

Aus dem Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

**Amplifikation von ESR1 im
Endometriumkarzinom
und seine Vorstufen**

Inaugural-Dissertation

Zur
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
Der Medizinischen Fakultät
Der Universität Hamburg-Eppendorf

Von Niloufar Sadat Seyedi Fazlollahi

Hamburg 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01/10/2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD. Dr. R. Simon

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. F. Jänicke

Meiner Familie gewidmet

*„Es gibt mehr Dinge zwischen Himmel und Erde, als Eure Schulweisheit
sich erträumen lässt“*

William Shakespeare

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung.....	8
1.1	Äthiologie des Endometriumkarzinoms.....	9
1.2	Histopathologie des Endometriumkarzinoms.....	10
1.2.1	Östrogenabhängige Endometriumkarzinome.....	10
1.2.2	Östrogenunabhängige Karzinome.....	11
1.2.3	Endometriale Hyperplasien und andere präkanzeröse Läsionen.....	12
1.2.3.1	Vorstufen der Typ-I-Karzinome.....	12
1.2.3.2	Vorstufen der Typ-II-Karzinome.....	14
1.2.4	Lokalisation und Metastasierung des Endometriumkarzinoms.....	14
1.3	Epidemiologie.....	15
1.4.	Tumoreinteilung.....	15
1.5	Klinik und Diagnostik des Endometriumkarzinoms.....	16
1.6	Staging und Therapiemöglichkeiten.....	17
1.6.1	Operative Therapie.....	17
1.6.2	Radiotherapie.....	18
1.6.3	Systemische Chemotherapie.....	19
1.7	Prognose.....	20
1.8	Östrogene und die verschiedenen Östrogenrezeptoren.....	20
1.8.1	Funktion der Östrogene im Körper und speziell im Endometrium.....	20
1.8.2	Die verschiedenen Östrogenrezeptoren (Alpha und beta).....	23

1.8.3	Östrogenrezeptoren und deren Funktion im Endometrium....	25
1.8.4	Östrogenantagonisten (Tamoxifen).....	25
1.8.4.1	Allgemeiner Wirkmechanismus und Pharmakologie von Tamoxifen.....	25
1.8.4.2	Tamoxifen-Auswirkungen auf Uterus und Endometrium.....	27
1.9	Molekularbiologische Ursachen für die Entstehung des Endometriumkarzinoms und seine Vorstufen.....	28
2.	Material und Methoden.....	31
2.1	Gewebekollektiv.....	31
2.2	Immunhistochemie (ICH).....	34
2.3	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH).....	34
2.3.1	p-Bac Kultivierung.....	35
2.3.2	DNA-Extraktion.....	36
2.3.3	Sonden-Labeln.....	37
2.3.4	FISH-Tag1 (Hybridisierung).....	39
2.3.5	FISH-Tag2 (Detektion).....	41
2.4	Statistik.....	43
3.	Resultate.....	44
3.1	ER-Alpha Expression.....	44
3.2	ESR1-Amplifikation.....	47

4.	Diskussion.....	49
5.	Zusammenfassung.....	53
6.	Abkürzungen.....	54
7.	Literatur.....	56
8.	Danksagung.....	63
9.	Eidesstattliche Versicherung.....	64

1. Einleitung

Das Endometriumkarzinom ist in Industrienationen der bedeutendste maligne Tumor bei Frauen. In der EU ist es verantwortlich für 8% der Karzinome und besitzt eine Inzidenz von 28,3/100.000 sowie eine Mortalität von 6,8/100.000.²⁶

Das Endometriumkarzinom besteht aus verschiedene Typen von Neoplasien, welche histologische und morphologische Unterschiede zeigen und jedes durch eine unterschiedliche Pathogenese gekennzeichnet ist.

Östrogenabhängige Tumore (Typ 1) machen die überwiegende Mehrheit der Karzinome aus (>90%). Es handelt sich typischerweise um low-grade Karzinome, sprich gut oder mäßig differenziert und vorwiegend vom endometrioiden Typ. Patientinnen mit dieser Art von Karzinomen sind häufig adipös, Nullipara und haben eine spät einsetzende Menopause. Ebenso sind diese Typ1-Tumoren häufig mit einer Hyperplasie des Endometriums assoziiert, insbesondere der atypischen Hyperplasie. Der zweite Typ von Endometriumkarzinomen (Typ 2) tritt bei älteren postmenopausalen Frauen auf. Er ist in der Regel hochdifferenziert und weist größtenteils seröse und klarzellige Subtypen auf. Typ 2 Tumoren zeigen eine geringere Antwort auf Östrogenstimulation als Typ 1 Tumoren.^{27, 28}

Der Östrogen-Rezeptor Alpha (ER α) spielt eine kritische und vielfältige, bislang jedoch nicht vollständig verstandene Rolle bei der Entstehung des Endometriumkarzinoms. Die meisten Endometriumkarzinome exprimieren den Östrogen-Rezeptor Alpha. Einige dieser Tumoren sprechen besonders auf eine Antiöstrogentherapie, beispielsweise mit Tamoxifen an.^{28, 29} Andererseits stellt jedoch eine Tamoxifen-Therapie ER α -positiver Brustkarzinome einen großen Risikofaktor für die Entwicklung eines endometrialen Karzinoms dar.³⁰ Kürzlich konnten wir zeigen, dass eine Genamplifikation von ESR1 einen Hauptmechanismus für die ER- Alpha Überexpression in Brusttumoren darstellt.³¹ Um zu untersuchen, ob derselbe Mechanismus die Voraussetzung für die Entwicklung anderer östrogenabhängiger Karzinome wie beispielsweise Endometriumkarzinome darstellt, untersuchten wir 368 Endometriumkarzinome in Form von Gewebe Mikro- Arrays (tissue microarrays TMA). Die erhobenen Daten sprechen dafür, dass die Amplifikation von ESR1 in allen Subtypen der Endometrium-Karzinome einen wichtigen Mechanismus darstellt.

1.1 Ätiologie des Endometriumkarzinoms

Ein Endometriumkarzinom entsteht aus Zellen der Schleimhaut des Corpus uteri. Es existieren verschiedene Hypothesen bzw. Risikofaktoren, die für die Entstehung und das Fortschreiten des Endometriumkarzinoms verantwortlich gemacht werden. Ein wesentlicher Faktor ist die Östrogenwirkung bzw. dessen erhöhte Konzentration über einen längeren Zeitraum. Insbesondere schon prämaligne transformierte Zellen reagieren stark auf eine andauernde Östrogenstimulation. Aber auch adenomatöse Hyperplasien, insb. mit Atypien, die auch als Präkanzerosen bezeichnet werden stellen einen Risikofaktor für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms dar.

Weiterhin wird die Entstehung von Adenokarzinomen des Endometriums (mit ca. 80% der häufigste histologische Typ) durch folgende Faktoren positiv beeinflusst: höheres Alter, Nullipara, Adipositas, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, polycystisches Ovarialsyndrom bei jüngeren Frauen, Granulosazelltumor (semimaligner Ovarialtumor, östrogenbildend), Leberzirrhose (durch vermehrte Östrogenkonversion aus Testosteron), Assoziation mit Ovarial- und Mammakarzinomen und dies häufiger in der weißen Bevölkerung.¹

Zusätzlich zu den oben erwähnten Risikofaktoren gibt es auch iatrogene Ursachen, die eine maligne Transformation induzieren können. Eine reine Östrogenmedikation in der Postmenopause geht z.B. mit einem 2fachen Risiko, eine langdauernde Tamoxifen-Medikation sogar mit einem 2- bis 4fach höheren Risiko einher, einen Endometriumkarzinom zu entwickeln. Auch vorangegangene Beckenbestrahlungen werden als Ursache diskutiert.¹ Als letztes kann als molekularbiologische Ursache eine Mutation im p-53-Tumorsuppressorgen, welche zur Entstehung von nicht-hormonabhängigen und entdifferenzierten Karzinomen führt, erwähnt werden.

1.2 Histopathologie des Endometriumkarzinoms

1.2.1 Östrogenabhängige Endometriumkarzinome

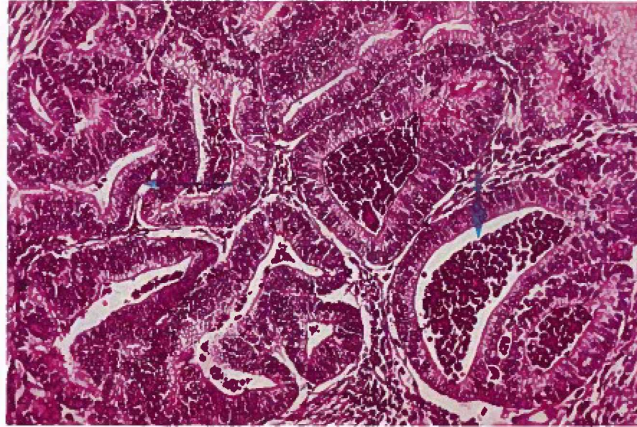
Histopathologisch können zwei Gruppen von Endometriumkarzinomen unterschieden werden. Die östrogenabhängigen- (Typ I) und die östrogenunabhängigen Karzinome (Typ II).

Die erste Gruppe beinhaltet die Adenokarzinome vom endometrioiden Typ (Typ I), die mehr als 80% der Endometriumkarzinome ausmachen und sich als östrogenabhängig herausgestellt haben,¹ sowie das seltenere muzinöse Adenokarzinom (**Abb.1**). Histologisch zeigt das endometrioide Adenokarzinom einen drüsigen Grundaufbau, vielfach auch mit papillären Auffaltungen an der Innenseite der Drüsenlumina. Im Gegensatz zu den serösen Karzinomen zeigt die innere Oberfläche der Drüsen eine glatte Begrenzung, die Zahl der Mitosen ist zumeist gering und nur selten findet man Verhornungen.⁸ Immunhistochemisch exprimieren diese Tumorzellen regelmäßig *Vimentin*, *CK 8*, *18* und *19*, in den meisten Fällen außerdem den Östrogen- und Progesteronrezeptor.⁷ Eine Expression von p53 ist in der Regel nicht nachweisbar, nur in Fällen eines G3-endometrioiden Karzinoms.⁷ Der häufigsten endometrioiden Form des Endometriumkarzinoms geht eine klar definierte Vorstufen voraus, nämlich die "adenomatöse Hyperplasie".² Nach der WHO-Klassifikation wird zwischen der einfachen Hyperplasie mit einem Karzinomrisiko von < 1%, der komplexen Hyperplasie (Karzinomrisiko zwischen 5% und 10%) und der atypischen Hyperplasie (Karzinomrisiko etwa 30%) unterschieden.³ Die adenomatöse Hyperplasie entsteht ausschließlich bei einem Überangebot oder einer anhaltenden Alleinwirkung von Östrogenen bei Fehlen von Progesteron.² Exogene Ursachen sind somit die kontinuierliche alleinige Zufuhr aller natürlicher und künstlicher Derivate des Östrogens. Endogene Ursachen des alleinigen oder anhaltend überschießenden Östrogenstimulus können ihrerseits in 3 Gruppen unterteilt werden. Durch vermehrte Produktion des Hormons (im Ovar durch Follikelatresien und Thekazellwucherungen, Stein-Leventhal-Syndrom, hypophysäre Störung der LH-Sekretion mit Unterdrückung der Ovulationen und gehäuften Follikelpersistenz usw.), durch vermehrte Speicherung und Produktion im Fettgewebe bei Adipositas und letztendlich durch den

unvollständigen Abbau durch Leberschaden, z.B. bei Leberzirrhose. Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass nicht nur die Dauer der Einnahme, sondern auch die Höhe der Dosierung eine entscheidende Rolle bei der Karzinomentstehung spielt.²

**7.46 Adenokarzinom des Endometriums:
Uterus**

Adenokarzinome des Endometriums treten hauptsächlich bei älteren Frauen auf. Frauen, die nie geboren haben, neigen eher zur Entwicklung von Karzinomen des Corpus uteri als Frauen, die geboren haben. Das Neoplasma tritt mitunter als umschriebener Herd im Uterus auf. Häufiger aber ist der vergrößerte Uterus von einer dicken, knotigen Tumorschicht ausgekleidet. Der Tumor neigt zu Blutungen; oft finden sich ausgedehnte Nekroseherde. Diese Tumormassen füllen das Cavum uteri aus. Sie bestehen aus dichtgelagerten, atypischen Drüsenläschen in sogenannter *dos-à-dos*-Stellung. Die zylindrischen Karzinomzellen (→) zeigen oft Mitosefiguren. In drüsenartigen Hohlräumen finden sich Zelltrümmer (→). Das spärliche bindegewebige Stroma ist von einigen Leukozyten durchsetzt. HE x 120



**7.47 Adenokarzinom
mit Plattenepithelmetaplasie:
Corpus uteri**

Bei etwa einem Viertel der Adenokarzinome des Corpus uteri erfahren die Zylinderepithelzellen eine Plattenepithelmetaplasie („Adenoakanthom“). Hier infiltriert ein gut differenziertes Adenokarzinom (→) das sehr zellreiche Myometrium (→). Plattenepithelstränge (→) ohne besonders malignen Aspekt begleiten das Adenokarzinom. Die Prognose dieses Tumortyps wird von der Adenokarzinomkomponente bestimmt, und nicht von der Anwesenheit metaplastischer Plattenepithelien. HE x 135

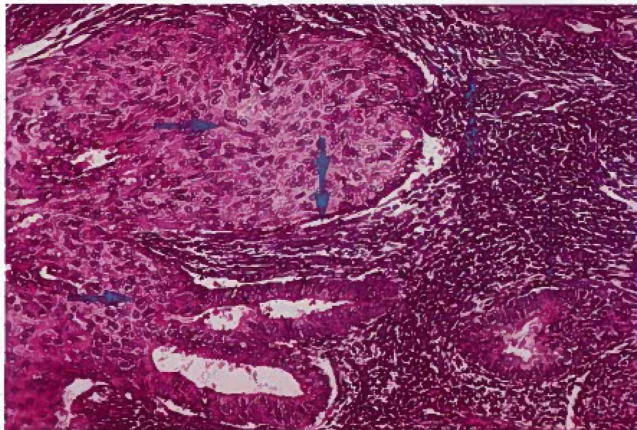


Abbildung 1 : Adenokarzinom des Endometriums
(Quelle: Atlas der Histopathologie, Curran, Springer Verlag)

