Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Gynäkologie

Direktorin: Prof. Dr. med. Barbara Schmalfeldt

Einfluss von ICAM1, ICAM2 und BCAM auf die Metastasierung und die Prognose des Ovarialkarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Nicole Kelle
aus Hamburg

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 21.01.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. Leticia Oliveira-Ferrer

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Tabellenverzeichnis ..... **V**

1. Einleitung **1**

1.1 Das Ovar **1**

1.1.1 Embryologie 1

1.1.2 Form und Lage 1

1.2 Ovarialkarzinome **2**

1.2.1 Epidemiologie 2

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren 4

1.2.3 Protektive Faktoren 5

1.2.4 Risikofaktoren 6

1.2.5 Klinik, Früherkennung und Diagnostik 9

1.2.6 Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms 11

Epitheliale Tumoren 13

Keimstrang-Stroma-Tumoren 14

Keimzelltumoren 14

1.2.7 Stadieneinteilung 15

1.2.8 Therapie von Ovarialtumoren 16

Operative Therapie 17

Chemotherapie 18

Alternative Therapien 19

Nachsorge 20

1.2.9 Prognosefaktoren 20

1.3 Metastasierung des Ovarialkarzinoms **22**

1.4 Adhäsionsmoleküle **24**

1.4.1 ICAM1 - Intercellular adhesion molecule 1 24

1.4.2 ICAM2 - Intercellular adhesion molecule 2 27

1.4.3 BCAM - Basal cell adhesion molecule 29

1.5 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit **32**

2. Material und Methoden **33**

2.1 Material **33**

2.1.1 Patientinnenkollektiv 33

2.1.2 Material und Geräte für die Immunhistochemie 33

2.1.3 Material und Geräte für die BCA-Proteinbestimmung 35

2.1.4 Material und Geräte für den Western-Blot 36

2.2 Methoden **39**

2.2.1 Immunhistochemische Untersuchung 39

Gewebe für die Immunhistochemie 39

Immunhistochemische Färbung 39

Kontrollen 42
Auswertung der Immunhistochemie....43
2.2.2 Western-Blot-Analyse....44
Herstellung von Tumorlysaten....44
Proteinbestimmung 45
Western Blotting 46
Herstellung der Gele 47
Probenvorbereitung....48
Blotten der Proteine 49
Blocken und Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper....50
Detektion....50
Re-Blot-Verfahren 51
Densitometrische Auswertung....51
3. Ergebnisse 53
3.1 Das Patientinnenkollektiv 53
3.2 Immunhistochemische Analyse 57
3.2.1 ICAM1 57
3.2.2 BCAM 60
3.3 Western-Blot-Analyse 64
3.3.1 Untersuchung des Gesamtkollektivs 64
Häufigkeiten und t-Test-Berechnungen....64
3.3.2 ICAM1 68
Analyse der Primärtumoren mittels χ^2-Test und Log-Rank-Test....68
3.3.3 BCAM 71
Analyse der Primärtumoren mittels χ^2-Test und Log-Rank-Test 71
4. Diskussion....74
4.1. Einfluss von klinisch-pathologischen Parametern auf die Prognose des Ovarialkarzinoms 74
4.2 Immunhistochemische Analyse....76
4.3 Western-Blot-Analyse 77
4.3.1 Western-Blot-Analyse von ICAM1 78
4.3.2 Western-Blot-Analyse von BCAM 80
5. Zusammenfassung 82
6. Abkürzungsverzeichnis....84
7. Literaturverzeichnis....86
8. Danksagung 97
9. Lebenslauf....98
10. Eidesstattliche Erklärung....99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anatomie der inneren weiblichen Geschlechtsorgane 2
Abb. 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen aller Neuerkrankungen bei Frauen in Deutschland im Jahr 2014....3
Abb. 3: Prozentualer Anteil der Zahl der Krebssterbefälle bei Frauen in Deutschland im Jahr 2014 3
Abb. 4: Wild-Typ ICAM-1; die IgSF Domänen D1 – D5 sind schematisiert als Schleifen dargestellt ...25
Abb. 5: Die Adhäsion und Transmigration von Lymphozyten durch Epithelien 26
Abb. 6: Struktur von BCAM....30
Abb. 7: Prinzip der ABC-Methode....41
Abb. 8: 96-Well-Platte....46
Abb. 9: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem gruppierten FIGO-Stadium (FIGO I+II/ FIGO III/ FIGO IV) 55
Abb. 10: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem gruppierten FIGO-Stadium (FIGO I+II/ FIGO III/ FIGO IV) 55
Abb. 11: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem Grading 55
Abb. 12: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem Grading 55
Abb. 13: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem Nodalstatus....55
Abb. 14: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem Nodalstatus 55
Abb. 15: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem Metastasenstatus 56
Abb. 16: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem Metastasenstatus 56
Abb. 17: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem OP-Ergebnis 56
Abb. 18: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem OP-Ergebnis....56
Abb. 19: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem Alter bei der Erstdiagnose 56
Abb. 20: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem Alter bei der Erstdiagnose 56
Abb. 21: Verteilung der Stärke der immunhistochemischen Färbung von ICAM1....57
Abb. 22: Stärke der immunhistochemischen Färbung von ICAM1....58
Abb. 23: Ovarialkarzinom in 200-facher Vergrößerung, G2....59
Abb. 24: Ovarialkarzinom und ein Gefäß in 200-facher Vergrößerung, G2....59
Abb. 25: Ovarialkarzinom in 200-facher Vergrößerung, G3....60
Abb. 26: Ovarialkarzinom in 400-facher Vergrößerung, G2....60
Abb. 27: Verteilung der Stärke der immunhistochemischen Färbung von BCAM 60
Abb. 28: Stärke der immunhistochemischen Färbung von BCAM....61
Abb. 29: Ovarialkarzinom in 100-facher Vergrößerung, G2....62
Abb. 30: Ovarialkarzinom in 400-facher Vergrößerung, G2....62
Abb. 31: Ovarialkarzinom in 400-facher Vergrößerung, G2....62
Abb. 32: Ovarialkarzinom in 200-facher Vergrößerung, G3....62

