashi M. Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 74(5):989-993, 1992.
 185. Yen S.S.C., Jaffe R.B. and Barbieri R.L. *Reproductive Endocrinology*, ed 4. Philadelphia, W.B.Sounders Company, 1999.
 186. Ying S.Y., Zhang Z. and Huang G. Expression and localization of inhibin/activin subunits and activin receptors in the normal rat prostate. *Life Sci* 60(6):397-401, 1997.
 187. Yohkaichiya T., Polson D., O'Connor A., Bishop S., Mamers P., McLachlan V., Healy D.L. and de Kretser D.M. Concentrations of immunoactive inhibin in serum during human pregnancy: evidence for an ovarian contribution. *Reprod Fertil Dev* 3(6):671-678, 1991.
 188. Zaino R.J., Kurman R.J., Diana K.L. and Morrow C.P. Pathologic models to predict outcome for women with endometrial adenocarcinoma: the importance of the distinction between surgical stage and clinical stage--a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 77(6):1115-1121, 1996.
 189. Zaino R.J., Kurman R.J., Diana K.L. and Morrow C.P. The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. *Cancer* (75):81-86, 1995.
 190. Zamboni G., Scarpa A., Bogina G., Iacono C., Bassi C., Talamini G., Sessa F., Capella C., Solcia E., Rickaert F., Mariuzzi G.M. and Kloppel G. Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. *Am J Surg Pathol* 23(4):410-422, 1999.
 191. Zhang Z.W., Findlay J.K., Carson R.S., Herington A.C. and Burger H.G. Transforming growth factor beta enhances basal and FSH-stimulated inhibin production by rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 58(2-3):161-166, 1988.
 192. Zheng W., Sung C.J., Hanna I., DePetris G., Lambert-Messerlian G., Steinhoff M. and Lauchlan S.C. Alpha and beta subunits of inhibin/activin as sex cord-stromal differentiation markers. *Int J Gynecol Pathol* 16(3):263-271, 1997.

193. Ziegler A., Lange S. and Bender R. Überlebenszeitanalyse: Der Log-Rang-Test. Dtsch Med Wochenschr 129:T4-T6, 2004.
194. Ziegler A., Lange S. and Bender R. Überlebenszeitanalyse: Die Cox-Regression. Dtsch Med Wochenschr 129:T1-3, 2004.

8 Anhang

8.1 Vorabpublikationen

- Teilnahme an der Jahrestagung der österreichischen und Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Gynäkologie in Salzburg, Österreich mit einem Postervortrag, März 2005
- Worbs S., Kuhn Ch., Jeschke U., Shabani N., Kunze S., Mylonas I., Friese K.: Die Expression von Inhibin/Activin-Untereinheiten im endometrioiden Adenokarzinom. Speculum 23, S1 (2005) 63-64
- Worbs S., Shabani N., Mayr D., Gingelmaier A., Makrigiannakis A., Kuhn C., Jeschke U., Kupka M.S., Friese K. and Mylonas I. Expression of the inhibin/activin subunits (-alpha, -betaA and -betaB) in normal and carcinogenic endometrial tissue: possible immunohistochemical differentiation markers. Oncol Rep 17(1):97-104, 2007

Danksagung

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. Udo Jeschke für die Überlassung des Themas und die wertvolle Unterstützung und durchgehende Beratung im Rahmen dieser Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. Ioannis Mylonas danke ich für die ausgezeichnete Betreuung und Beratung besonders bei der Auswertung der Immunhistochemie und Unterstützung bei statistischen Fragen.

Frau Christina Kuhn danke ich für die hervorragende Arbeit und unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen, sowie Frau Sandra Schulze und Frau Susanne Kunze, die mir immer mit Rat und Tat zu Seite standen.