1.2.2 Östrogenunabhängige Karzinome

Die zweite Gruppe, auch als Typ II bezeichnet, sind östrogenunabhängige Endometriumkarzinome. Hierzu gehören die klarzelligen- und die serös-papillären Karzinome. Dabei entwickeln sich die klarzelligen Karzinome aus *endozervikalen Metaplasien* im Endometrium, die analog zur Zervixschleimhaut unter dem Einfluss von synthetischen Gestagenen und Antiöstrogenen (z.B. Tamoxifen) zu überschießenden Proliferationen stimuliert werden.² Demgegenüber stehen die serös-

papillären Karzinome, die offenbar unabhängig von jeglicher hormoneller Stimulation, wahrscheinlich unter dem Einfluss altersbedingter Karzinogene ähnlich wie beim gleichnamigen Ovarialkarzinom, entstehen.² Häufig lassen sich bei dieser Form c-myc-Amplifikationen (ein Protoonkogen) und p53-Überexpressionen (ein Tumorsuppressorgen) nachweisen.² Histologisch sind unter den serösen Adenokarzinomen häufig mehrkernige Tumorzellen zu beobachten, die stark atypische Zellkerne und eine stark erhöhte mitotische Aktivität aufweisen.⁸ Immunhistochemisch findet sich bei den serösen Karzinomen eine diffuse Expression von Zytokeratin (CK) 7, p53 (in nahezu allen Zellkernen positiv) und p16 sowie eine Überexpression von HER2/neu in zahlreichen Fällen .⁴²

Als Vorstufe der serösen Tumoren gilt das „endometriale intraepitheliale Karzinom (EIC)“. ³ Die östrogenunabhängigen Typ II Karzinome sind geringer differenziert (meist entdifferenziertes G3 Stadium) als die östrogenabhängigen Karzinome und ahmen Gewebemuster ovarieller Tumoren in Form serös-papillärer und klarzelliger Karzinome nach. Sie sind aber auch mit einer schlechteren Prognose verbunden als die östrogenabhängigen Karzinome und betreffen vorwiegend ältere Patienten.¹

1.2.3 Endometriale Hyperplasien und andere präkanzeröse Läsionen

1.2.3.1 Vorstufen der Typ I- Karzinome

Wie oben bereits erwähnt, ist der entscheidende Faktor für die Entstehung der adenomatösen Hyperplasie der Hyperöstrogenismus. Makroskopisch ist das hyperplastische Endometrium breiter als 5 mm und kann das Endometrium diffus oder herdförmig betreffen.⁴

Histologisch unterscheidet man die folgenden drei Hyperplasieformen

(Abbildung 2) :

1. einfache Hyperplasie (früher: glandulär-zystische Hyperplasie), 2. komplexe Hyperplasie (früher: adenomatöse Hyperplasie) und 3. atypische Hyperplasie (einfache/komplexe Hyperplasie mit Atypien).⁴

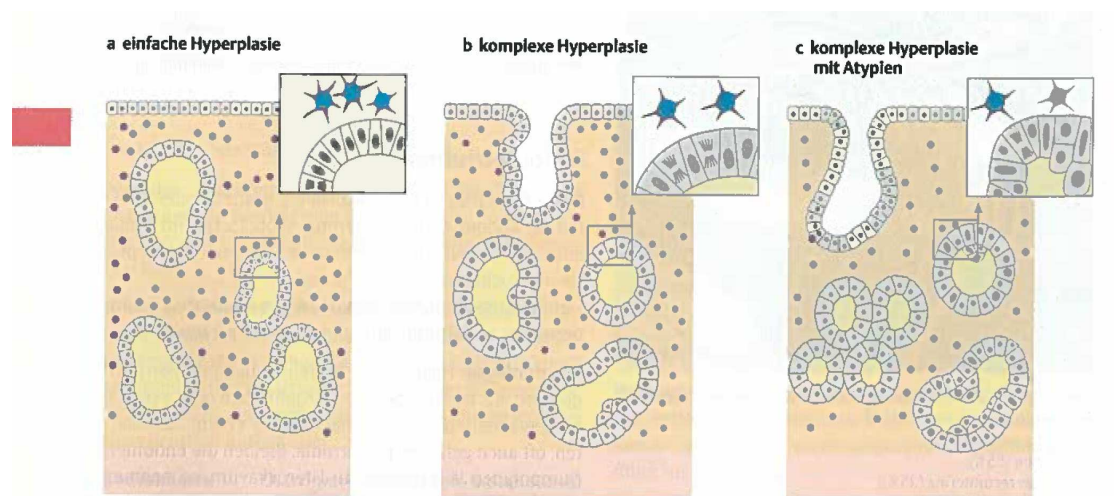


Abb. 15.17 **Formen der Endometriumhyperplasie:** Bei allen ist die Schichtung in Zona spongiosa und compacta aufgehoben. Von der einfachen (a) zur komplexen (b) Hyperplasie nehmen die Zahl der Drüsen pro Flächeneinheit und die Mitoseaktivität zu, der Anteil des Stromas nimmt ab. Bei der atypischen adenomatösen Hyperplasie (c) finden sich Epithelatypien sowie eine Dos-à-Dos-Stellung der Drüsen und intra-papilläre Epithelwucherungen (vgl. Abb. 15.18 b).

Abbildung 2 : Formen der Endometriumhyperplasie

(Quelle: Allgemeine und spezielle Pathologie, U. Riede, Thieme Verlag, 5. Auflage)

Bei der *einfachen Hyperplasie* ist das Endometrium ausgesprochen verdickt und lässt schon bei schwacher Vergrößerung eine zystische Durchsetzung (Schweizer-Käse-Aspekt) erkennen.⁴ Das Drüsenepithel ist (abhängig vom Dilatationsgrad der Zysten) einreihig bis mehrschichtig und zeigt, zusammen mit dem reichlichen Stroma, die Charakteristiken der späten Proliferationsphase. Die einfache Hyperplasie kann in die komplexe Hyperplasie übergehen.⁴

Bei der *komplexen Hyperplasie* werden die mitotisch aktiven Drüsen von einem mehrreihigen Zylinderepithel ohne Kernatypien ausgekleidet. Sie entsprechen histologisch Drüsen in der Proliferationsphase.⁴ Diese sind meist englumig und werden nur noch durch wenig Stroma voneinander getrennt. Dazwischen findet man Herde endometrialer Schaumzellen. Diese endometrialen Schaumzellen sind Ausdruck der Östrogenstimulation. "Schaumzellen" nennt man phagozytierende Zellen, die in ihrem Zytoplasma größere Mengen an Lipidtröpfchen aufweisen und dadurch im histologischen Präparat ein "schaumiges" Inneres zeigen.⁵ Bei der *atypischen Hyperplasie* findet man zusätzlich zum histologischen Bild der einfachen oder der komplexen Hyperplasie Atypien der Epithelzellkerne.⁴ Die Kerne sind vergrößert, polymorph, abgerundet (statt oval), zeigen scholliges-Chromatin und

deutliche Nukleolen.⁴ Die Abgrenzung einer komplexen Hyperplasie mit Atypien vom Frühstadium eines hochdifferenzierten Adenokarzinoms kann schwierig sein. Postmenopausale Patientinnen werden deshalb heute bei beiden Diagnosen hysterektomiert.⁴

1.2.3.2 Vorstufen der Typ-II-Karzinome

Allgemein wird das *endometriale intraepitheliale Karzinom (EIC)* als Vorstufe des serösen Karzinoms angesehen, auch wenn einige Autoren bereits bei dieser Veränderung von der frühesten Form des serösen Adenokarzinoms ausgehen.³

Histopathologisch findet sich eine teils flache, teils papilläre Proliferation stark atypischer Zellen, die positiv für p53 und p16 reagieren.⁴³ Durch die Einführung des Terminus “endometriale intraepitheliale Neoplaste (EIN)” (durch die Gruppe um G.L. Mutter, Boston) als Vorstufe des endometrioiden Karzinoms, ist es schon mehrfach zu Missverständnissen zwischen Pathologen und Klinikern gekommen, so dass der Begriff “seröses intraepitheliales Karzinom” dem Begriff des “endometrialen intraepithelialen Karzinoms” vorzuziehen ist. Alternativ könnte man auch von einem “serösen carcinoma in situ” sprechen.⁴⁴

Eine eindeutige Vorstufe des klarzelligen Adenokarzinoms ist noch nicht definiert.⁴⁵

Bislang gelang es nur Fadare et al., ein Spektrum atypischer endometrialer glandulärer und oberflächlicher Veränderungen zu definieren, die häufig mit einem klarzelligen Adenokarzinom oder anderen endometrialen Malignomen assoziiert waren.⁴⁵

1.2.4 Lokalisation und Metastasierung des Endometriumkarzinoms

Die meisten Endometriumkarzinome nehmen ihren Ausgang vom Fundus oder Tubenwinkel, wachsen überwiegend exophytisch in Richtung Uteruslumen (können jedoch auch in Richtung des Myometriums einwachsen). Dann können sie in die Zervix/Vagina, Tuba uterina und bis zu den Ovarien vorwachsen und sogar das

Perimetrium durchbrechen, mit der Folge des peritonealen Metastasierung und Infiltration von Harnblase oder Rektum.

Die Metastasierung des Endometriumkarzinoms erfolgt etwas später als beim Zervixkarzinom.¹ Die primäre Metastasierung erfolgt zunächst lymphogen in den Beckenlymphknoten und somit den iliakalen, sacralen und parametrialen Lymphknoten sowie paraaortal. Erst später folgt die hämatogene Metastasierung in die Lunge (über die V. cava inferior), Leber, Knochen und Gehirn.

1.3. Epidemiologie

Während die Inzidenz des Zervixkarzinoms in den letzten Jahrzehnten weltweit aufgrund von nationalen Screening-Programmen deutlich abgenommen hat, wird allgemein eine Zunahme des Korpuskarzinoms beobachtet, so dass diese inzwischen die häufigste maligne Erkrankung des weiblichen Genitaltraktes ist.⁸ Im Jahre 2007 wurden in den USA etwa 39.000 Fälle von Korpuskarzinomen registriert, in Deutschland treten etwa 11.700 Fälle pro Jahr auf.⁸ Jährlich sterben 42000 Frauen weltweit an dieser Erkrankung; dies sind nur 1,9% aller krebsbedingten Todesfälle des weiblichen Geschlechts. Das mittlere 5-Jahres-Überleben wird in den Ländern mit der höchsten Inzidenz zwischen 72% in Europa und 84% in den USA angegeben.³ Prädisponiertes Alter ist die Postmenopause (ca. 75% der Fälle).¹ Generell liegt der Altersgipfel zwischen 50-70 Jahren.¹ Mit zunehmendem Alter nimmt auch das Risiko zu, ein Endometriumkarzinom zu entwickeln.¹

1.4. Tumoreinteilung

Die Einteilung des Endometriumkarzinoms erfolgt nach unterschiedlichen Gesichtspunkten. Sie wird nach dem histopathologischen Grading (nach der WHO) in:

- G1: gut differenzierter Tumor (typisches Adenokarzinom)
- G2: mäßig differenzierter Tumor

- G3: undifferenzierter anaplastischer Tumor.

Nach dem Hormonverhalten werden:

- Typ I-Karzinome: östrogenabhängige
- Typ II-Karzinome: östrogenunabhängige

unterschieden, die ausführlich unter Punkt 1.2 behandelt wurden.

Eine weitere Einteilung erfolgt nach FIGO. Bei dieser Klassifikation unterscheidet man vier Stadien, T1 bis T4. In jedem Stadium gibt es Untereinteilungen, die die Eindringtiefe ins Gewebe beschreiben (**Tab. FIGO-Stadien**).

1.5. Klinik und Diagnostik des Endometriumkarzinoms

Ein häufiges Symptom, welches in der Postmenopause beim Vorliegen eines Endometriumkarzinoms beobachtet wird, sind postmenopausale vaginale Blutungen (jede Blutung nach den Wechseljahren ist Karzinomverdächtig und sollte abgeklärt werden!). Prämenopausale Symptome sind, Menorrhagie (verlängerte Menstruation), Metrorrhagie (Dauerblutung, Zwischenblutungen) und Schmierblutungen.¹ Weitere Symptome sind wehenartige Unterbauchschmerzen, evt. aber auch ein dunkler fötide riechender Fluor vaginales.¹

Zur Abklärung jeder postmenopausalen Blutung und jeder Blutungsanomalie bei prämenopausalen Patientinnen sind somit folgende Untersuchungen generell notwendig:

- Gynäkologische Untersuchung zur Abklärung, ob die Blutung aus dem Uterus kommt und ob das Karzinom über den Uterus hinaus ausgedehnt ist.³
- Transvaginale Sonographie zur Beurteilung des Endometriums und zum Ausschluss anderer pathologischer Prozesse im Bereich des Beckens (Ovarialtumor, Tubenprozess).
- Hysteroskopie und fraktionierte Abrasio. Bei klinisch eindeutigem Karzinom kann auf die Hysteroskopie verzichtet werden.³

1.6. Staging und Therapie

Zum prätherapeutischen Staging des Endometriumkarzinoms gehören eine Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen, Abdominalsonographie zum Ausschluss einer Harnstauung und einer (seltenen) Metastasierung in die parenchymatösen Oberbauchorgane und eine Zystoskopie und Rektoskopie fakultativ zum Ausschluss eines Stadium IVA.³ Es muss ergänzt werden, dass der Nutzen einer Computertomographie oder Kernspintomographie des Abdomens sowie einer Positronenemissionstomographie (PET) im Staging nicht bewiesen ist, wenn jedoch aufgrund einer ausgeprägten Komorbidität eine primäre Strahlentherapie geplant ist, kann eine Kernspintomographie zur Therapieplanung hilfreich sein.³ Als Tumormarker können Ca 72-4, Ca 125 und CEA bestimmt werden.¹ Hier weichen die Meinungen aber stark auseinander, sodass für einige Autoren die Tumormarker beim Endometriumkarzinom keinen Stellenwert einnehmen.¹³

Die Entscheidung über die adäquate Therapie erfolgt interdisziplinär unter Einbeziehung der gynäkologischen Onkologie, der Strahlentherapie, der Anästhesiologie und der Pathologie. Berücksichtigt werden müssen Allgemeinzustand und Lebenssituation der Patientin sowie das Stadium der Erkrankung und die Risikofaktoren. In der Primärsituation wird die operative Therapie grundsätzlich durchgeführt. Bei Kontraindikationen zur Operation, Hochrisikopatientinnen oder in der palliativen Situation ist eine alleinige oder zusätzliche Strahlentherapie indiziert. Medikamentöse Therapien sind risikoadaptiert durchzuführen.³