Abb. 33: Beispielfilm eines Western-Blots 64
Abb. 34: Histogramm der logarithmierten ICAM1-Verteilung im Gesamtkollektiv....65
Abb. 35: Histogramm der logarithmierten ICAM1-Verteilung bei Primärtumoren 65
Abb. 36: Histogramm der logarithmierten BCAM-Verteilung im Gesamtkollektiv 66
Abb. 37: Histogramm der logarithmierten BCAM-Verteilung bei Primärtumoren 66
Abb. 38: Balkendiagramm der ICAM1- bzw. BCAM-Expressionswerte der Tumortypen im Vergleich .68
Abb. 39: Korrelation zwischen ICAM1 und dem gruppierten FIGO-Stadium (FIGO I+II/ FIGO III/ FIGO IV)....69
Abb. 40: Korrelation zwischen ICAM1 und dem gruppierten Grading (G1+G2/ G3) 69
Abb. 41: Korrelation zwischen ICAM1 und dem Nodalstatus (N0/ N1)....69
Abb. 42: Korrelation zwischen ICAM1 und dem Metastasenstatus (M0/ M1)....69
Abb. 43: Korrelation zwischen ICAM1-Expression und Gesamtüberleben....70
Abb. 44: Korrelation zwischen ICAM1-Expression und rezidivfreiem Intervall 70
Abb. 45: Korrelation zwischen BCAM und dem gruppierten FIGO-Stadium (FIGO I+II/ FIGO III/ FIGO IV)....71
Abb. 46: Korrelation zwischen BCAM und dem gruppierten Grading (G1+G2/ G3) 71
Abb. 47: Korrelation zwischen BCAM und dem Nodalstatus (N0/ N1) 72
Abb. 48: Korrelation zwischen BCAM und dem Metastasenstatus (M0/ M1) 72
Abb. 49: Korrelation zwischen BCAM-Expression und Gesamtüberleben 73
Abb. 50: Korrelation zwischen BCAM-Expression und rezidivfreien Intervall....73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histologische Klassifikation der Ovarialkarzinome 12
Tabelle 2: Stadieneinteilung der Ovarialkarzinome nach TNM und FIGO 16
Tabelle 3: Verwendete Geräte in der Immunhistochemie 33
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien in der Immunhistochemie 34
Tabelle 5: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie 35
Tabelle 6: Verwendete Geräte in der Proteinbestimmung 35
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien in der Proteinbestimmung 35
Tabelle 8: Verwendete Geräte für den Western-Blot 36
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien für den Western-Blot 37
Tabelle 10: Verwendete Antikörper für den Western-Blot 38
Tabelle 11: Pipettierschema der Proteinbestimmung 45
Tabelle 12: Klinisch-pathologische Parameter des Gesamtkollektivs 53
Tabelle 13: Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben bzw. dem rezidivfreien Intervall und den Prognosefaktoren 54
Tabelle 14: ICAM1-Expression nach Tumortyp 65
Tabelle 15: BCAM-Expression nach Tumortyp 67
Tabelle 16: Korrelation zwischen BCAM-Expression und Prognosefaktoren 70
Tabelle 17: Korrelation zwischen BCAM-Expression und Prognosefaktoren 72

1. Einleitung

1.1 Das Ovar

1.1.1 Embryologie

In der fünften Entwicklungswoche beginnt die Ausprägung der inneren Geschlechtsorgane. Diese unterscheiden sich bei männlichen und weiblichen Embryonen zunächst nicht voneinander, weshalb die frühe Phase der Entwicklung auch sexuell indifferentes Stadium genannt wird. Erst nach der siebten Woche lassen sich Unterschiede hinsichtlich der Form und der Histologie ausmachen. Die Gonadenanlagen bilden sich aus dem verdickten Epithel der Genitalleisten, die wiederum aus den beiden Urnieren entstehen. In die Gonadenanlage wandern primordiale Urkeimzellen aus dem Dottersack ein, wodurch die Keimstränge entstehen. Die Entwicklung von männlichen und weiblichen Geschlechtsorganen verläuft nun getrennt voneinander.

Die Entwicklung der Ovarien erfolgt langsam. Ab der 12. Woche vergrößern sich die Keimstränge und aus den Keimzellen werden Oogonien. Sobald die Oogonien in die Meiose, die Reifeteilung, eintreten und somit als primäre Oozyten bezeichnet werden, bilden sich die Keimstränge zurück. Die Meiose wird arretiert und erst bei der erwachsenen Frau wieder aufgenommen. Es entstehen tausende Primordialfollikel. Viele Keimzellen sterben schon vor der Geburt oder während der Oogenese ab, jedoch sind bis zur Pubertät noch etwa 200 000 Follikel pro Ovar vorhanden (Moore et al., 2013). Die Meiose der Primordialfollikel wird mit dem Eisprung vervollständigt.

Der Abstieg des Ovars in das kleine Becken erfolgt erst nach der Geburt. Verantwortlich hierfür sind zwei Leitbänder, die sich zum Ligamentum ovarii proprium zwischen Ovar und Uterus und zum Ligamentum teres uteri, das vom Uterus in den Leistenkanal zu den großen Schamlippen führt, differenzieren. (Lippert and Deller, 2011)

1.1.2 Form und Lage

Das Ovar der erwachsenen Frau ist im kleinen Becken gelegen. Es misst bei der geschlechtsreifen Frau etwa 4 x 2 x 1 cm. Nach der Menopause bildet es sich zurück und schrumpft auf Mandelgröße. Das Ovar ist intraperitoneal in der Fossa ovarica an der Seitenwand des kleinen Beckens gelegen. Sein oberer Pol wird von den Fimbrien der Tuba uterina bedeckt, der untere Pol ist dem Uterus zugewandt. Über die Fa-

cies mediales kommt das Ovar in Kontakt mit Darmschlingen, lateral grenzt es an die Vasa obturatoria und den Nervus obturatorius. Das Ovar steht über das Ligamentum suspensorium ovarii als Aufhängeband mit der Beckenwand in Verbindung. Dieses enthält die Vasa ovarica, die den Eierstock mit Blut versorgen, sowie Lymphgefäße und Nerven. Das Ligamentum ovarii proprium zieht vom vorderen Pol des Ovars zum Corpus uteri. Es enthält den Ramus ovaricus der Arteria uterina, der ebenfalls das Ovar mit Blut versorgt, und zusätzlich elastische Fasern und glatte Muskulatur, wodurch es in geringem Maße seine Lage aktiv verändern kann. Vom oberen Rand des Ovars geht zudem das hintere Blatt des Ligamentum latum uteri aus. Dadurch ist es in seiner Beweglichkeit eingeschränkt (Schünke et al., 2005).