Ich danke Frau Margit Mann und Herrn Joachim Sauer für die hilfreiche Unterstützung bei der Umsetzung der Tabellen und Abbildungen in Rahmen der Überarbeitung dieser Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Naim Shabani (zum Zeitpunkt an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilian-Universität München) und Frau Dr. Doris Mayr (Pathologisches Institut der Ludwig-Maximilian-Universität München) für die Überprüfung der HE-Gewebeschnitte und Stichproben der immunhistochemischen Färbung.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Hölzel (Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilian-Universität München) und Herrn Michael Schmidt (Tumorregister München) für die Bereitstellung der Überlebensdaten bedanken.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, Frau Inge Worbs und Dr. Ernst Worbs, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich immer in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Curriculum vitae

SILVIA ANNETTE WORBS

Reinhold-Frank-Str. 6
76133 Karlsruhe

PERSÖNLICHE ANGABEN

| | |
|---------------|------------------|
| Geburtsdatum | 9. Dezember 1976 |
| Geburtsort | Ludwigsburg |
| Familienstand | ledig |

SCHULAUSBILDUNG

| | |
|---------------|---|
| 1983 bis 1987 | Grundschule Mühlacker-Lienzingen |
| 1987 bis 1988 | Mörike Realschule Mühlacker |
| 1988 bis 1993 | Theodor-Heuss-Realschule Kornwestheim |
| 1993 bis 1994 | Wenatchee-Highschool, Washington State, USA; Stipendium des deutschen Bundestages |
| 1994 bis 1997 | Mathilde-Planck-Schule – Ernährungswissenschaftliches Gymnasium, Ludwigsburg, Allgemeine Hochschulreife |

AUSLANDSAUFENTHALT

| | |
|---------------|-----------------------------|
| 1998 bis 1999 | Au-Pair in Bologna, Italien |
|---------------|-----------------------------|

PFLEGEPRAKTIKUM

| | |
|-----------|---|
| März 2000 | Krankenpflegepraktikum im Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart, Kardiologie |
| Aug. 2000 | Krankenpflegepraktikum im Marienhospital Stuttgart, Gynäkologie |

STUDIUM

| | |
|--------------------------|--|
| Okt. 1997 bis April 1998 | Kunstgeschichte an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg |
| April 2000 bis März 2002 | Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg |
| März 2002 | Physikum |
| März 2003 | 1. Staatsexamen |
| April 2003 bis Dez. 2006 | Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München |
| Sep. 2005 | 2. Staatsexamen |
| Nov. 2006 | 3. Staatsexamen |

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

| | |
|----------------|---|
| Seit März 2007 | Assistenzärztin Anaesthesie und operative Intensivmedizin St. Vincenzus Kliniken Karlsruhe |
|----------------|---|

FAMULATUREN

| | |
|--------------------|--|
| Aug. 2002 | Allgemeine Chirurgie Katharinenhospital Stuttgart |
| Feb. 2004 | Kursus der Akupunktur WHO-Training Center, Beijing, China |
| März 2004 | Allgemeinmedizin, Praxis G. Kinner, München |
| Aug. bis Sep. 2004 | Geburtshilfe/Gynäkologie und Tropenmedizin Daredahospital, Tanzania |

PRAKTISCHES JAHR

| | |
|------------------------|---|
| Okt.2005 bis Sep. 2006 | Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus München- Schwabing |
|------------------------|---|

Chirurgie, Policlinico Umberto 1° Rom, Italien
Universitätsklinik "La Sapienza"
Anästhesie, Zentralklinikum Augsburg

FREMDSPRACHEN

Englisch fließend in Wort und Schrift
Italienisch fließend in Wort und Schrift
Französisch Grundkenntnisse
Spanisch Grundkenntnisse

BESONDERE KENNTHNISSE UND TÄTIGKEITEN

| | |
|--------------------------|---|
| April 1998 bis Juli 1998 | Praktikum für Restaurierung von Wandmalerei in Hamburg |
| Aug. 1998 bis Sep. 1998 | Tätigkeit als Pflegehelferin im Altenpflegeheim Kornwestheim |
| 2001 bis 2002 | Tätigkeit als Pflegehelferin in der vorlesungsfreien Zeit im Katharinenhospital Stuttgart |
| 2003 bis 2005 | telefonische Kundenbetreuung bei Directa-Service, Italienische Wertpapiermaklergesellschaft |

PERSÖNLICHE INTERESSEN

Ausdauersport, Literatur, Kunst, Klavierspiel