1.6.1 Operative Therapie

In Deutschland hat sich die stadienadaptierte operative Behandlung etabliert, d.h., unter Beachtung des Tumorstadiums (nach FIGO), des Allgemeinzustands und der Kontraindikationen sollte stets die operative Therapie angestrebt werden.¹³ Die abdominelle Hysterektomie mit beidseitiger Adnektomie sowie die pelvine und paraaortale Lymphonodektomie, welche mit einer Verbesserung der Prognose verbunden ist, stellt dabei die Basisoperation dar.³ In den Stadien pT1a bzw. pT1b, G1 oder G2 ist die LN fakultativ.³ Auch in nicht mehr kurablen fortgeschrittenen

Stadien ist eine operative Intervention (Hysterektomie im Sinne der Blutungsprophylaxe; Debulking von großen Tumormassen) meist mit einem Nutzen für die Patientin verbunden und verbessert die Effektivität anderer palliativer Maßnahmen.³ Ist durch die präoperative fraktionierte Abrasio ein seröses oder klarzelliges Karzinom gesichert worden, sollte zusätzlich eine Omentektomie sowie die Entnahme multipler Peritonealbiopsien (inklusive Zwerchfellkuppeln) erfolgen.³

1.6.2 Radiotherapie

Bei der Strahlentherapie des Endometriumkarzinoms muss man zwischen einer adjuvanten- und einer neoadjuvanten Therapie unterscheiden. Bei inoperablen Patientinnen besteht die Indikation zu einer primär kombinierten Strahlentherapie (also neoadjuvante Therapie) aus Teletherapie (perkutane Strahlentherapie) und einer Brachytherapie (vaginale Kontaktbestrahlung).³

Eine adjuvante Strahlentherapie wird in den Stadien *pT1a G1/2 und pT1b G1 Nx/cN0* generell nicht empfohlen.³ Eine alleinige Brachytherapie wird standardmäßig in den Stadien *pT1b G2 Nx/nN0* durchgeführt.³ Eine kombinierte Tele- und Brachytherapie wird ab dem Stadium *pT1a G3, 1b G3 Nx/cN0* empfohlen, wobei erwähnt werden muss, dass beim Vorliegen eines serösen- oder klarzelligen Karzinoms unabhängig vom Tumorstadium die Indikation für eine Teletherapie ± Brachytherapie und/oder Chemotherapie gegeben ist.³ Die adjuvante Strahlentherapie hat einen günstigen Effekt auf die Reduzierung des lokoregionären Rezidives.³

1.6.3 Systemische Chemotherapie

Hier unterscheidet man zwischen einer adjuvanten und einer palliativen Therapie. Eine adjuvante endokrine Therapie mit Gestagenen hat keinen gesicherten Nutzen.³ In einer Studie konnte für Patientinnen mit optimal operiertem Endometriumkarzinom der Stadien III und IV (keine hämatogenen Metastasen) ein Vorteil durch eine adjuvante Chemotherapie (Adriamycin plus Cisplatin) gegenüber einer Ganzabdomenbestrahlung mit Becken- und paraaortalem Boost nachgewiesen werden. Dies galt auch für High-risk-Karzinome, und stellt eine gute Alternative zur Strahlentherapie dar.³ Für die palliative Therapie gilt: Sind bei einem Rezidiv oder bei Metastasen eine Operation und/oder eine Strahlentherapie nicht mehr möglich, wird bei progesteronrezeptorpositiven Karzinomen und asymptomatischen Metastasen die Therapie mit Gestagenen empfohlen.³ Bei Progression unter endokriner Therapie, bei rezeptornegativen Tumoren und bei symptomatischen und lebensbedrohlichen Tumormanifestationen kann eine palliative Chemotherapie sinnvoll sein.³

Es muss jedoch erwähnt werden, dass angesichts der fehlenden oder nur marginalen Effekte auf das Gesamtüberleben, die Indikation für systemische Kombinations-Chemotherapien streng zu stellen ist.³

1.7. Prognostische Faktoren

Die 5-JÜR aller Endometriumkarzinome beträgt im Mittel etwa 78%.¹ Bei Diagnosestellung befinden sich 85% im Stadium FIGO I (80-90%ige 5-JÜR) und FIGO II (65%ige 5-JÜR) und haben somit eine sehr gute Prognose.¹ Nur etwa 15% der Endometriumkarzinome werden im Stadium FIGO III (45%ige 5-JÜR) und FIGO IV (20%ige 5-JÜR) mit einer schlechten Prognose diagnostiziert.¹ Etablierte Prognosefaktoren des Endometriumkarzinoms sind der Progesteronrezeptorgehalt, der Östrogenrezeptorgehalt, das histologische Tumorgrading, der histologische Tumortyp, der Einbruch des Tumors in Lymph- und/oder Blutgefäße, die myometrale Invasionstiefe des Tumors, das Lebensalter zum Diagnosezeitpunkt und das Tumorstadium.¹⁴ Das Tumorstadium (nach FIGO) ist der relevanteste und gesicherte Prognosefaktor.¹⁴ Das rezidivfreie Intervall wird seinerseits sehr stark vom Differenzierungsgrad des Tumors bestimmt.¹⁴ Endometriumkarzinome mit dem Tumorgrading G1 besaßen in einer Studie von Lurain et al, ein 5-Jahres rezidivfreies Überleben von 92%, G2-Tumoren von 86% und mit G3-Tumoren von 64%.¹⁴

Die Invasionstiefe ist ein weiterer wichtiger Prognosefaktor des Endometriumkarzinoms. Je tiefer die Invasion ins Myometrium, desto wahrscheinlicher wird eine Lymphknotenmetastase und desto schlechter die Prognose.¹⁴ Daher stellt auch eine Lymphknotenmetastase einen wichtigen prognostischen Faktor dar. Die 5-Jahresüberlebensrate von Patientinnen mit Lymphknotenbefall liegt mit 28,6% deutlich unter der 5-Jahresüberlebensrate für Patientinnen ohne nachweisbaren Lymphknotenbefall (93.0%).¹⁴ Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor ist der histologische Typ des Endometriumkarzinoms. Während die serösen- und die klarzelligen Karzinome mit einer schlechteren Prognose verbunden sind, zeigen die Adenokarzinome, insbesondere vom endometrioiden Typ, eine gute Prognose.

Weiterhin ist auch der Hormonrezeptorstatus von Bedeutung. Der Nachweis des Östrogen- und Progesteronrezeptors zeigt, dass ein funktionell intakter Rezeptor und Aktivierungssystem vorliegt, denn der Progesteronrezeptor wird als Produkt des aktivierten Östrogenrezeptors gebildet.¹⁴ Zusätzlich liegt bei einem hohen Rezeptorstatus eine höhere Ansprechwahrscheinlichkeit des Endometriumkarzinoms

auf eine endokrine Therapie vor.¹⁴ Insgesamt gesehen haben Östrogen- und Progesteronrezeptor-positive Tumoren daher eine günstigere Prognose als Rezeptor-negative Tumoren.¹⁴

1.8 Östrogene und verschiedene Östrogenrezeptoren

1.8.1 Funktion der Östrogene im Körper und speziell im Endometrium

Östrogene sind die wichtigsten weiblichen Sexualhormone aus der Klasse der Steroidhormone. Das in der Leber über verschiedene Zwischenstufen aus Acetyl-CoA entstehende Cholesterin, welches die Basis für die Biosynthese der verschiedenen Steroidhormone bildet, wird durch Lipoproteine zu den endokrinen Drüsen transportiert.¹⁵ Den Hauptbildungsort der Östrogene (95% des Serumestradiols und 99% des Estrons) stellt das Ovar dar. Weitere Produktionsorte des Östrogens im Körper sind die Nebennieren, Hoden, Fettgewebe und Plazenta.¹⁷

Die Produktion und Freisetzung wird seinerseits durch Gonadoliberin, einem Dekapeptid aus dem Hypothalamus, gesteuert. Im Hypophysenvorderlappen werden daraufhin die beiden Gonadotropine, Follikel stimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH) freigesetzt, die die Produktion von Östrogenen im Ovar anregen.¹⁷ 17 β -Estradiol (E₂) ist das bedeutendste und physiologisch wirkstärkste Östrogen.¹⁷ Östrogene zeichnen sich durch eine genitale und eine extragenitale Wirkung aus. Eine der wichtigsten Funktionen erfüllt E₂ im Zusammenspiel mit Progesteron im Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-System bei der Vorbereitung des Endometriums des Uterus auf die Implantation eines befruchteten Eies.¹⁵ Hier steuert es während des monatlichen Menstruationszyklus die Sequenz von Wachstum (proliferative Phase), Differenzierung (sekretorische Phase) und Rückbildung (Menstruation) des Endometriums.¹⁷

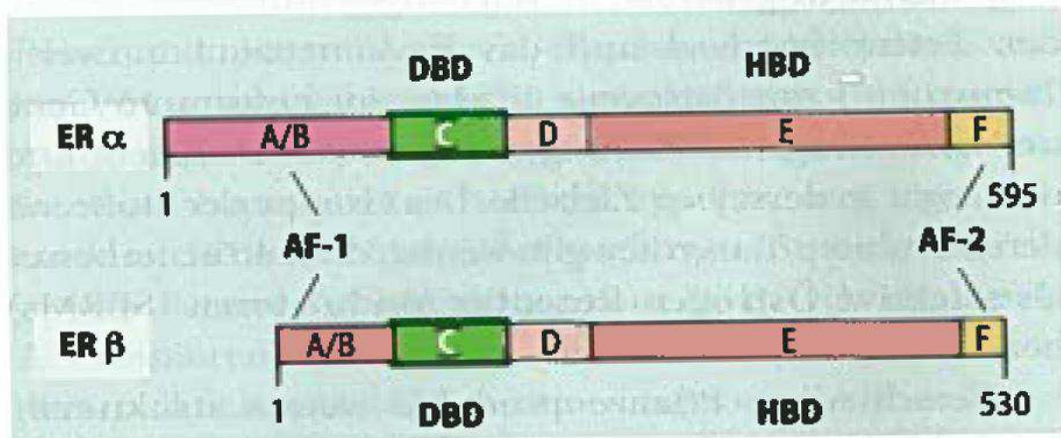
Im Uterus verdickt sich unter dem Einfluss von Östrogen die Schleimhaut, Drüsen vermehren sich und wachsen in die Länge und es bilden sich Spiralarterien.¹⁷ Auch die Expression der Östrogenrezeptoren (ERs) und des Progesteronrezeptors (PR) sind zyklischen Schwankungen unterworfen, so dass die Expressionsrate des ER α zur Zyklusmitte hin ansteigt und seine maximale Konzentration im späten Abschnitt der proliferativen Phase des Endometriums erreicht, um nach der Ovulation wieder abzufallen.¹⁸ Neben dem Uterus werden in weiteren klassischen östrogensensitiven Geweben wie den Mammæ und der Vagina die Östrogenrezeptoren verstärkt exprimiert. In der Brustdrüse z.B. bewirkt die Aktivierung der Östrogenrezeptoren eine Stimulation von Wachstum und Differenzierung des Gangepithels.¹⁵ In der

Vagina bewirken Östrogene eine Verdickung der Schleimhaut und eine vermehrte Abstoßung glykogenhaltiger Epithelzellen, was über eine vermehrte Milchsäureproduktion der Döderlein-Bakterien in der Vagina zu einem sauren Milieu führt, wodurch die Infektionsgefahr herabgesetzt wird.¹⁵ Zur extragenitalen Wirkung von Östrogenen gehört die verstärkte Mineralisierung des Knochens, das Verschließen der Epiphysenfugen und die Beeinflussung des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie zahlreiche weitere Funktionen im Herz-Kreislaufsystem und des Fettstoffwechsels.

1.8.2 Die verschiedenen Östrogenrezeptoren (ER-alpha, ER-beta)

Es existieren zwei unterschiedliche Formen von Östrogen-Rezeptoren, der **ER-alpha**- und der **ER-beta-Rezeptor**, die jeweils durch das **ESR1**- und **ESR2-Gen** kodiert werden. Diese beiden Gene liegen auf zwei unterschiedlichen Chromosomen, während das ESR1-Gen auf **Chromosom 6 q24-q27** liegt, ist das ESR2-Gen auf **Chromosom 14 q21-q22** lokalisiert. Die Östrogenrezeptorsubtypen ER α und ER β gehören zu der Superfamilie der primär kernständigen Rezeptoren („nuclear receptors“).⁴⁶ Sie stellen somit ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren dar, die gewebespezifische Antworten auf 17 β -Estradiol vermitteln.⁴⁷ Östrogenrezeptoren sind jedoch nicht ausschließlich im Zellkern lokalisiert, sondern haben auch im Zytoplasma und in der Plasmamembran spezifische Einflüsse auf Signaltransduktionskaskaden.⁴⁸ Molekulare und biochemische Analysen haben gezeigt, dass Östrogenrezeptoren, sowie andere Mitglieder der Superfamilie der primär kernständigen Rezeptoren auch aus sechs Domänen (A-F) bestehen (**Abb. 3**).⁴⁹

Abbildung 3: Der Östrogenrezeptor- α und - β im Vergleich
(Quelle: Biochemie und Pathobiochemie, Löffler, Springer Verlag, 8. Auflage)



Der ER α liegt im Zellkern zunächst in seiner inaktiven Form vor, die durch die Assoziation mit einer Vielzahl von „heat shock“ Proteinen (hsp) wie z.B. hsp 90 oder hsp 56 charakterisiert ist.¹⁵ Diffundieren nun Östrogene in die Zelle, lagern sie sich an die hsp- Rezeptor-Komplexe an, wodurch diese dissoziieren und sich zu Dimeren verbinden.¹⁵ Die so entstandenen Homodimere interagieren über ein doppeltes Zinkfingermotiv mit EREs in der Promotorregion östrogensensitiver Gene. Nach Anlagerung von koregulierenden Proteinen an die AF-2 kann nun die Transkription der Zielgene beeinflusst werden.¹⁵ Die Expression der beiden Rezeptoren unterscheidet sich von Gewebe zu Gewebe: Granulosazellen und in Entwicklung begriffene Spermatiden exprimieren vorwiegend Typ- β -Rezeptoren, welcher auch in Nieren, Darmmukosa, Lungenparenchym, Knochenmark, Knochen, Gehirn, Endothelzellen und Prostata nachweisbar sind.¹⁸ Dagegen enthalten Endometrium, Mammatumorzellen und Stroma der Ovarien vorwiegend Typ-alpha Rezeptoren.¹⁸ Für lange Zeit glaubte man, dass der ER α ein einzelner Vermittler der physiologischen Effekte von Östrogenen sei. 1996 wurde jedoch ein weiterer Östrogenrezeptorsubtyp in der Prostata von Ratten entdeckt.¹⁵ Wie der ER α hat auch der ER β die für kernständige Rezeptoren typische Grundstruktur, bestehend aus fünf Domänen und den beiden Transaktivierungsdomänen AF-1 und AF-2.¹⁸