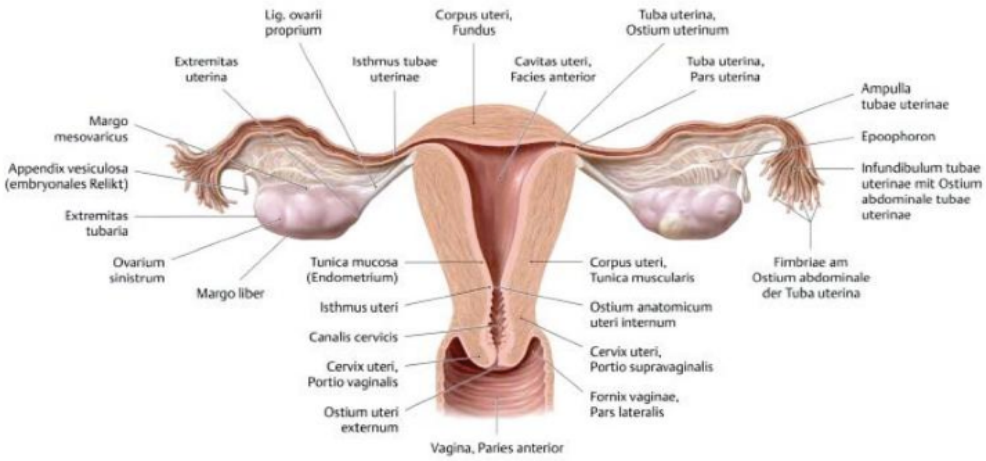

Abb. 1: Anatomie der inneren weiblichen Geschlechtsorgane (Schünke et al., 2005)

Histologisch lässt sich das Ovar in vier Schichten untergliedern. Ganz außen gelegen ist eine Schicht des viszeralen Blattes des Peritoneums, gefolgt von der Tunica albuginea ovarii, einer bindegewebigen Kapsel. Die inneren beiden Schichten bestehen aus dem Cortex ovarii, in dem die Ovarialfollikel lagern, und aus der Medulla ovarii, die Bindegewebe, Gefäße und Nerven beherbergt (Lippert and Deller, 2011).

1.2 Ovarialkarzinome

1.2.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist die achthäufigste Krebserkrankung der Frau. Im Jahr 2014 erkrankten in Deutschland 7250 Frauen an malignen Ovarialtumoren, was 3,2% aller

Krebsneuerkrankungen ausmacht. Es traten 5354 Todesfälle auf, das entspricht 5,3% aller Krebstodesfälle (Abbildungen 2 und 3). Unter den gynäkologischen Tumoren nimmt es den dritten Platz der Tumorstatistik ein, hinter dem Mamma- und dem Endometriumkarzinom. In den letzten Jahren ist ein kontinuierlicher Rückgang der Erkrankungs- und Sterberaten des Ovarialkarzinoms zu verzeichnen (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2017).

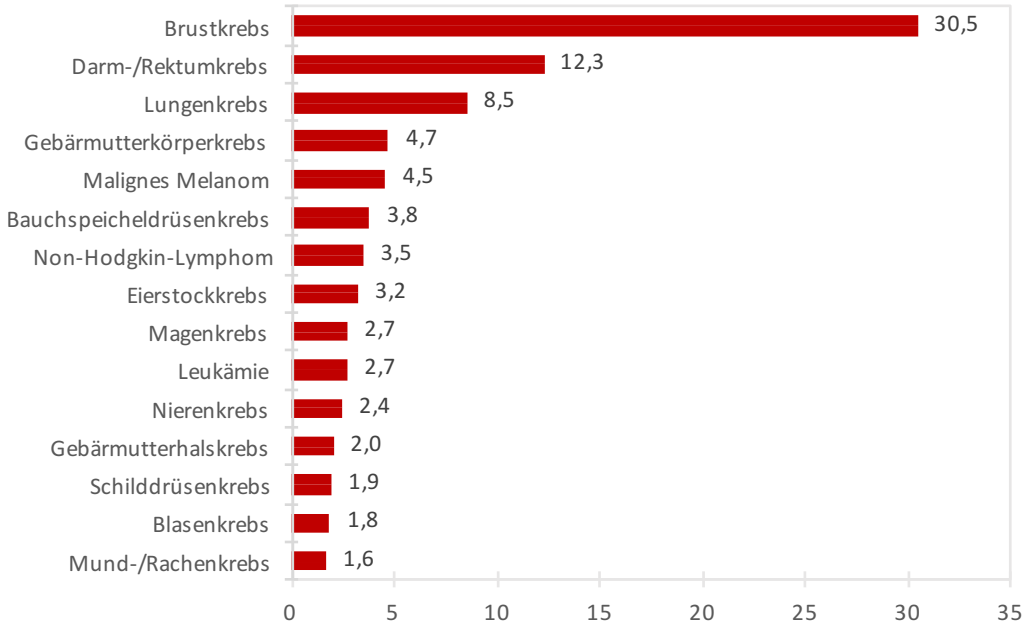

Abb. 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen aller Neuerkrankungen bei Frauen in Deutschland im Jahr 2014 (nach Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2017)

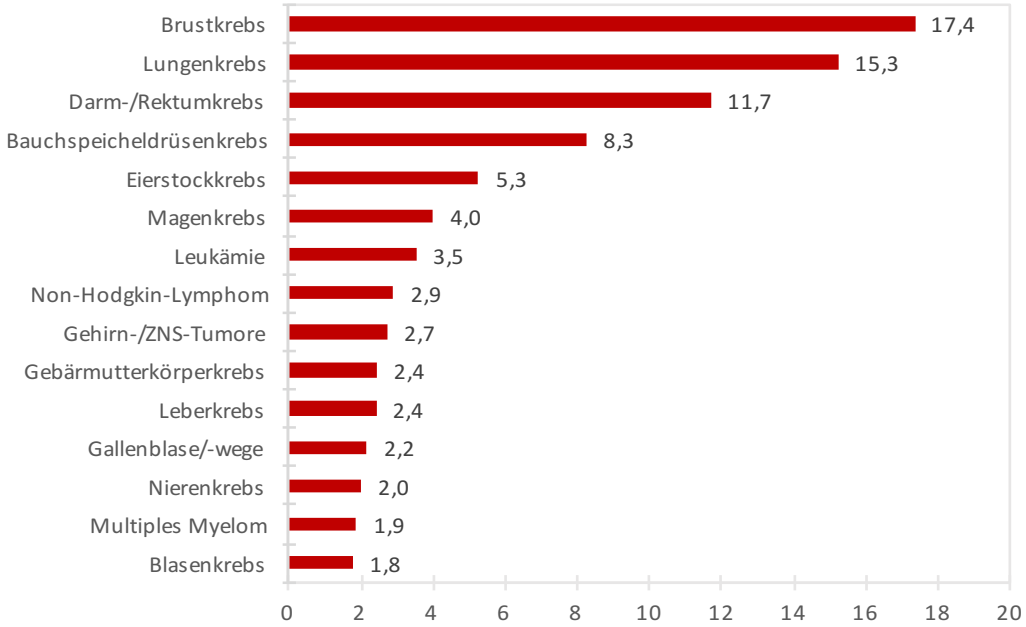

Abb. 3: Prozentualer Anteil der Zahl der Krebssterbefälle bei Frauen in Deutschland im Jahr 2014 (nach Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2017)

Pro Jahr erkranken ca. 12 von 100 000 Frauen am Ovarialkarzinom, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 69 Jahren liegt. Das höchste Erkrankungsrisiko haben Frauen ab der 70. Lebensdekade. Bei den früh auftretenden Ovarialtumoren handelt es sich in den meisten Fällen um Keimzelltumoren, wobei das Adenokarzinom den Großteil der Erkrankungen ausmacht.

Das Ovarialkarzinom wird häufig erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt, was die Heilungschancen reduziert. Daraus resultiert die niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von gerade einmal 42% (zum Vergleich: die 5-Jahres-Überlebensrate des Mammakarzinoms beträgt 87%) (Robert-Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013).

Weltweit erkrankten im Jahre 2012 Schätzungen zufolge 239 000 Frauen, was einem Anteil von 4% der Krebsneuerkrankungen entspricht, und es traten 152 000 Todesfälle auf. Die Verteilung der Erkrankungsraten auf den verschiedenen Kontinenten unterscheidet sich jedoch voneinander. Die höchsten Inzidenzraten sind in Nord- und Osteuropa, Nordamerika und Ozeanien zu verzeichnen mit Werten von ca. 13/100 000, während in Afrika und Teilen Asiens mit ca. 3/100 000 deutlich weniger Frauen erkranken (Stewart and International Agency for Research on Cancer, 2014).

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Zu der Entstehung von Ovarialkarzinomen gibt es mehrere Theorien, die in wissenschaftlichen Kreisen diskutiert werden, wobei die genauen Ursachen noch immer nicht eindeutig geklärt sind. Ebenso gibt es einige Risikofaktoren sowie protektive Faktoren, die im Folgenden näher erläutert werden.

Die „Incessant Ovulation“-Hypothese von Fathalla besagt, dass durch zahlreiche Ovulationen im Leben einer Frau Mikrotraumata im Epithel der Ovarien entstehen, die zur Proliferation des Selbigen führen. Dabei können spontane Mutationen entstehen. Des Weiteren wurde beobachtet, dass das Ovar durch die Mikrotraumata vermehrt der östrogenreichen Follikelflüssigkeit ausgesetzt ist, was ebenfalls zur Proliferation und Mutationsanfälligkeit des Epithels führt (Fathalla, 1971).

Es gibt auch Hinweise darauf, dass erhöhte Spiegel der Gonadotropine FSH und LH einen Einfluss auf das Zellwachstum der Epithelien haben (Choi et al., 2006). Erhöhte Gonadotropin-Spiegel finden sich vor allem während der Ovulation und nach der

Menopause. Demzufolge steigt mit einer höheren Anzahl an Ovulationen, also mit einer frühen Menarche und einer späten Menopause, sowie einem erhöhten Lebensalter das Risiko, am Ovarialkarzinom zu erkranken.

Ebenso wird diskutiert, ob vor allem seröse Ovarialkarzinome ihren Ursprung in der distalen Tube oder im Bereich der Fimbrien haben könnten. Tumoren, die als primär seröse Ovarialkarzinome klassifiziert sind, zeigen sich histologisch identisch mit denen der Tube. Auch bei Frauen mit BRCA-Mutationen, denen prophylaktisch die Ovarien entnommen wurden, zeigten sich seröse Tumore im Bereich der Tube (Crum et al., 2007, Salvador et al., 2009).

1.2.3 Protektive Faktoren

Den oralen Kontrazeptiva werden für die Reduktion des Erkrankungsrisikos eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Sie enthalten vorwiegend Östrogene und Gestagene, die normalerweise den Menstruationszyklus und Schwangerschaften regulieren. Östrogene stimulieren die Eireifung und den Eisprung, während Gestagene nach einer Befruchtung dafür sorgen, dass keine weiteren Eizellen heranreifen. Das Gestagen Progesteron, das in oralen Kontrateptiva enthalten ist, ist zudem in der Lage, die Apoptoseraten in Zellen der Ovarialepithelien zu erhöhen. Die Apoptose dient in diesen Fällen dazu, mutierte Zellen zu eliminieren und damit der Entstehung von Krebs vorzubeugen (Rodriguez et al., 2002).

In einer Metaanalyse wurden die Daten von 9042 Patientinnen verglichen. 2768 von ihnen waren am Ovarialkarzinom erkrankt, 6274 gehörten der Kontrollgruppe an. Aus einem Vergleich der Patientinnen, die bereits seit fünf Jahren die Pille einnahmen und derer, die es nie taten, ergab sich ein um 58% verringertes Risiko, am Ovarialkarzinom zu erkranken. Der Studie zu folge sinkt das Risiko, am Ovarialkarzinom zu erkranken, mit der Dauer der Einnahme oraler Kontrazeptiva und sogar 20 Jahre nach der letzten Einnahme einer Pille seien noch positive Effekte zu beobachten (Bosetti et al., 2002).

Als weitere protektive Faktoren gelten Schwangerschaften und eine lange Stillzeit. Das Erkrankungsrisiko ist bereits nach der ersten Schwangerschaft um 36% verringert und sinkt mit jeder weiteren. Nach der fünften Schwangerschaft sinkt das Risiko auf 23% gegenüber Frauen, die keine Schwangerschaft ausgetragen haben (Risch

et al., 1994). Als Ursache hierfür wird angenommen, dass während einer Schwangerschaft weitere Ovulationen auf natürlichem Wege verhindert werden und der Östrogenspiegel sinkt. Auch das Stillen wirkt sich protektiv auf das Erkrankungsrisiko aus. Frauen, die ihre Kinder stillten, erkrankten seltener am Ovarialkarzinom als die, die es nicht taten. Ursächlich hierfür gilt, dass durch das Stillen die Gonadotropin-Ausschüttung vermindert wird und damit auch weitere Ovulationen verhindert werden (Rosenblatt et al., 1992).

Ein vermindertes Risiko zeigte sich ebenfalls nach Tubenligaturen, die aus verhütungstechnischen Gründen durchgeführt wurden. Der Effekt zeigte sich bei verschiedenen histologischen Typen des Ovarialkarzinoms, vor allem aber für den endometrioiden und den klarzelligen Subtypen. Als Erklärung wird angenommen, dass durch die Tubenligatur der Blutzufluss zu den Ovarien vermindert wird und auf diese Weise weniger stimulierende Hormone dorthin gelangen (Sieh et al., 2013).

1.2.4 Risikofaktoren

Es sind einige Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom bekannt, die entweder endokrinologischer oder toxikologischer Natur sind.