1.8.3 Östrogenrezeptoren und deren Funktion im Endometrium

Wie oben schon erwähnt, erfüllen die Östrogene eine wichtige Funktion im Uterus. So sind die Progesteron- und Östrogenrezeptoren sowohl im normalen prämenopausalen Endometrium, in welchem sie den zyklischen Veränderungen des Menstruationszyklus unterworfen sind, als auch im atrophischen postmenopausalen Endometrium, in den endometrialen Hyperplasien und in den Endometriumkarzinomen in vielen Fällen nachweisbar.⁵⁰ Im Gegensatz zur eher homogenen Verteilung der Steroidhormonrezeptoren in normalem Endometrium, zeigt sich in Endometriumkarzinomen eine eher heterogene Verteilung der Steroidhormonrezeptoren.⁵⁰ Auch im Endometrium wird das Vorkommen von zwei Östrogenrezeptorisoformen beschrieben: der klassische Östrogenrezeptor alpha (ER α , 595 Aminosäuren, 65 kDa) und der 1996 erstmals in der Prostata und dem Ovar der Ratte nachgewiesene Östrogenrezeptor beta (ER β , 530 Aminosäuren, ca. 60-63 kDa).⁵¹ Der Östrogenrezeptor-beta zeigt starke Ähnlichkeiten mit dem Östrogenrezeptor-alpha insbesondere in der DNA-Bindungsdomäne (95%), dennoch unterscheiden sich die beiden Östrogenrezeptorsubtypen innerhalb der Ligandenbindungsdomäne (55% Übereinstimmung), deutlich in ihrer Aminosäuresequenz.^{14, 15} Auch hinsichtlich der Funktion gibt es eindeutige Unterschiede zwischen diesen beiden Rezeptortypen.

1.8.4 Östrogenantagonisten

1.8.4.1 Allgemeiner Wirkmechanismus und Pharmakologie von Tamoxifen

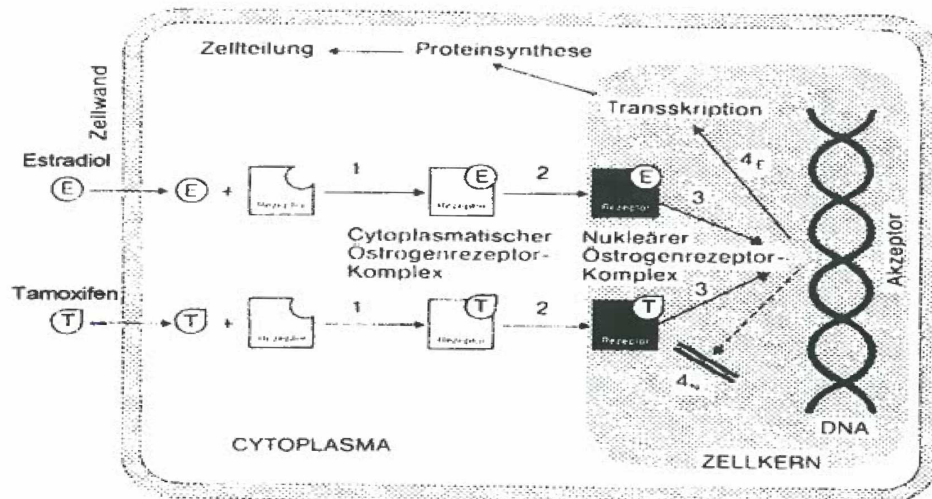
Wirkstoffe wie Östradiol, die an einen Rezeptor binden und einen Signaltransduktionsweg in Gang setzen, bezeichnet man als Agonisten.¹⁹ Andere Moleküle binden an Zellkernhormonrezeptoren, ohne einen Signalübertragungsweg in Gang zu setzen. Antiöstrogene sind kompetitive Antagonisten der Östrogene am Rezeptor mit teilweise schwacher östrogener Eigenwirkung (partielle Agonisten), die die Wirkung körpereigener Östrogene aufheben oder abschwächen.²¹

Das nicht-steroidale Antiöstrogen Tamoxifen (partieller Antagonist am Östrogerezeptor), welches kompetitiv die wachstumsstimulierende Wirkung des Östradiols auf Mamma-Karzinomzellen verhindert, hat zwei Isomere. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Isomere von Tamoxifen unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen: das Cis-Isomer wirkte östrogen, das Trans-Isomer antiöstrogen.⁵⁴ Anfang der 70er Jahre wurden von Cole et al., in Manchester, erste klinische Studien an Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom erfolgreich durchgeführt und am 24.07.1984 erfolgte die Erstzulassung in der Bundesrepublik Deutschland. Dieser Wirkstoff konnte sich so erfolgreich durchsetzen, dass es zum heutigen Zeitpunkt als das Mittel der Wahl in der adjuvanten Hormontherapie des Mammakarzinomes eingesetzt wird.²⁰

Tamoxifen ist ein, synthetisch hergestellter, nichtsteroidaler Östrogenantagonist aus der Triphenyläthylengruppe, der auch eine partielle östrogene Wirkung besitzt.

Tamoxifen kumuliert bei chronischer Gabe, aufgrund eines enterohepatischen Kreislaufs, im Serum, so dass erst nach frühestens 4 Wochen ein steady-state erreicht wird (bei einer Dosis von 20-40 mg/d). Die Metabolisierung erfolgt intrahepatisch, die Ausscheidung findet vor allem biliär, über die Fäces statt, die renale Elimination ist minimal. Als Standarddosis zur Dauertherapie empfiehlt sich die Einnahme von 20 mg pro Tag, da festgestellt wurde, dass höhere Dosierungen keine signifikanten Ergebnisverbesserungen ergaben.^{20, 21} Die Therapie sollte mindestens 3-5 Jahre betragen, da es eine positive Korrelation zwischen Behandlungsdauer und Therapieerfolg gibt. Der Wirkmechanismus von Tamoxifen beruht auf einer kompetitiven Hemmung der Bindung von Östrogenen an zelluläre Hormonrezeptoren (**Abb. 4**)²⁰, da Tamoxifen mit der Alkylaminoethoxy-Seitenkette am intrazellulär liegenden Östrogenrezeptor eine Bindung eingeht und so die Bindung von Östradiol an diesen verhindert. Dieser Tamoxifen-Rezeptorkomplex tritt mit der DNA des Zellkerns in Wechselwirkung und verhindert durch die ausbleibende Transkription den wachstumsstimulierenden Effekt der Östrogene. Die Tumorzellen werden so in der G0/G1-Phase gehalten, weshalb man hier von einer zytostatischen Wirkung sprechen kann.²⁰

Abbildung 4: Hemmung des Östrogenrezeptors



Quelle: V. Endres, Dissertation, Medizinischen Fakultät der Universität Saarland, 2005

1.8.4.2 Tamoxifen- Auswirkungen auf Uterus und Endometrium

Wie auch alle anderen Medikamente ist das Tamoxifen durch zahlreiche Nebenwirkungen gekennzeichnet. Dazu gehören auch eine Reihe von Uterus- und Endometriumveränderungen bis hin zum Endometriumkarzinom.^{20, 55}

Das bedeutet, dass das - auf Mammakarzinomzellen - tumorstatistisch wirkende Medikament Tamoxifen eine tumorfördernde Wirkung auf den Uterus bzw. auf das Endometrium hat.⁵⁵ Folglich kann Tamoxifen in ein und demselben Organismus, an verschiedenen Zielorganen, antiöstrogene oder östrogene Wirkungen entfalten.

GOTTARDIS et al. (1988 und 1989) zeigten mittels Tierversuch, dass Tamoxifen am selben Organismus sowohl antiöstrogen als auch östrogen wirken kann, indem sie bei athymischen Mäusen, denen zuvor sowohl Anteile von menschlichen Mammakarzinomzellen als auch Anteile von menschlichen Endometriumkarzinomzellen implantiert wurden, durch Tamoxifen einen Wachstumsstillstand der Mammatumorzellen und eine Wachstumsstimulation der Endometriumtumorzellen erzielten.⁵⁵

Wahrscheinlich sind sowohl uterine DNA-Veränderungen als auch die Modulationen im IGF-IGFBP System für die Uterusveränderungen bei langfristiger

Tamoxifentherapie ursächlich.⁵⁵ Die Entstehung von Zervix- aber vor allem von Korpuschleimhautpolypen ist die am häufigsten am Uterus beschriebene Nebenwirkung von Tamoxifen.²⁰ Bei den meisten bösartigen Uterusneoplasien handelt es sich um Adenokarzinome⁵⁶, es wurden aber auch Adenosarkome/Karzinom-sarkome⁵⁷, klarzellige Karzinome, serös-papilläre Karzinome⁵⁸, Stromasarkome⁵⁹, Leiomyosarkome⁶⁰ und mesodermale Mischtumore⁶¹ aufgefunden. Für tamoxifenbehandelte postmenopausale Mammakarzinom-Patientinnen besteht laut Literatur ein 1,3 bis 7,5 Mal höheres Risiko, an einem Endometriumkarzinom zu erkranken, als für Frauen der Normalbevölkerung bzw. nicht mit Tamoxifen behandelten Mammakarzinom-Patientinnen. Den Veröffentlichungen zufolge steigt das Risiko mit zunehmender Dauer der Einnahme bzw. mit steigender Kumulativdosis an.²⁰ Weitere häufig auftretende Nebenwirkungen einer Tamoxifentherapie sind Hitzewallungen und Schweißneigung, Menstruationsunregelmäßigkeiten, Amenorrhoe (Ausbleiben der monatlichen Regelblutung), Fluor vaginalis oder trockene Vagina, Irritationen am äußeren Genitale (Pruritus vulvae) sowie Tachykardien.

1.9. Molekularbiologische Ursachen für die Entstehung des Endometriumkarzinoms und seine Vorstufen

Die Störungen der zellulären Regulation, die sich u. a. in einer Veränderung der DNA-Ploidie zeigen, sind auch beim Endometriumkarzinom Ausdruck einer Dysregulation des zellulären Gleichgewichts. Bei Endometriumkarzinomen findet eine Überexpression von Protoonkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen statt, die mit der Entwicklung von invasiven Tumoren und dem Überleben korrelieren. Auch hier gibt es Unterschiede zwischen den östrogenabhängigen Typ I und den östrogenunabhängigen Typ II Tumoren. In dem zahlenmäßig am häufigsten vorkommenden Typ I- Karzinom, dem endometrioiden Adenokarzinom, kann man in ca. 50% der Fälle eine Mutation des **PTEN-Gens** nachweisen.⁵² Weitere häufige Mutationen der Typ I Tumoren sind Mutationen des **k-ras-** und des **β-catenin-Gens**. Dabei kommen PTEN Mutationen in

55-83%, K-ras-Mutationen in 13-26% und β -catenin-Mutationen in 25-38% der Fälle der Typ-I-Karzinome vor (Tab. 1).⁵²

Tabelle 5

Vergleich ausgewählter molekularer Marker in endometroiden und serösen Endometriumkarzinomen und ihren Vorstufen (nach [1])

Histologie	p53-Nachweis	Mikrosatellit-instabilität	PNET-Mutation	ras-Mutation	ER/PR +
Adenomatöse Hyperplasie	Negativ	>20%	>20%	>20%	+
Endometroides Karzinom (EC I)	<10%	>20%	>40%	>20%	+
EIC	40–90%	Negativ	?	?	Negativ
Seröse Karzinome (EC II)	75–100%	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

Tabelle 1. Molekulare Marker in Endometriumkarzinomen und deren Vorstufen.
(Quelle: Der Onkologe, S. Ackermann, Volume 9, Number 11/November 2003, 0947-8965)

Das Tumorsuppressorgen PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) zum Beispiel ist auf Chromosom 10 (Position 10q23.3) lokalisiert und kodiert eine 403 Aminosäuren lange dualspezifische Phosphatase, die über negative Regulation der Phosphoinositid-3-Kinase/AKT-Signalkaskade eine G1-Zellzyklusblockierung und/oder Apoptose induzieren kann und damit einen negativen Einfluss auf Proliferation und Lebensdauer einer Zelle hat.⁹ Somatische Mutationen und Deletionen innerhalb des PTEN-Gens sind in 33-83% der Endometriumkarzinome nachgewiesen worden.⁹

Als nächstes sind die Proteine der ras-Familie (k-ras, N-ras, H-ras) zu erwähnen, die eine wichtige Funktionen bei der intrazellulären Signalvermittlung im Rahmen der Zellproliferation haben. Mutationen im k-ras-Gen, zumeist in Kodon 12 lokalisiert, stellen frühe Ereignisse der Karzinomentwicklung dar und lassen sich in 10-46% der Endometriumkarzinome sowie bei 20% der atypischen Hyperplasien feststellen.⁶

Für die Typ-II-Karzinome steht eine p53-Mutation in Vordergrund, die sich in mehr als 90% der Fälle nachweisen lässt.⁵³ Das Gen für das Protein p53 ist auf dem Chromosom 17 lokalisiert und wird als “Wächter des Genoms” bezeichnet.¹² Es aktiviert bei einer Schädigung der DNA ein entsprechendes Reparatursystem blockiert die Zellteilung solange, bis die Wiederherstellung der DNA vollständig abgeschlossen ist und aktiviert die Apoptose (automatischer Selbsttod) bei irreparablen

Schäden.¹² Durch eine Mutation kommt es zu irreversiblen Schäden der DNA mit der Gefahr einer Karzinomentstehung durch fehlende Kontrolle des Zellwachstums.¹²

2. Material und Methoden

2.1 Gewebekollektiv

Für diese Studie wurde ein TMA mit primärem Tumorgewebe von 368 Patientinnen mit einem Endometriumkarzinom verwendet. Die Genehmigung für den Einsatz und Gebrauch dieser Gewebeproben mittels der Immunfluoreszenz- sowie der FISH-Methode erbrachte uns die Ethikkommission der Universität Hamburg.