Nulliparität und fehlendes Stillen bergen für Frauen ein erhöhtes Risiko, an gynäkologischen Tumoren zu erkranken, so auch am Ovarialkarzinom. Studien mit Nonnen zeigten, dass das Risiko signifikant erhöht ist, vor allem postmenopausal. Ein Zusammenhang scheint auch hier mit der erhöhten Anzahl an Menstruationszyklen zu bestehen (Britt and Short, 2012).

Aus dem selben Grund zeigte sich in Fall-Kontroll-Studien, dass eine frühe Menarche und eine späte Menopause Risikofaktoren darstellen (Parazzini et al., 1989).

Wie bereits erwähnt stellten sich erhöhte Hormonexpositionen als kanzerogen heraus. Es gibt viele Studien, die den Effekt von Hormonersatztherapien von Frauen im Klimakterium auf die Entwicklung von Ovarialkarzinomen untersuchten. Hormonersatztherapien können als Östrogen-Monotherapie verabreicht werden oder in Kombination mit Progesteron. Frauen, die Östrogen-Monotherapien erhalten, haben nach einer Hormoneinnahme von zehn oder mehr Jahren ein erhöhtes Erkrankungsrisiko. Das Risiko stellte sich als 1,6-mal so hoch heraus wie für Frauen ohne Hormonersatztherapie. Für kombinierte Therapien ließ sich dieser Effekt nicht beobachten (La-

cey et al., 2002). Neuere Studien, die vermehrt den Effekt von kombinierten Therapien untersuchten, beschreiben auch für eine Behandlung mit Östrogenen in Kombination mit Progesteron eine kanzerogene Wirkung (Trabert et al., 2012, Collaborative Group On Epidemiological Studies Of Ovarian et al., 2015).

Es wird ebenfalls diskutiert, ob Frauen nach einer assistierten Fertilisation durch hormonelle Stimulation einem erhöhten Krebsrisiko ausgesetzt sind. Whittemore et al. zeigten bereits 1992, dass Frauen nach dem Gebrauch von fruchtbarkeitsfördernden Medikamenten häufiger am Ovarialkarzinom erkranken (Whittemore et al., 1992). Auch aktuellere Studien beobachteten dieses Phänomen. Vor allem Borderline-Tumoren, aber auch invasive Karzinome traten vermehrt auf (van Leeuwen et al., 2011). Jedoch wird auch gegensätzlich beschrieben, dass die hormonelle Stimulation keinen Einfluss auf die Entstehung von Krebs hat (Siristatidis et al., 2013, Reigstad et al., 2015).

Einen weiteren Risikofaktor stellt die Endometriose dar. Bei dieser Erkrankung befindet sich Endometrium außerhalb der Gebärmutter. Es wird vermutet, dass sich bei 5-10% der an Endometriose erkrankten Frauen ein Ovarialkarzinom entwickelt. Karzinome vom endometrioiden und vom klarzelligen Typ seien dabei häufiger vertreten als in der nicht erkrankten Vergleichspopulation. Als ursächlich hierfür wird angesehen, dass durch die Endometriose vermehrt Entzündungszellen in die Ovarien einwandern und dort Oxidanzien freisetzen, die die DNA beschädigen und daraufhin Krebs entwickeln könnten. Auch Zytokine und Wachstumsfaktoren, die durch die Entzündung freigesetzt werden, könnten durch die Induktion von Zellproliferationen für die Krebsentstehung mit verantwortlich sein (Ness, 2003).

Im Allgemeinen gelten Entzündungen unterschiedlicher Entitäten als Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom. Studien bestätigten, dass das Krebsrisiko durch Adnexitis oder Salpingitis signifikant erhöht ist (Risch and Howe, 1995, Seidman et al., 2002).

Auch das Alter gilt als Risikofaktor. Eine Begründung dafür findet sich ebenfalls in der Theorie, dass Entzündungen die Krebsentstehung begünstigen. Es stellte sich heraus, dass mit steigendem Alter die COX-1 Expression in den Ovarien erhöht ist (Eilati et al., 2012). COX-1 ist das Enzym, das für die Herstellung von Entzündungsparametern wie Prostaglandinen verantwortlich ist. COX-1 ist in Tumoren häufig erhöht (Gupta et al., 2003). Die steigende Anzahl an Ovulationszyklen und die Exposition gegenüber Noxen spielen im Alter ebenfalls eine Rolle.

Die karzinogene Wirkung von Noxen wie Nikotin gilt auch für das Ovarialkarzinom. Laut einer japanischen Studie haben Frauen mit einem Nikotinkonsum von 10-19 Packyears ein relatives Risiko von 5,56 (95% CI = 1,68–19,06), am Eierstockkrebs zu erkranken (Niwa et al., 2005).

Auch die Ernährung und das Gewicht von Frauen haben einen Einfluss auf die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms. Eine norwegische Kohortenstudie mit 1,1 Millionen Frauen fand heraus, dass ein hoher oder sehr hoher BMI bei Jugendlichen oder jungen Frauen mit einem erhöhten späteren Erkrankungsrisiko gegenüber normalgewichtigen Frauen assoziiert ist (RR 1,56 (95% CI=1,04-2,32). Bei erwachsenen übergewichtigen Frauen konnte kein solcher Effekt beobachtet werden (Engeland et al., 2003).

Eine Studie in den Niederlanden konnte belegen, dass ein höherer Konsum gesättigter Fettsäuren mit einem höheren Risiko für epitheliale Ovarialtumoren einhergeht als ein niedriger Konsum. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich für Cholesterin und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wohingegen der Konsum von Bananen mit einem niedrigeren Risiko einhergeht (Merritt et al., 2015).

Der Entstehung eines Ovarialkarzinoms kann auch eine genetische Prädisposition zugrunde liegen. Bei etwa 5-10% der Tumore handelt es sich um die hereditäre Form. Diese lässt sich anhand des Phänotyps unterteilen in das familiäre Mamma- und Ovarialkarzinomsyndrom (HBOC), das etwa 90% der Fälle ausmacht, und in das HNPCC (Hereditary non-polyposis colorectal carcinoma) oder auch Lynch-Syndrom, einer erblich bedingten Form des Darmkrebses, wobei es häufig auch zu Endometrium- und Ovarialtumoren kommt (Watson and Lynch, 1993, 1996).

Dem familiären Mamma- und Ovarialkarzinomsyndrom liegt eine inaktivierende Keimbahnmutation des breast cancer gene, BRCA1 (80%) oder auch BRCA2 zugrunde. Das Lebenszeitrisiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken liegt für Frauen mit einer Mutation des BRCA1-Gens bei etwa 40% und bei einer Mutation des BRCA2-Gens bei etwa 25%. Die Frauen erkranken im Alter von 35-50 Jahren und somit etwa 20-25 Jahre früher als bei der sporadischen Form des Eierstockkrebses (Petru, 2014).

Das Lynch-Syndrom ist unter anderem Folge einer Mutation in den Mismatch-Reparatur-Genen MSH1 und MSH2, sodass fehlerhaft replizierte DNA in den betroffenen

Zellen nicht erkannt wird (1996). Es kommt zur verstärkten Ausbildung von Adenokarzinomen verschiedener Organsysteme, vor allem aber des Dickdarms, des Endometriums, des Magens und auch des Ovars.

1.2.5 Klinik, Früherkennung und Diagnostik

Ovarialkarzinome werden aufgrund ihrer unspezifischen und spät auftretenden Beschwerden häufig erst sehr spät entdeckt. Zu den Symptomen zählen Völlegefühl, Blähungen, unklare abdominielle Schmerzen, Zunahme der Miktionsfrequenz und Obstipationen. Des Weiteren kann es zu Aszites kommen und damit auch zu einer Zunahme des Bauchumfangs und des Gewichts (Petru, 2014). Diese Symptome geben keinen eindeutigen Hinweis auf das Vorliegen einer Tumorerkrankung, weshalb die Ovarialkarzinome meist erst bei Routineuntersuchungen wie der Sonografie oder der Palpation des Unterleibs entdeckt werden. Aus diesem Grund werden die Tumore zu 80-90% in einem FIGO III-IV Stadium diagnostiziert, was die schlechte Prognose erklärt (Kreienberg, 2009).

Eine Studie mit Frauen, denen prophylaktisch die Eierstöcke und Eileiter entfernt wurden, hat ergeben, dass Ovarialkarzinome dennoch eine Entwicklungszeit von mehreren Jahren haben, bevor sie entdeckt werden. Demnach verbleiben die Tumore mehr als vier Jahre in einem in situ Stadium, in Stadium I oder II, und mehr als ein Jahr in einem Stadium III oder IV, bevor sie klinisch auffällig werden. Der Durchmesser der Tumore beträgt während dieser Zeit jedoch lediglich einen Zentimeter, was die Entdeckung mittels Ultraschall erschwert (Brown and Palmer, 2009). Das Ovarialkarzinom entwickelt sich demnach langsam, wodurch es möglich sein müsste, es mit Hilfe einer geeigneten Screeningmethode frühzeitig zu entdecken.

Bisher gibt es keine effektive Maßnahme zur Früherkennung von Ovarialkarzinomen. Als Tumormarker für das seröse Ovarialkarzinom gilt das Glykoprotein CA-125, das im Jahre 1981 von Bast et al. entdeckt wurde (Bast et al., 1981). Werte von <35U/mL gelten als normal, erhöhte Werte liegen vor allem beim Ovarialkarzinom aber auch bei anderen Tumorerkrankungen, wie beispielsweise denen des Endometriums, der Eileiter und der Lunge vor. Aber auch einige gutartige Erkrankungen wie Endometriose, entzündliche Prozesse im Bauchraum oder Schwangerschaften bewirken einen Anstieg des CA-125, weshalb sich dieser Marker nicht zur Früherkennung von Ova-

rialkarzinomen eignet.

Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung von CA-125 haben gezeigt, dass ein niedrigeres Tumorstadium (FIGO I) mit einem niedrigeren Wert des Tumormarkers einhergeht, auch wenn dieser keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Frauen nimmt. Frauen mit einem niedrigen Tumorstadium wiesen zudem häufiger normale CA-125 Konzentrationen auf als Frauen mit fortgeschrittenen Erkrankungen (Fader et al., 2014).

Die englische Studie „UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening" hat den Effekt von Screeningmaßnahmen auf die Prognose des Ovarialkarzinoms an drei Gruppen von insgesamt mehr als 200 000 Frauen untersucht. Eine Gruppe wurde per Ultraschall untersucht, bei einer zweiten Gruppe wurden die CA-125-Spiegel kontrolliert und zusätzliche Ultraschalluntersuchungen durchgeführt. Eine dritte Gruppe erhielt keinerlei Untersuchungen. Die Ergebnisse zeigten, dass nach einer Zeit von 7-14 Jahren das Mortalitätsrisiko in der zweiten Gruppe um 28% gesenkt wurde. Dennoch wurden nur insgesamt 59% der Ovarialkarzinome entdeckt (Jacobs et al., 2015).

Im klinischen Alltag ist kein routinemäßiges Screening für das Ovarialkarzinom vorgesehen, die jährliche Vorsorgeuntersuchung sollte jedoch von jeder Frau wahrgenommen werden. Frauen, die an einer BRCA-Mutation leiden, werden halbjährlich sowohl per transvaginalem Ultraschall als auch per Palpation untersucht und erhalten eine CA-125-Bestimmung (Kreienberg, 2009).

Als diagnostische Maßnahme kommt zunächst einmal die Anamnese in Frage. Da das Ovarialkarzinom, wie oben beschrieben, keine spezifischen Symptome verursacht, sollten mögliche Krankheitszeichen bei Vorsorgeuntersuchungen mit abgefragt werden. Auch der Allgemeinzustand der Patientinnen kann Aufschluss geben über ihre gesundheitliche Verfassung. Im Anschluss an die Anamnese sollte immer eine klinische Untersuchung erfolgen, die die Inspektion des Abdomens und die bimanuelle Palpation umfasst. Größere Tumore können zum Teil bereits von außen sichtbar sein, kleinere können ertastet werden. Unregelmäßige, knotige, nicht verschiebliche und beidseitig auftretende Tumore sind dabei eher als maligne einzustufen. Die weiterführende Ultraschalluntersuchung muss bei Patientinnen durchgeführt werden, die Auffälligkeiten in der Anamnese zeigen oder bei denen suspekte Tastbefunde vorliegen. Ziel der Untersuchung ist es, maligne von benignen Tumoren zu unterscheiden

und so unnötige invasive Diagnostik wie beispielsweise eine Laparaskopie zu vermeiden. Zur Objektivierung der vorliegenden Sonografiebefunde dienen Tumorscores. Bei begründetem Verdacht auf ein Ovarialkarzinom kommen zusätzlich noch CT- oder MRT-Bildgebung in Betracht (Kreienberg, 2009). Endgültige Sicherheit über die Dignität eines Tumors kann jedoch nur mittels einer Probeentnahme und anschließende pathologische Beurteilung des Gewebes gewonnen werden. Hierfür sind invasive operative Verfahren wie die Laparaskopie oder die Laparatomie notwendig.