Das mittlere Alter dieser Patientinnen lag bei 69 Jahre (Altersspanne 31-92 Jahre).

Die Ausgangsdaten erhielten wir entweder aus der Krebsregistratur der Universität Basel oder vom behandelnden Arzt. Die mittlere Beobachtungszeit lag bei 20 Monaten (Zeitspanne zwischen 1-173 Monaten). Das zu untersuchende Gewebe wurde jeweils mit Formalin fixiert (neutrale, wässrige 4%ige Lösung) und in Paraffin eingebettet. Das pathologische Tumorstadium sowie den Lymphknotenstatus erhielten wir aus den ursprünglichen pathologischen Berichten, die in den **Tab. 3 und Tab. 4** wiedergegeben sind. Es wurden folgende histologisch unterschiedliche Typen des Endometriumkarzinoms untersucht: endometrioides Karzinom (ca. 304 Fälle), seröses Karzinom (26 Fälle), klarzelliges Karzinom (17 Fälle), muzinöses Karzinom (8 Fälle) und letztendlich das Squamoszellkarzinom (3 Fälle).

Alle Gewebeproben wurden von zwei Pathologen (HM, LT) hinsichtlich des Tumorstadiums sowie des histologischen Typs untersucht. Über das therapeutische Vorgehen bei diesen Patientinnen bestand jedoch keinerlei Information.

Um unsere Studie zu expandieren, bezogen wir auch Fälle mit endometrialer Hyperplasie in unsere Arbeit ein. Eine ESR1-Amplifikation konnte in 19 Fällen mit einer atypisch-komplexen Hyperplasie, in 10 Fällen mit einer komplexen Hyperplasie ohne Atypie und in 14 Fällen mit einfacher Hyperplasie nachgewiesen werden.

Table 3: Östrogenrezeptorexpression im Endometriumkarzinom.

		ER ICH result (Allred Score)						
		On	Analyzable	0-2%	3-4%	5-6%	7-8%	p
Cancer histology	All	368	304	11,5	10,2	21,4	57,0	
	Endometrioid	304	258	7,0	7,8	22,9	62,4	<0,0001
	Serous	26	22	36,4	22,7	9,1	31,8	
	Others (a)	38	24	37,5	25	16,7	20,9	
FIGO stage	FIGO I	201	166	6,6	9,6	20,5	63,3	0,0110
	FIGO II	62	54	9,3	9,3	31,5	50,0	
	FIGO III	34	30	26,7	20,0	16,7	36,6	
	FIGO IV	13	12	33,3	8,3	16,7	41,6	
Histologica	G I	177	142	4,9	8,5	23,9	62,7	0,0016
	G II	105	91	12,1	9,9	17,6	60,4	
	G III	81	67	25,4	13,4	19,4	41,8	
Hyperplasia Histology	All	LS (b)	43	0	2,3	25,6	72,1	
	Complex with atypia	LS (b)	19	0	5,3	31,6	63,2	0,1396 (d)
	Complex without	LS (b)	10	0	0	30,0	70,0	
	Simple without	LS (b)	14	0	0	14,2	85,7	0,3529 (d)

(a) Others include clear-cell-carcinomas (n=17), mucinous carcinomas (n=8), squamous -cell-carcinomas (n=3) and 17 tumours that were not otherwise specified.

(b) Conventional large sections (LS) were analysed.

(c) Endometrioid vs. serous.

(d) Vs. Simple without atypia.

Table 4: ESR1 Amplifikation im Endometriumkarzinom und den endometrialen Hyperplasien.

		<u>ESR 1 FISH result</u>				
		On array	Analyzable	Amplification %	Gain %	p
Cancer histology	All	368	176	22,7	5,7	
	Endometrioid -Ca	304	148	23,0	6,8	0,3738 (c)
	Serous-ca	26	12	25,0	0	
	Others (a)	38	16	18,7	0	
FIGO stage	FIGO I	201	98	23,4	6,1	0,2557
	FIGO II	62	36	25,0	8,3	
	FIGO III	34	17	11,8	0	
	FIGO IV	14	6	0	16,7	
Histological grade	G I	177	84	17,9	5,9	0,4763
	G II	105	46	26,1	8,7	
	G III	81	43	25,6	2,3	
Hyperplasia Histology	All	0	43	25,6	0	
	Complex with atypia	LS (b)	19	31,6	0	0,2413 (d)
	Complex without	LS (b)	10	30,0	0	
	Simple without	LS (b)	14	14,3	0	0,3529 (d)

(a) Others include clear-cell-carcinomas (n=17), mucinous carcinomas (n=8), squamous -cell-carcinomas (n=3) and 17 tumours that were not otherwise specified.

(b) Conventional large sections (LS) were analysed.

(c) Endometrioid vs. serous.

(d) Vs. Simple without atypia.

2.2 Immunhistochemie (IHC)

Die immunhistochemische Detektion der ER α -Proteine erfolgte durch ein Kit-System (ER pharm Dx-Kit, DAKO), welches einen Cocktail von zwei monoklonalen Mäuse-Antikörpern gegen ER α (Klone 1D5 und ER-2-123) enthielt. Das Kit wurde entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die IHC-Bewertung wurde gemäß dem Allred-Score durchgeführt.³³ Die Intensität der ER-Färbung wurde auf einer vierstufigen Skala (0-3) und der Anteil der ER-positiven Tumorzellen auf einer fünfstufigen Skala (1-5) festgehalten. Die Kombination beider Skalen resultierte in einer achtfstufigen Skala, nach welcher Gewebe mit einem Wert von ≥ 3 als ER-positiv angesehen wurden. Die Interpretation erfolgte unabhängig der Ergebnisse der FISH-Analyse.

2.3 Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)

Die TMA und Gewebesektionen wurden vor der Hybridisierung gemäß dem Paraffin Pretreatment Reagent Kit protocol (Vysis, Illinois) behandelt. Die FISH wurde mit einer digoxigenierten BAC-Probe (BAC RP11-450E24, RZPD, Germany) durchgeführt, welche das ESR1-Gen sowie eine mit Spectrum-Orange bezeichnete Chromosomen 6 zentromere Probe (chromosome 6 centromeric probe [CEP6]) als Referenz enthielt (gekauft von Vysis). Hybridisierung und anschließendes Waschen wurden nach der LSI-Procedur (Vysis) durchgeführt. Die Visualisierung der Probe mittels fluoreszierendem Isothiocyanat (FITC)-verbundenem Schaf-Antidigoxigenin (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) wurde wie beschrieben durchgeführt. Die Objektträger wurden mit einer 125ng/ml 4,6-diamino-2-phenylindol in einer nichtfärbenden Lösung gegengefärbt. Die Anzahl der Fluoreszenzsignale wurde in jedem Gewebepunkt für die Centromer 6 und ESR1-Genproben von einer erfahrenen Person (FH) beurteilt. ESR1-Veränderungen wurden auf Basis der Rate der Genkopienanzahl von ESR1 und Centromer 6 oder anhand der Präsenz von Signalclustern definiert. Gewebe die mindestens doppelt so viele ESR1 wie Centromer 6-Genkopien (Rate ≥ 2.0) besaßen oder Anhäufungen von FISH-Signalen zeigten wurden als „ESR1-amplifiziert“ angesehen. Gewebe mit mehr ESR1 als Centromer 6-

Kopien, die allerdings noch unter den Kriterien für „ESR1-amplifiziert“ lagen, wurden als „ESR1-angereichert“ bezeichnet (Wert >1.0 aber <2.0, keine Signal-Clusters). Alle anderen analysierbaren Gewebe (Rate 1.0, keine Cluster) wurden als „ESR1-normal“ angesehen.

2.3.1 p-Bac Kultivierung

Laborprotokoll: pBac-E.coli-Klon-Kultivierung

- (1) 10 ml Medium in einen 100ml-Erlenmeyerkolben füllen
- (2) Zugabe von 30µl Chloramphenicol
- (3) Mit abgeflammter Pinzette einen autoklavierten Zahnstocher fassen und Abstrich aus der stab-stock-Kultur machen
- (4) Animpfen des Mediums durch Zugabe des Zahnstochers
- (5) Inkubation der angeimpften Kultur bei Raumtemperatur und 200rpm im Schüttelinkubator für 2 Tage
- (6) Überimpfen von 10µl der trüb gewordenen Kultur in einen mit 10ml Medium und 30µl versetzten 100ml-Erlenmeyerkolben mittels Pipette
- (7) Inkubation der angeimpften Kultur bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator über Nacht
- (8) DNA-Extraktion

2.3.2 DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus einer pBac-E.coli-Flüssigkultur mithilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen mit leicht modifiziertem Protokoll extrahiert. Alle verwendeten Reagenzien und die „QIAprep spin-Säulen“ waren im Extraktions-Kit enthalten.

Laborprotokoll: DNA-Extraktion aus pBac-E.coli-Klon-Flüssigkultur

- (1) 3ml (2 + 1ml) der Flüssigkultur im 2ml-tube in einer Tischzentrifuge (~17.900 ×g) für 90 sec bei 13.000 rpm pelletieren
- (2) Pellet in 250 µl Puffer P1 vollständig resuspendieren
- (3) Zugabe von 250µl Puffer P2 und vorsichtiges Mischen durch 4-6 mal invertieren
(nicht länger als 5 min mit dem folgenden Schritt warten)
- (4) Zugabe von 350µl Puffer N3 und sofortiges vorsichtiges Mischen durch 4-6 mal invertieren
- (5) 10 min Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- (6) Überstand in eine „QIAprep spin-Säule“ überführen
- (7) 1 min Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- (8) Durchfluß verwerfen
- (9) „QIAprep spin-Säule“ mit 500µl Puffer PE beladen und 1min Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- (10) Zentrifugat/Durchfluß/Abfluß verwerfen

- (11) „QIAprep spin-Säule“ erneut mit 500µl Puffer PE beladen und 1min Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- (12) Zentrifugat/Durchfluß/Abfluß verwerfen
- (13) „QIAprep spin –Säule“ erneut 1min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren
- (14) Zentrifugat verwerfen ; „QIAprep spin-Säule“ in ein 1,5ml-tube setzen
- (15) „QIAprep spin-Säule“ mit 50µl auf 70°C erwärmten Puffer EB beladen
- (16) 1min inkubieren (bei Raumtemperatur)
- (17) 1min Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- (18) Quantifizierung der DNA im Nanodrop und Aufbewahrung im 1.5ml-tube bei 4°C

2.3.3 Sonden-Labeln (DIG-Nick Translationsprotokoll zur FISH-Sondenherstellung)

Die Nick-Translation ist eine Methode zum gleichmäßigen Einbau markierter Nukleotide in den DNA-Doppelstrang, wobei die DNA gleichzeitig auf die optimale Fragmentlänge zur Hybridisierung eingestellt wird. Diese wird durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

Die Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ von Invitrogen durchgeführt, wobei eine Mindestmenge von 1µg DNA zu einem Ansatz von 50µl gegeben wurde. Das Protokoll des Kits wurde modifiziert. Das zulässige

Höchstvolumen an pBac-DNA-Lösung von 38µl wurde als Standardvolumen gewählt (entsprechend ca. 1,5 bis 2,5 µg DNA). Außerdem wurde nach Ablauf der Standardinkubationszeit ein weiteres Mal Pol-I-DNase-Mix zugegeben und weiter inkubiert.

Verwendete Materialien

- Nick Translation System (Invitrogen)
- Digoxigenin 11-dUTP (Roche)
- Polymerase I (Invitrogen)

Pipettieransatz im 0,5ml-tube

dNTP-Mix ohne dTTP	5µl
Digoxigenin 11-dUTP	1µl
pBAC-DNA-Lösung	38µl
Pol I / DNase Enzyme Mix	5µl
DNA Polymerase I	1µl
Ansatzmenge	50µl

Laborprotokoll: DNA-Markierung mittels Nick-Translation

- (1) Ansatz gut durchmischen und danach herunterzentrifugieren
- (2) Inkubation für 90 min bei 15°C im Thermocycler
- (3) Zugabe von weiteren 5µl Pol I / DNase Enzyme Mix; mit der Pipette

durchmischen

(4) Inkubation für 15 min bei 15°C im Thermocycler

(5) Zugabe von 5µl Stop Buffer

(6) Durchmischen/Vortexen und danach zentrifugieren

(7) Lagerung bei 4°C

2.3.4 FISH-Tag-1 (Hybridisierung)

Es muss erwähnt werden, dass nur die Großschnitte, die die entsprechenden Hyperplasien beinhalten, entparaffiniert wurden. Die Gewebe-Mikroarrays bedarften keiner Vorbehandlung im Sinne einer Entparaffinierung.

Laborprotokoll: Paraffin-Pretreatment und proteolytische Vorbehandlung

(1) TMA-Schnitte 3×10 min ins Xylol stellen

(2) 2×5 min in Ethanol (95%) stellen

(3) 3 min auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen

(4) 15 min in 80°C warmer Pretreatmentlösung (Wasserbad) inkubieren

(5) 2 min in dH₂O waschen

(6) 150 min in 37°C warmer Proteaselösung (Wasserbad) inkubieren

(7) 2 min in dH₂O waschen

(8) 3 min in Ethanol (70%) stellen

(9) 3 min in Ethanol (80%) stellen

(10) 3 min in Ethanol (95%) stellen

(11) 3 min auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen

(12) Zugabe von 20 µl Sonden-Hybridisierungsmix auf das Gewebe bzw. TMA

Das Sonden-Hybridisierungsmix wird seinerseits wie folgt zusammenpipettiert:

-14µl Basis-Hybridisierungsmix

-2µl COT-DNA

-4µl Sonden-DANN

Hybridisierungsmix (20µl)

(13) mit 24×32mm Deckgläschen eindeckeln

(14) mit RubbERCement versiegeln

(15) bei 72°C für 10 min im Hybrite-Gerät denaturieren und dann über Nacht bei 37°C im Hybrite inkubieren

2.3.5 FISH-Tag-2 (Detektion)

Laborprotokoll: Waschen (Zuerst Wasserbäder anstellen, Waschpuffer temperieren)

- (1) TMA-Schnitte aus dem Hybrite nehmen und RubbERCement und Deckgläschen entfernen
- (2) Schnitte in Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) bei Raumtemperatur stellen, bis dieser 72°C erreicht hat
- (3) Schnitte 2min bei 72°C im Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) waschen
- (4) Bis zur Detektion kurz zum waschen in 1 mal PBS stellen
- (5) Schnitte im Dunkeln lufttrocknen

FISH-Enhancer-Kit-Detektion Vorbereitung:

-Waschpuffer (1×PBS, 0,2% Tween 20) bzw. 3 OT-Küvetten mit Waschpuffer in Wasserbad oder Wärmeschrank auf 37°C aufwärmen.

-Ausreichend 1×Blocking-Lösung vorbereiten (500µl + 3×50µl pro OT).

-Antikörperaliquots vor Verdünnung mit Blocking-Lösung 5 min bei ca. 10.000 rpm zentrifugieren.

(6) Objektträger nach der Post-Hybridisierung kurz in 1×PBS (100 ml in OT-Küvette) waschen.

(7) OT mit 500µl 1×Blocking-Solution eindecken (ohne Deckgläschen), 30 min- 1h bei RT inkubieren (z.B. in “trockener Kammer”).

(8) Blocking-Solution abkippen (auf Papiertuch stellen, evtl. abtupfen).

(9) 50 µl **Maus-Anti-DIG-AK-Lösung** (2 µl AK-Lsg. Aus Kit-Tube #1 in 50 µl

1×Blocking) auf OT pipettieren, mit Parafilm abdecken (evtl. Luftbläschen herausstreichen) und 1-1^{1/2} h bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren.

(10) 3× mit 100 ml Waschpuffer (1×PBS, 0,2% Tween20) bei 37°C waschen (kurz nacheinander- je etwa 1 min-in 3 Küvetten mit 1×PBS, Tween20 und 37°C stellen (Wasserbad), zwischendurch etwas schütteln).

(11) 50 µl **Anti-Maus-AK-DIG-Lösung** (2 µl AK-Lsg. Aus Kit-Tube #2 in 48 µl 1×Blocking) auf OT pipettieren, mit Parafilm abdecken (evtl. Luftbläschen herausstreichen) und 1-1^{1/2} h bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren.

(12) 3× mit 100 ml Waschpuffer (1×PBS, 0,2% Tween20) bei 37°C waschen (kurz nacheinander- je etwa 1 min-in 3 Küvetten mit 1×PBS, 0,2% Tween20 und 37°C stellen (Wasserbad), zwischendurch etwas schütteln).

(13) 50 µl **Anti-DIG-Flourescein-Lösung** (2 µl AK-Lsg. Aus Kit-Tube #3 in 50 µl 1×Blocking) auf OT pipettieren, mit Parafilm abdecken (evtl. Luftbläschen herausstreichen) und 1-1^{1/2}h bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren (Antikörper und eingedeckte OT dunkel halten).

(14) 3×5 min mit 100 ml Waschpuffer (1×PBS, 0,2% Tween20) waschen (jeweils nacheinander 5 min in 3 Küvetten mit 1×PBS, 0,2% Tween20 und 37°C(Wasserbad) stellen, Küvetten dunkel halten).

(15) Lufttrocknen der OT im Dunkeln bei Raumtemperatur.

(16) Eindecken der luftgetrockneten OT mit einem Tropfen DAPI-Antifade, mit Deckgläschen (24×32 mm) abdecken, möglichst dunkel halten.

2.4 Statistik

Kreuzungstabellenanalysen und Chi²-Tests wurden verwendet, um den Zusammenhang zwischen klinisch-pathologischen oder immunhistochemischen Variablen und der ESR1-Amplifikation zu analysieren. Für die Analyse späterer Daten wurden Lebenskurven nach der Kaplan-Meier-Methode berechnet und Überlebensverteilungen mit dem Log-Rang-Test verglichen. Der primäre Endpunkt war das Überleben, gemessen vom Tag der Operation bis zum Zeitpunkt des letzten Kontakts zum Patienten.

3. Resultate

3.1 Er- α Expression

Die immunhistochemische Analyse von ER α war in 304 von 368 Fällen (82,6%) erfolgreich. In 25 (6,8%) Gewebespots waren keine Tumorzellen vorhanden, in 39 Fällen (10,6%) keine Gewebespots, weshalb es in diesen Fällen zu keinem Ergebnis kam. 88,5% der untersuchten Tumore waren ER α positiv. Die intensivste Färbung (Wert 7-8 nach Allred) konnte in 173 der 304 (57%) Spots nachgewiesen werden. Dies stand in Verbindung zum endometrioiden histologischen Subtyp ($p < 0.0001$) sowie zum frühen FIGO Stadium ($p = 0.0110$). Die Expression von ER α korrelierte nicht mit der Prognose der Patientin (**Abb. 8a**). Die Ergebnisse der Immunhistochemie (IHC) werden in **Abbildung 7** dargestellt. Alle Ergebnisse der IHC sind in **Tabelle 3** zusammengefasst.

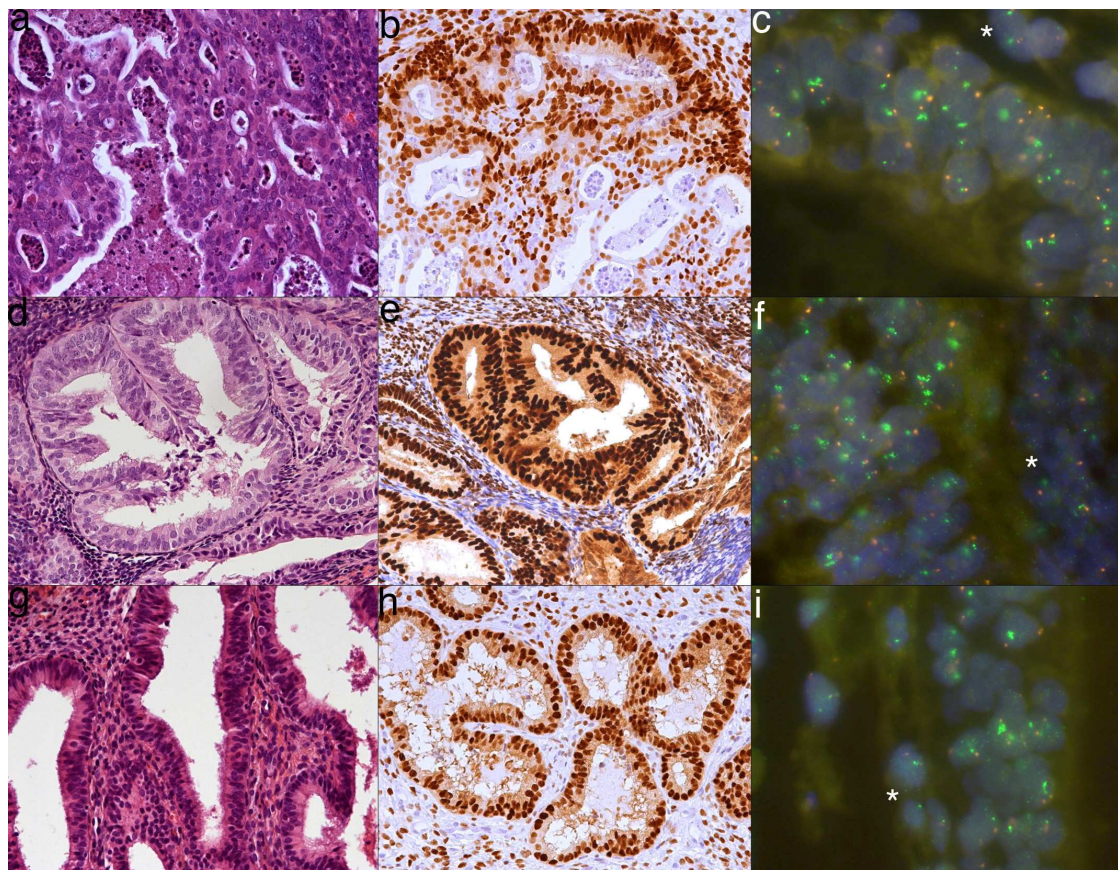


Abbildung 7: Beispiele für das Endometriumkarzinom (a-c), Komplexe atypische Hyperplasie (d-f) und die Komplexe Hyperplasie ohne Atypie (g-i)

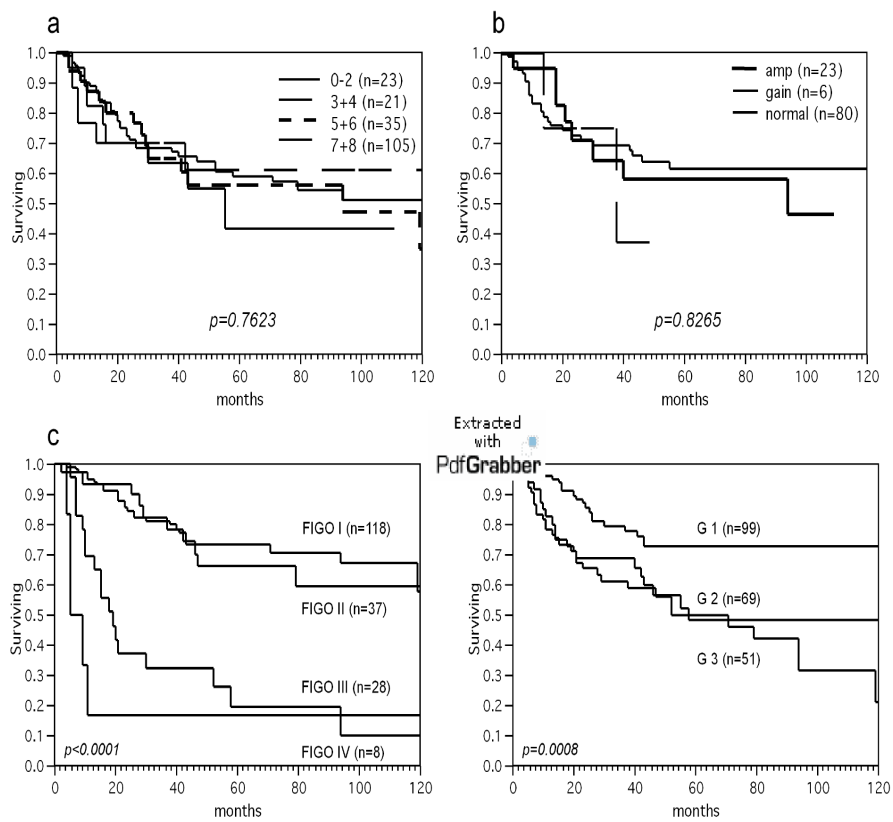


Abbildung 8: Die prognostische Relevanz abhängig vom FIGO-Stadium (c) und abhängig vom histologischen-Grad(d).

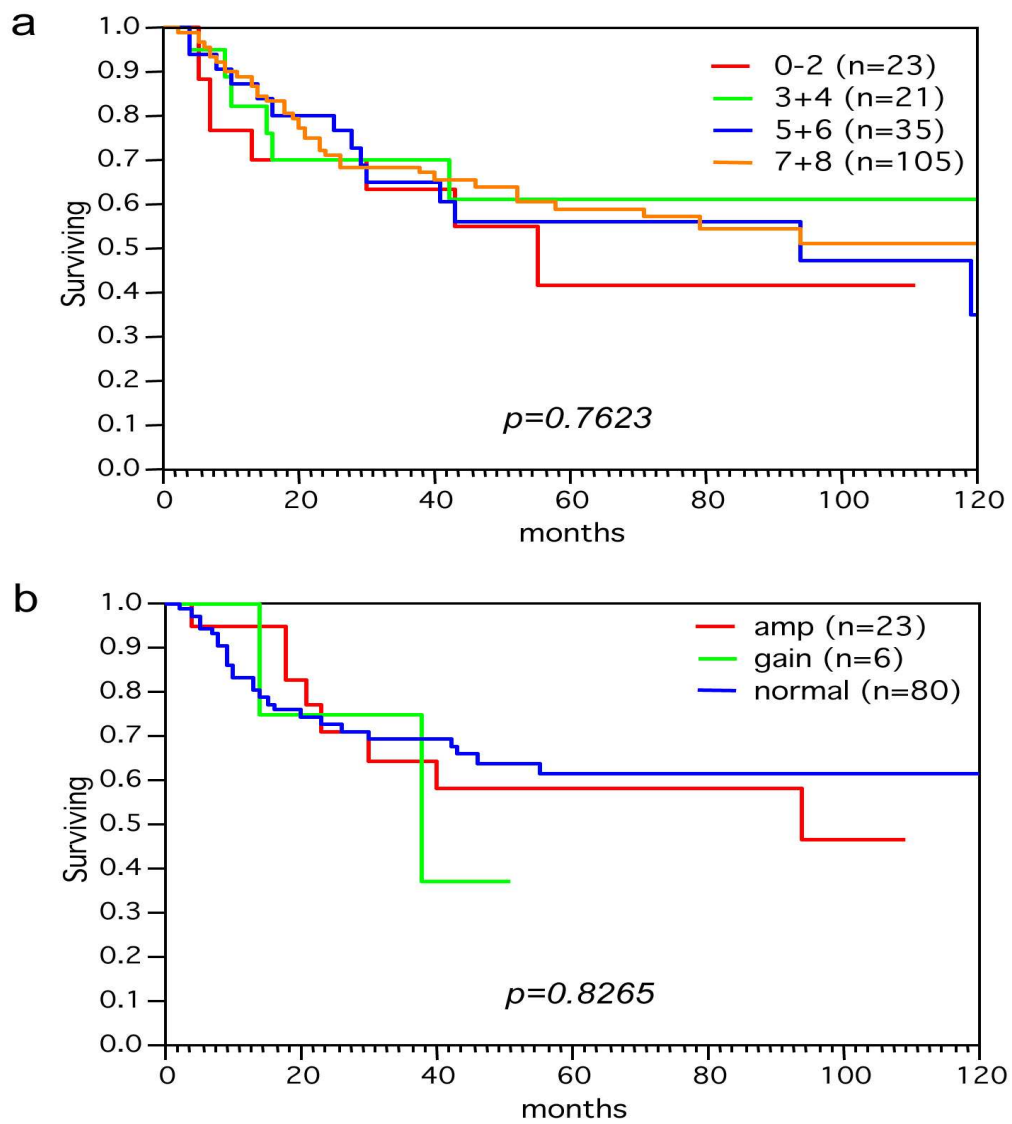


Abbildung 8: Die prognostische Relevanz der ER-Überexpression (a) und ESR1 Kopienzahl (b).