1.2.6 Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms

Histologische Klassifikation

Die WHO (World Health Organisation) klassifiziert Ovarialkarzinome nach ihrem Ursprungsgewebe in drei Hauptgruppen. Das sind zum einen die epithelialen Tumoren, die Keimstrang-Stroma-Tumoren und die Keimzelltumoren (Tavassoli et al., 2003). Diese Klassifikation sagt nichts über die Entität des Tumors aus, sie können sowohl benigne als auch maligne sein. Die epithelialen Tumore stellen mit 65-75% die häufigsten Neubildungen dar, die Keimstrang-Stroma-Tumoren machen circa 5-10% aus und die Keimzelltumoren etwa 3-5% (Klöppel et al., 2013). Die malignen Tumoren werden zusätzlich nach FIGO- und TNM-Stadium eingeteilt, worauf später noch detaillierter eingegangen wird. In der folgenden Tabelle 1 werden die Unterteilungen der drei Hauptgruppen sowie die weiteren histologischen Subtypen aufgelistet.

Tabelle 1: Histologische Klassifikation der Ovarialkarzinome (Kreienberg, 2009, Klöppel et al., 2013)

1. Epitheliale Tumore
Seröse Tumoren
Muzinöse Tumoren
Endometrioide Tumoren
Klarzellige Tumoren
Transitionalzellige Tumoren
Plattenepitheliale Tumoren
Gemischte epitheliale Tumoren
2. Keimstrang-Stroma-Tumoren
Granulosazelltumoren
Thekom-Fibrom-Gruppe
Sertoli-Stroma-Zell-Tumoren
Keimstrang-Stroma-Tumoren vom gemischten oder unklassifizierten Typ
Steroidzelltumoren
3. Keimzelltumoren
Dysgerminom
Dottersacktumor
Embryonales Karzinom
Polyembryom
Chorionkarzinom
Teratome
4. Keimzell-Keimstrang-Stroma-Tumoren
Gonadobalstom
Gemischter Keimzell-Keimstrang-Tumor
5. Tumoren des Rete ovarii
6. Verschiedene Tumoren unklarer Genese
7. Tumorartige Läsionen
8. Lymphatische und hämatopoetische Tumoren
9. Ovarialmetastasen anderer Primärtumoren

Epitheliale Tumoren

Epitheliale Tumoren sind die am häufigsten im Ovar vorkommenden Neubildungen. Unter ihnen gibt es gutartige - benigne - Formen (50-60%), bösartige - maligne - Formen (30-40%) und eine intermediäre Tumorform, die Borderline-Tumoren (10-20%) (Klöppel et al., 2013). Die Tumorzellen gehen von der ovariellen Deckzellschicht aus, wobei sich die verschiedenen Tumorformen in ihrer Histologie unterscheiden.

Unter den benignen epithelialen Ovarialtumoren kommen Zystadenome und Adenofibrome vor, die sowohl seröser als auch muzinöser Natur sein können. Makroskopisch erscheinen Zystadenome als eventuell gekammerte, glattwandige Zysten, die mit einer serösen oder muzinösen Flüssigkeit gefüllt sind und eine Größe von bis zu 50 cm erreichen können. Größere Zysten sollten operativ entfernt werden, da die Gefahr einer Torsion besteht (Klöppel et al., 2013).

Den Großteil der malignen epithelialen Tumore machen die serösen (45%) und die muzinösen (15-20%) Adenokarzinome aus. Die Zellen des serösen Ovarialkarzinoms ähneln der Schleimhaut der Tuben. Muzinöse Karzinome zeichnen sich durch ein schleimbildendes Epithel aus, wobei die Tumoren häufig sehr groß werden können mit Durchmessern von 15-30 cm. Die seltener vorkommenden endometrioiden Tumoren (10-20%) sind histologisch identisch mit den Endometrium-Karzinomen des Uterus und sind häufig mit Endometriose assoziiert. Sie machen sich früher als die anderen epithelialen Malignome durch klinische Beschwerden wie Blutungen und abdominelle Schmerzen bemerkbar und weisen deshalb eine bessere Prognose auf. Etwa 5% der epithelialen Karzinome sind klarzellig differenziert. Sie weisen ein helles Zytoplasma auf. Sehr selten kommen andere Tumorformen wie Transitionalzellkarzinome und Plattenpithelkarzinome vor (Kreienberg, 2009, Klöppel et al., 2013).

Die Borderline-Tumoren stehen zwischen den benignen und den malignen Tumoren und werden daher auch als „Tumoren von niedrig malignem Potenzial“ bezeichnet. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Morphologie und dem klinischen Erscheinungsbild, da sie zwar atypisch proliferierte Zellen aufweisen, jedoch kein destruierendes Wachstum. Die häufigsten Vertreter sind auch in diesem Fall die serösen und die muzinösen Borderline-Tumoren (Kommoss et al., 2001, Silverberg et al., 2004). Borderline-Tumoren treten im Mittel etwa 10-15 Jahre früher auf als Karzinome und zeichnen sich durch eine wesentlich bessere Prognose aus. Die 10-Jahres-Überle-

bensrate beträgt 80% für alle Stadien. Zur Diagnosesicherung werden die Tumoren entfernt und intraoperativ im Schnellschnitt untersucht (Klöppel et al., 2013).

Keimstrang-Stroma-Tumoren

Keimstrang-Stroma-Tumoren setzen sich histologisch zusammen aus den Zellen des primitiven Keimstranges (Granulosa- und Sertolie-Zellen) sowie aus Stromazellen (Fibroblasten, Theca- und Leydig-Zellen). Sie können hormonaktiv sein, wodurch die Patientinnen im Rahmen von Zyklusstörungen oder Postmenopausenblutungen klinisch auffällig werden. Generell weist diese Tumorgruppe eine relativ gute Prognose auf.

Am häufigsten kommen Granulosazelltumoren vor, die sich unterteilen in eine adulte und eine juvenile Form, die bis zu einem Alter von 30 Jahren auftritt. Granulosazelltumoren weisen eine niedrige Rezidiv- und Metastasierungsrate auf.

Der Thekom-/Fibromgruppe gehören vor allem die Thekome, die Fibrome und die Fibrosarkome an. Die Thekome sind überwiegend benigne, während Fibrosarkome eine schlechte Prognose aufweisen.

Sertoli-Stroma-Zell-Tumore treten sehr selten auf (0,4% der Ovarialtumoren) und weisen einen Häufigkeitsgipfel im Alter von 20-40 Jahren auf. Sie entstehen aus Sertoli- und Leydig-Zellen und zeigen nur in 20% ein malignes Wachstum (Klöppel et al., 2013).