3.2 ESR1-Amplifikation

Die ESR1 FISH Analyse wurde in 176 der 368 (48%) Gewebespots erfolgreich durchgeführt. Fehlende Ergebnisse sind zum einen auf fehlende Spots auf dem TMA (n=56, 15%) oder fehlende interpretierbare FISH-Signale (n=136, 37%) zurückzuführen. In 40 Tumoren (22,7%) wurde eine ESR1 Amplifikation gefunden (Verhältnis ESR1/Zentromer 6 >2,0 oder Cluster-Signale). Weitere 10 Tumoren (5,7%) zeigten einen Zugewinn an ESR1. Die Amplifikationen waren überwiegend low-level Amplifikationen mit 4 bis 9 FISH-Signalen. Nur 8 amplifizierte Tumore wiesen mindestens 10 (max.15) ESR1 Genkopien auf. Die Amplifikation von ESR1 zeigte keine Korrelation zu histopathologischen Parametern wie beispielsweise histologischer Subtyp, Tumorstadium (p=0,617) und Differenzierung (p=0,4763). Des Weiteren konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der ESR1 Genkopien und der Prognose der Patienten hergestellt werden (**Abb. 8**). Von 174 der 368 Tumoren wurden sowohl FISH als auch IHC Daten erhoben. ESR1 amplifizierte Tumore waren mit einer positiven ER α Proteinexpression (Allredwert 3-8) korreliert (p=0,0036). In 95% der ESR1 amplifizierten Tumore zeigte sich eine mäßiggradige oder hohe ER α -Expression (Allredwert 5-8). Bei den nicht amplifizierten Tumoren war dies nur in 68,5% der Fall. Der Zusammenhang zwischen ESR1 Kopienzahl und ER Alpha Expressionslevel wird in **Tabelle 5** veranschaulicht. Großschnittanalysen von nicht-karzinomatös entarteten Endometriumläsionen wiesen in 25,6% der Gewebeproben Amplifikationen auf. Dies beinhaltet komplexe Hyperplasien mit Atypien (6/19), komplexe Hyperplasien ohne Atypien (3/10) sowie einfache Hyperplasien ohne Atypien (2/14). In all diesen Fällen war die ESR1 Amplifikation auf die epithelialen Zellen des hyperplastischen Endometriums beschränkt.

Beispiele für Endometriumkarzinome und Hyperplasien mit ESR1 Amplifikation werden in **Abb.7** gezeigt. Alle FISH-Ergebnisse sind in **Tab.4** zusammenfassend dargestellt.

Table 5: Assoziation zwischen ESR1 Amplifikation und ER Expression im Endometriumkarzinom (p=0.0036).

ESR1 FISH result		†	ER IHC result (Allred score)			
	n		0-2 (%)	3-4 (%)	5-6 (%)	7-8 (%)
normal	124		16.1	15.3	16.1	52.4
gain	10		10.0	10.0	40.0	40.0
amplification	40		5	0	27.5	67.5

4. Diskussion

Die Ergebnisse unserer Studie weisen darauf hin, dass in mehr als 20% der Endometriumkarzinome eine Amplifikation des Östrogenrezeptorgens (ESR1) vorliegt. Damit ist die ESR1 Amplifikation eine der häufigsten genetischen Veränderungen in dieser Tumorart. Unsere Daten heben die großen Gemeinsamkeiten zwischen endometrialen Karzinomen und Mammakarzinomen mit Schwerpunkt auf der Rolle der ESR1-Amplifikation hervor. Während fast alle ESR1-amplifizierten Tumore eine hohe Rate an ER-Überexpression aufwiesen, zeigte sich in nur 2/3 der nicht amplifizierten Tumoren eine ER- Proteinüberexpression.

Aus dieser Tatsache lässt sich vermuten, dass die ESR1-Amplifikation als ein Mechanismus für die Entstehung der ER-Überexpression betrachtet werden kann.³¹

Die höchsten Raten an ESR1-Amplifikationen zeigten sich in Endometriumkarzinomen vom endometrioiden Typ, die eine hohe Östrogenabhängigkeit aufweisen.²⁸ Mit abnehmender Häufigkeit kommt Sie jedoch auch in anderen Subtypen des Endometrium-Karzinoms vor. Dieser Befund veranschaulicht, dass unabhängig von allen anderen Mechanismen die ESR1-Amplifikation und die ER-Überexpression einen Wachstumsstimulationsreiz für maligne entartete Zellen darstellen. Anders als bei Mamma-CAs konnte im Rahmen unserer Studie keine eindeutige Assoziation mit den Frühkarzinomen, den niedrig differenzierten Tumoren oder generell mit einem bestimmten Subtyp hergestellt werden. Dies kann man allerdings auf die geringe Anzahl der untersuchten Fälle und speziell den geringen Anteil an fortgeschrittenen sowie serösen Karzinomen zurückführen. Die mangelnde prognostische Relevanz der ER-Überexpression war nicht unerwartet, bedenkt man die allgemeine Debatte über diese Thematik. Während frühere Studien einen Zusammenhang zwischen ER-Expression und Differenzierungsgrad des Tumors, dem Tumorstadium und der Prognose vermuteten,³⁴⁻⁴⁰ wurde dies in den aktuellen Studien nicht bestätigt.^{28, 41-44} Daraus ergab sich die Konsequenz, dass die ehemals von der USA National Cancer Institute empfohlene Berücksichtigung des ER Expressions-Status bei der Beurteilung und Auswertung von Endometriumkarzinomen, die mindestens für die Stadien FIGO I und II empfohlen wurden, zurückgezogen wurde und in der aktuellen WHO-Klassifikation

nicht mehr berücksichtigt wird.²⁸

Zusätzlich muss erwähnt werden, dass die hohe Rate an ER-positiven Tumoren (88,5%) und die vergleichsweise kurze Beobachtungszeit keine optimale Voraussetzung für die Beurteilung hinsichtlich der prognostischen Relevanz bietet.

Die ER-Expression ist der wichtigste therapeutische Angriffspunkt und wird nach jeder Diagnosestellung eines Mammakarzinoms routinemäßig durchgeführt.

Mehr als 60% der Patientinnen mit einem Mammakarzinom profitieren heutzutage von einer Anti-Östrogen Therapie. Jedoch ist die klinische Relevanz der ER-Expression bei den Endometriumkarzinomen noch nicht hinreichend geklärt. Trotz der Tatsache, dass ein Östrogenüberschuss und eine ER-Überexpression die wesentlichen treibenden Kräfte bei der Entstehung des Endometriumkarzinoms darstellen,²⁸ waren die Ergebnisse der Anti-Östrogen Therapie in frühen sowie späten Tumorstadien eher entmutigend.²⁹

In unserer aktuellen Studie über Mammakarzinome konnten wir zeigen, dass ESR1 amplifizierte Tumore optimal auf eine Anti-Östrogen Therapie reagieren.³¹ Dies führte zu der Spekulation, dass eventuell auch ESR1-positive Endometriumkarzinome von solch einer Therapie profitieren. Um diese Fragestellung, ob ESR1 Amplifikationen ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von Vorstufen des Endometrium-Ca spielen, näher zu bearbeiten, untersuchten wir Fälle mit komplex-atypischen Hyperplasien sowie einfach und komplexen Hyperplasien ohne Atypien. Die atypisch komplexe Hyperplasie kann als eine Präkanzerose eingestuft werden, die unbehandelt in etwa 30% der Fälle in ein obligates Karzinom übergeht.⁴⁵ Die nahezu identische Anzahl an ESR1-Amplifikation in komplex atypischen Hyperplasien sowie die sich hieraus entwickelnden Karzinome lässt vermuten, dass die ESR1 Amplifikation eine frühzeitige Veränderung in diesen Tumoren darstellt.

Die vergleichsweise ähnliche Frequenz der ESR1-Amplifikationen in komplexen Hyperplasien ohne Atypien lässt vermuten, dass die ESR1 Amplifikation auch den Übergang dieser Vorstufe in die atypisch komplexe Hyperplasie bahnt. Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen der Mamma-Ca Studie, in der ESR1-Amplifikationen sogar in gutartigen Veränderungen ohne jeglichen Hinweis auf eine präkanzeröse Entartung beobachtet wurde, sehr gut vergleichbar.³¹

Trotz der spärlichen Anzahl an untersuchten Fällen in dieser Studie konnte sich die

ESR1-Amplifikation als eine häufige Veränderung in den Endometriumkarzinomen sowie dessen Vorstufen darstellen. Ergänzend muss jedoch erwähnt werden, dass die klinische Relevanz sowie der Mechanismus, welcher zu dieser Veränderung führt, weiterhin im Schatten der Vermutung bleibt. Allerdings lässt sich vermuten, dass ESR1-Amplifikationen bevorzugt im Gewebe mit hoher Transkriptionsrate des entsprechenden Gens entstehen und einen wesentlichen Faktor für die maligne Transformation der Zellen darstellen. Die ESR1-Amplifikation mit folgender ER-Überexpression bietet der Zelle, durch die gesteigerte Aktivierung von gewebespezifischen Targetgenen, einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen. Die besonders gute Ansprechrate von ESR1 amplifizierten Mammakarzinomen auf Tamoxifen deutet darauf hin, dass das Wachstum sowie die Überlebensrate dieser Zellen sehr stark von einer Störung im Östrogenhaushalt dieser Zellen bestimmt werden. Anderenfalls kann die Entstehung einer ESR1-Amplifikation unter einer Tamoxifen-Therapie nicht ausgeschlossen werden.

Die inkomplette Blockade von ER unter einer Tamoxifen-Therapie kann sogar als Selektionsvorteil für ESR1 amplifizierte Zellen angesehen werden. Eine ähnliche Situation findet man auch bei Prostatakarzinomen, bei welchen unter einer Anti-Androgen-Therapie die Amplifikation von Androgen-Rezeptor-Genen getriggert wird.⁴⁶ Im Rahmen unserer Studie ist uns jedoch nicht bekannt gewesen, ob unser Patientenkollektiv vorher einer Tamoxifen-Therapie unterzogen worden ist oder nicht. Die hohen Rate an ESR1-amplifizierten Fällen (23%) lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine ESR1 Amplifikation auch ohne Einsatz einer Tamoxifen-Therapie entstehen kann, die nur einen kleinen Anteil an Endometrium Karzinomen ausmacht und dies trotz der Tatsachen, dass das Risiko der Entwicklung eines Endometriumkarzinoms unter einer Tamoxifen-Therapie im Vergleich zur Normalbevölkerung um das 2 bis 3 fache erhöht ist.³⁰

Die Auswertung von ESR1 Amplifikationen durch die FISH erfordert besondere Sorgfalt. Im Gegensatz zu HER2 Amplifikationen, die ein typisches Muster von großen und weit auseinander gedrängten Signalen bieten, sind die Cluster bei ESR1 Amplifikation eher extrem dicht atypisch und schwer zu klassifizieren. Dies führt zu dem Problem, dass viele Cluster-Signale als Einzelsignale missinterpretiert werden, da der Abstand zwischen zwei getrennten Signalen kleiner ist als der Durchmesser eines

einzigsten Signals. Ein ähnliches Bild von dicht beieinander liegenden ESR1-Clustern hatten wir zuvor bei Mamma-Ca-Arrays beobachtet. Eine genaue Untersuchung des ESR1-Amplicons in Mammakarzinomen erbrachte die Tatsache, dass es sich um ein sehr kleines Amplicon von etwa 400-600 kb handelt, welches auch nur das ESR1-Gen beinhaltet.³¹ Dieses eng zusammengedrückte Muster an Clustern kann durch die kleine Länge des entsprechenden DNA-Abschnittes im Amplicon, welches nicht durch den ca. 140 kb langen DNA-Abschnitt der FISH Probe erfasst wird, erklärt werden.

Vergleichsweise beinhalten die HER2 Amplicons, die eher das Muster von breit voneinander getrennten Signal-Cluster bieten, mit einer Basenzahl von 6000-10000 kb einen größeren DNA Abschnitt und daher ein viel spezifischeres Bild.⁴⁷

Insgesamt ergibt sich aus dieser Studie die Tatsache, dass ein eindeutiger Zusammenhang zwischen ESR1-Amplifikationen und ER-Überexpression in Endometriumkarzinomen besteht. Ob die ESR1-Amplifikation die Entstehung eines Endometriumkarzinoms begünstigt, ist jedoch weiterhin unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Der Zusammenhang zwischen ESR1 positiven Mammatumoren und einer guten Ansprechrate auf eine Tamoxifen-Therapie lässt die Spekulation zu, dass auch ESR1 positive Patienten mit einem Endometriumkarzinom von einer Anti-Östrogenen Therapie profitieren können.

5. Zusammenfassung

Der Östrogen-Rezeptor Alpha ($ER\alpha$) spielt eine kritische und vielfältige, bislang jedoch nicht vollständig verstandene Rolle bei der Entstehung des Endometrium-Karzinoms. Die meisten endometrialen Karzinome exprimieren $ER\alpha$ und einige von diesen reagieren günstig auf eine Anti-Östrogen-Therapie. Andererseits stellt jedoch eine Tamoxifen-Therapie einen großen Risikofaktor für die Entwicklung eines endometrialen Karzinoms dar. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Amplifikation des ESR1-Gens, welches für den Östrogen-Rezeptor Alpha codiert, einen Mechanismus für die Überexpression von ER-Alpha in Brusttumoren darstellt.

Diese Studie wurde entwickelt, um die potentielle Rolle von ESR1-Amplifikationen in Endometrium-Tumoren zu erforschen. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und Immunhistochemie wurden Gewebe-Mikro Arrays von 368 Endometriumkarzinomen und Großschnitte von 43 Fällen von Endometrium Hyperplasien auf ESR1-Genamplifikationen und $ER\alpha$ Protein-Expression untersucht. In der FISH zeigte sich eine ESR1-Amplifikation in 40 von 176 (23%) der Karzinome, in 6 von 19 (32%) der atypischen komplexen Hyperplasien, in 3 von 10 (30%) der komplexen Hyperplasien ohne Atypien und in 2 von 14 (14%) der einfachen Hyperplasien ohne Atypien. Eine hohe ER-Alpha Proteinexpression war in Endometriumkarzinomen signifikant mit einer ESR1-Amplifikation assoziiert ($p=0.0036$). Diese Daten weisen darauf hin, dass einer $ER\alpha$ -Überexpression in Endometriumkarzinomen häufig eine ESR1 Amplifikation zugrunde liegt, und suggerieren, dass die ESR1 Amplifikation bei einem signifikanten Anteil der Endometriumkarzinome eine entscheidende Rolle in deren Entwicklung spielt.

Unter Beachtung der prädiktiven Rolle der ESR1-Amplifikation für Tamoxifen-Reaktionen bei Brustkrebs wird es interessant sein zu erforschen, welche Reaktion ESR1-amplifizierte Endometriumkarzinome auf Östrogenantagonisten zeigen.

6. Abkürzungen

- **Acetyl-CoA** = Acetyl-Coenzym A
- **Anti-DIG-AK** = Anti-Digoxigenin Antikörper
- **BAC-Probe** = Bacterial Artificial Chromosome
- **CEA** = Carcinoembryonales Antigen
- **CEP 6** = Chromosome Enumeration Probe
- **DNA** = Desoxyribonukleinsäure
- **DAPI** = 4',6-Diamidino-2-phenylindol
- **dNTP** = Desoxyribonukleosidtriphosphate
- **dTTP** = Desoxythymidintriphosphat
- **ESR** = Eostrogenrezeptorgen
- **Endo- CA** = Endometriumkarzinom
- **Er-alpha** = Eostrogenrezeptor-alpha
- **Er-beta** = Eostrogenrezeptor-beta
- **EIC** = Endometriale intraepitheliales Karzinom
- **EIN** = Endometriale intraepitheliale Neoplasie
- **E1** = Estron
- **E2** = 17-β-Estradiol
- **E3** = Estriol
- **e.coli** = Escherichia coli
- **FITC** = Fluoresceinisothiocyanat
- **FISH** = Fluoreszenz in situ-Hybridisierung

- **FIGO** = **F**édération **I**nternationale de **G**ynécologie et d'**O**bstétrique
- **FSH** = **F**ollikelstimulierendes **H**ormon
- **hsp** = **H**eat **S**hock **P**rotein, Hitzeschockproteine
- **ICI** = **I**mperical **C**hemical **I**ndustries
- **ISH** = **I**n situ-**H**ybridisierung
- **5-JÜR** = 5- **J**ahres-**Ü**berlebensrate
- **LH** = **L**uteinisierendes **H**ormon
- **LN** = **L**ymphonodektomie
- **OT** = **O**bjektträger
- **PTEN-Gen** = **P**hosphatase and **T**ensin homolog
- **PET** = **P**ositronen-**E**missions-**T**omographie
- **PR** = **P**rogesteronrezeptor
- **PBS** = **P**hosphate **b**uffered **s**aline
- **RNA** = **R**ibonukleinsäure
- **RT** = **R**aumtemperatur
- **SERM-Therapie** = **S**elective **e**strogen **r**eceptor **m**odulators
- **TMA** = **T**issue-**M**icroarrays
- **WHO** = **W**orld **H**ealth **O**rganization

7. Literatur

1. P. Haag, N. Hanhart, M. Müller: *Gynäkologie und Urologie*. Hg. v. Dr. med Markus Müller, Medizinische Verlags- und Informationsdienste Breisach, 4. Aufl., Breisach am Rhein 2008/2009, 978-3-929851-73-1
2. W. Remmele: *Pathologie, Bd. 4, Weibliche Genitale*. Hg. v. W. Remmele, Springer Verlag, 2. Aufl., Berlin 1997, 3-540-61097-9
3. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG): *Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinoms*. URL: <http://leitlinien.net>, zugegriffen am 26. August 2009
4. U. Riede, M. Werner, H. Schäfer: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Hg. V. U. Riede, M. Werner, H. Schäfer, Thieme Verlag, 5. Aufl., Stuttgart 2004, 3-13-683305-8
5. DocChek Flexikon: *Schaumzelle*. URL: <http://flexikon.doccheck.com>, zugegriffen am 28. August 2009
6. Dr. med. S. Ackermann: *Prognosefaktoren beim Endometriumkarzinom*. In: Der Onkologe. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Volume 9, Number 11/November 2003, 10.1007/s00761-003-0598-7: 1219-1226, ISSN 0947-8965
7. D. Schmidt: *Histopathologie und Stadieneinteilung des Endometriumkarzinoms und seiner Präkanzerosen*. In: Der Onkologe. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Volume 9, Number 11/November 2003, 10.1007/s00761-003-0595-x: 1211-1218, ISSN 0947-8965
8. D. Schmidt: *Endometriale Karzinome und Vorstufen-Neue Aspekte*. In: Der Pathologe. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Volume 30, Number 4/Juli 2009, 10.1007/s00292-009-1154-2: 261-267, ISSN 0172-8113
9. H. Kappes: *Untersuchung zur Rolle von FosB, CEACAM1 und PTEN im Mammakarzinom*. Dissertation, Institut für Gynäkopathologie der Universität Hamburg Eppendorf, Hamburg 2002

10. A. Acar: *Aktivierung von β -Catenin durch Genmutation in kultivierten Hepatomzellen*. Dissertation, Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, 2005

11. T. Fukuchi: *β -Catenin Mutation in Carcinoma of the Uterine Endometrium*. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/58/16/3526>, zugegriffen am 4. September 2009

12. C. Iwers: *Prognostische Bedeutung der immunhistologischen p53 Expression beim klinisch lokalisierten Prostatakarzinom*. Dissertation, Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Hamburg 2007

13. K. J. Bühling: *Intensivkurs Gynäkologie und Geburtshilfe*. Urban und Fischer, 1. Auflage, München/Jena 2004, 3-437-42400-9

14. K. Adam: *Die Expression von Cadherin-11, der Faktor VII aktivierenden Protease, des Östrogen- und Progesteronrezeptors und die prognostische Bedeutung beim Endometriumkarzinom*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2004

15. T. Hertrampf: *Analyse molekularer Mechanismen der ER α - und ER β -vermittelten Wirkung spezifischer Liganden und des Phytoöstrogens Genistein*. Dissertation, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften an der Technischen Universität Dresden, 2007

16. M. Böster: *Untersuchungen über die wechselseitige Beeinflussung von Östrogenrezeptor- und Rezeptortyrosinkinase-Signalwegen anhand des Proliferationsverhaltens humaner endometrialer Adenokarzinomzellen*. Dissertation, Universität Lübeck, 2004

17. F. Horn: *Biochemie des Menschen*. Thieme Verlag, Stuttgart, 2002, 3-13-130881-8

18. G. Löffler: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, Heidelberg 2006, 8. Auflage, 978-3-540-32680-9

19. J. M. Berg, J. L. Tymoczko: *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, 2003, 5. Auflage, 3-8274-1303-6

20. V. Endres: *Auswirkungen von Tamoxifen auf das Uterusendometrium von Mammakarzinom-Patientinnen unter Einbeziehung des Maturitätsindexes der Vaginalschleimhaut*. Dissertation, Medizinischen Fakultät der Universität Saarland, 2005

21. E. Oberdisse, E- Hackenthal: *Pharmakologie und Toxikologie*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2002, 3., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage, 3-540-41993-4

22. T. Karow: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Ruth Lang-Roth Verlag, Köln 2006, 14. Auflage.

23. W. Böcker: *Pathologie*. Urban und Schwarzenberg Verlag, München/Wien, 1997, 3-541-15891-3

24. M. Haas: *Die Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung zur Identifizierung und Differenzierung von Campylobacterspezies sowie zum Nachweis einer Erythromycinresistenz*. Dissertation, Medizinischen Fakultät der Universität Ulm, 2009

25. K. Schandelmaier: *Charakterisierung von Schlüsselproteinen der Signaltransduktion (EGF-R, c-erbB2, Hsp90) in humanen Tumoxenografts mittels Gewebemikroarray*. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2002

26. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P: Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006, *Ann Oncol* 2007, 18:581-592

27. Kitchener H: Management of endometrial cancer, *Eur J Surg Oncol* 2006, 32:838-843

28. Silverberg SG, Kurman RJ, Nogales F, Mutter GL, Kubik-Huch RA, Tavassoli FA: Tumours of the uterine corpus: Epithelial tumors and related lesions. Edited by Tavassoli FA, Devilee P. Lyon, IARC Press, 2003, p. pp. 221-249

29. Thigpen T, Brady MF, Homesley HD, Soper JT, Bell J: Tamoxifen in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study, *J Clin Oncol* 2001, 19:364-367

30. ACOG committee opinion. No. 336: Tamoxifen and uterine cancer, *Obstet Gynecol* 2006, 107:1475-1478
31. Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, Lebeau A, Terracciano L, Al-Kuraya K, Janicke F, Sauter G, Simon R: Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer, *Nat Genet* 2007, 39:655-660
32. Wagner U, Bubendorf L, Gasser TC, Moch H, Gorog JP, Richter J, Mihatsch MJ, Waldman FM, Sauter G: Chromosome 8p deletions are associated with invasive tumor growth in urinary bladder cancer, *Am J Pathol* 1997, 151:753-759
33. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC: Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer, *J Clin Oncol* 1999, 17:1474-1481
34. Barlund M, Tirkkonen M, Forozan F, Tanner MM, Kallioniemi O, Kallioniemi A: Increased copy number at 17q22-q24 by CGH in breast cancer is due to high-level amplification of two separate regions, *Genes Chromosomes Cancer* 1997, 20:372-376
35. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, *Lancet* 1998, 351:1451-1467
36. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials, *Lancet* 2005, 365:1687-1717
37. Carlson RW, Hudis CA, Pritchard KI: Adjuvant endocrine therapy in hormone receptor-positive postmenopausal breast cancer: evolution of NCCN, ASCO, and St Gallen recommendations, *J Natl Compr Canc Netw* 2006, 4:971-979
38. Fiorica JV, Brunetto VL, Hanjani P, Lentz SS, Mannel R, Andersen W: Phase II trial of alternating courses of megestrol acetate and tamoxifen in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study, *Gynecol Oncol* 2004, 92:10-14
39. Whitney CW, Brunetto VL, Zaino RJ, Lentz SS, Sorosky J, Armstrong DK, Lee

RB: Phase II study of medroxyprogesterone acetate plus tamoxifen in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study, *Gynecol Oncol* 2004, 92:4-9

40. Baak JP, Mutter GL, Robboy S, van Diest PJ, Uytterlinde AM, Orbo A, Palazzo J, Fiane B, Lovslett K, Burger C, Voorhorst F, Verheijen RH: The molecular genetics and morphometry-based endometrial intraepithelial neoplasia classification system predicts disease progression in endometrial hyperplasia more accurately than the 1994 World Health Organization classification system, *Cancer* 2005, 103:2304-2312
41. Linja MJ, Visakorpi T: Alterations of androgen receptor in prostate cancer, *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, 92:255-264
42. Satin AD, Zhan F, Cane S et al (2005) Gene expression fingerprint of uterine serous papillary carcinoma: Identifikation of novel molecular markers of uterine serous cancer Diagnosis and therapy. *Br J Cancer* 92:1561-1573
43. Chiesa-Vottero AG, Malpica A, Deavers MT et al (2007) Immunohistochemical Overexpression of p16 und p53 in uterine serous carcinoma and ovarian high-grade serous carcinoma. *IntJ Gynecol Pathol* 26:328-333
44. Mutter GL (2000) Endometrial intraepithelial Neoplasia (EIN): will it bring order to Chaos? The endometrial Collaborative Group. *Gynecol Onco*, 76:287-290
45. Fadare O, Liang SX, Ulukus EC et al (2006) Precursors of endometrial clear cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 30:1519-1530
46. Weigel NL: Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 1996;319 (Pt 3):657-67. Review.
47. Tsai MJ, O'Malley BW: Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994;63:451-86. Review.
48. Deroo BJ, Korach KS: Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006;116(3):561-70. Review.

49. Shao W, Brown M: Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res* 2004;6(1):39-52.
50. Bergeron C, Ferency A, Toft DO, Shymala G: Immunocytochemical study of progesterone receptors in hyperplastic and neoplastic endometrial tissue. *Cancer Res* 48: 6132-6136, 1988
51. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA: Human estrogen receptor β -gene: Structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4258-4265, 1997
52. Mutter GL, Ince TA (2003) Molecular pathogenesis of endometrial cancer. In: Fuller A, Seiden MV, Young R (eds) *Uterine cancer: American Cancer Society atlas of clinical oncology*. Decker, Hamilton, Ontario, Canada
53. Tashiro H, Isacson C, Levine R et al (1997) p53 gene mutations- are Common in uterine serous carcinoma and Ochsner early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 150:177-185
54. JORDAN, V.C., Tamoxifen and uterine cancer: confounding variables. *Eur-J-Cancer*, 34 Suppl. 4, S 55-51, 1998
55. Gottardis, M.M. Riccio, M.E. Satyaswaroop, P.G. Jordan, V.C., Effect of steroidal and nonsteroidal antiestrogens on the growth of a tamoxifen-stimulated human endometrial carcinoma (EnCa101) in athymic mice. *Cancer-Res.*, 50 (11), 3189-3192, 1990
56. Fornander, T. Hellström, A-C. Moberger, B., Descriptive clinicopathologic study of 17 patients with endometrial cancer during or after adjuvant tamoxifen in early breast cancer. *J-Natl-Cancer-Inst.*, 85 (22), 1850-1855, 1993
57. Bocklage, T. Lee, K.R. Elinson, J.L., Uterine mullerian adenosarcoma following adenomyoma in a woman on tamoxifen therapy. *Gynecol-Oncol.*, 44 (1), 104-109, 1992
58. Magriples, U. Naftolin, F. Schwartz, P.E. Carcangiu, M.L., High-grade endometrial carcinoma in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J-Clin-Oncol.*, 11 (3), 485-490, 1993

59. Beer.W., Uterine stromal sarcoma following tamoxifen treatment. *J-Clin-Pathol.*, 48, 596, 1995
60. Mc Cluggage, Uterine leiomyosarcoma in patient receiving tamoxifen therapy. *Acta-Obstet-Gynecol-Scand.*, 75 (6), 593-595, 1996
61. Altaras, Role of prolonged stimulation of tamoxifen in the etiology of endometrial sarcomas. *Gynecol-Oncol.*, 49 (2), 255-258, 1993

8. Danksagung

Mein besonderer Dank geht an PD. Dr. R. Simon, wissenschaftlicher Leiter der Molekularpathologie, für die ausgezeichnete und stets freundliche Betreuung.

Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. G. Sauter, Chefdirektor der Pathologie am Universitätsklinikum Eppendorf, der mir die Teilnahme an dieser Arbeit ermöglicht hat.

Schließlich bedanke ich mich bei F. Holst und allen weiteren Mitarbeitern im FISH Labor, für die gute Kooperation und Unterstützung.

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:N.Seyedi.....