Keimzelltumoren

Die Keimzelltumoren gehen aus den primitiven Keim- oder Stammzellen hervor. Sie sind die häufigste Tumorentität des Ovars bei Kindern und Jugendlichen und zu 90-95% benigne. Die ebenfalls bei jungen Patientinnen auftretenden malignen Keimzelltumoren weisen häufig ein sehr aggressives Wachstum auf (Klöppel et al., 2013).

Dysgerminome machen 3-5% aller malignen Ovarneoplasien aus und treten überwiegend bei Frauen zwischen 20-30 Jahren auf. Sie gehen aus entarteten primordialen Eizellen hervor und treten vermehrt bei Frauen mit genetisch bedingter sexueller Fehlentwicklung auf. Klinisch imponieren sie häufig durch Amenorrhoe. Die Therapiemöglichkeiten sind gut, die Heilungsraten betragen auch bei metastasierten Tu-

moren 60-90% (Klöppel et al., 2013).

Der seltene Dottersacktumor tritt ebenfalls überwiegend bei jugendlichen Patientinnen auf und zeigt sich klinisch durch akut einsetzende Unterbauchschmerzen. Die Prognose ist sehr schlecht, die 2-Jahres-Überlebensrate beträgt 30-40%.

Embryonale Karzinome und Polyembryome weisen, ähnlich wie die Dottersacktumoren, ebenfalls eine sehr schlechte Prognose auf. Sie gehen aus entarteten Keimzellen hervor und verursachen bei den Patientinnen häufig Blutungsunregelmäßigkeiten.

Die hochmalignen Chorionkarzinome treten, außerhalb von Schwangerschaften, vorwiegend bei Kindern auf und entstehen aus fehldifferenzierten Keimzellen. Es handelt sich hierbei um einen schnell wachsenden Tumor, der eine Resistenz gegenüber Strahlen- oder Chemotherapie aufweist (Klöppel et al., 2013).

Teratome des Ovars lassen sich in maligne Formen, die unreifen Teratome, und in deutlich häufiger auftretende benigne Formen, die Dermoidzysten, unterteilen. Sie entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen. Die unreifen Teratome weisen makroskopisch Strukturen wie Knochen oder Knorpel auf und können sich im Wachstum sehr aggressiv verhalten. Dermoidzysten enthalten hingegen reife Gewebsstrukturen aus allen drei Keimblättern, wie Haare und Zähne. Sie machen etwa 50% der benignen Ovarialtumore aus.

1.2.7 Stadieneinteilung

Die klinisch-histopathologische Einteilung der Ovarialkarzinome kann anhand von zwei Klassifikationssystemen erfolgen. Das ist zum einen die TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) und zum anderen die FIGO-Klassifikation (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique). Beide Systeme sind sich sehr ähnlich und berücksichtigen die Tumorausbreitung und das Tumorstadium. Die folgende Tabelle 2 zeigt die TNM- und die FIGO-Stadien mit den jeweiligen Kriterien (Prat and Oncology, 2014).

Tabelle 2: Stadieneinteilung der Ovarialkarzinome nach TNM und FIGO

TNM	FIGO	Kriterien
T1	**I**	Tumor begrenzt auf Ovarien oder Tube
1a	IA	Tumor auf ein Ovar oder eine Tube begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars oder der Tube
1b	IB	Tumor auf beide Ovarien bzw. Tuben begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien oder der Tuben
1c	IC	Tumor begrenzt auf ein Ovar oder beide Ovarien bzw. Tuben, Kapseldurchbruch, Tumor auf der Oberfläche oder Tumorzellen im Aszites oder Spülzytologie
T2	**II**	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien bzw. Tuben und breitet sich im Becken aus
2a	IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Gebärmutter und/oder Eileiter
2b	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
2c	IIC	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b), Tumorzellen im Aszites oder der Spülzytologie
T3	**III**	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien bzw. Tuben, histologisch nachgewiesene Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens
3a	IIIA	mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
3b	IIIB	makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung ≤ 2 cm
3c	IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung > 2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
Nx	-	Keine Aussage zu regionären Lymphknotenmetastasen möglich
N0	-	Keine Metastasen in regionären Lymphknoten
N1	-	Regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden
M0	-	Keine Fernmetastasen
M1	**IV**	Fernmetastasen vorhanden

1.2.8 Therapie von Ovarialtumoren

Die beste Therapie des Ovarialkarzinoms besteht in der operativen Entfernung des Tumors. Als ergänzende Methoden stehen vor allem die Chemotherapie sowie Strahlentherapie und Hormontherapie zur Verfügung.

Operative Therapie

Bei begründetem Verdacht auf ein Ovarialkarzinom sollte schon zu diagnostischen Zwecken eine operative Diagnosesicherung durchgeführt werden. Intraoperativ können in diesem Zusammenhang zudem Aussagen getroffen werden über die Tumorausbreitung, was wichtiger Bestandteil des Stagings ist (Kreienberg, 2009).

Zum intraoperativen Staging gehören die Inspektion und Palpation des Abdomens, eine Peritonealzytologie, Biopsien sowohl aus auffälligen als auch aus unauffälligen Regionen und die operative Entfernung der Adnexe, des Uterus, des Omentum majus, des Appendix veriformis und einiger Lymphknoten aus dem Becken und paraaortal (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013).

Ein vollständiges Staging ist wichtig für die Therapie und die Prognose des Ovarialkarzinoms, vor allem bei frühzeitig entdeckten Tumoren. Patientinnen, bei denen ein optimales Staging durchgeführt wurde, zeigen ein besseres progessionsfreies und Gesamtüberleben (Trimbos et al., 2010).

Ziel der Primäroperation bei Ovarialtumoren ist es, das Tumorgewebe jeder Entität radikal und möglichst vollständig zu entfernen. Der operative Zugang erfolgt über eine Längsschnittlaparotomie. Es wird eine sogenannte Debulkingoperation durchgeführt, die bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen indiziert ist. Hierzu gehört die beidseitige hohe Adnexexstirpation und die Hysterektomie. Auch das Blasen- und Douglasperitoneum wird mit entfernt. In vielen Fällen ist das Rektosigmoid betroffen, sodass dieses ebenfalls im Sinne einer en-bloc-Resektion reseziert werden muss. Da das Omentum majus von vielen Lymphgefäßen durchzogen wird, ist es sehr häufig von Metastasen befallen und wird im Rahmen der Operation ebenfalls entnommen, ebenso der Appendix veriformis. Häufig ist es notwendig, weitere Bereiche des Peritoneums zu resezieren. Auch die pelvinen und die paraaortalen Lymphknoten sollten im Rahmen der Debulkingoperation entfernt werden. Eine Tumorfreiheit oder -reduktion ist schwierig zu erreichen, wenn große Teile des Darmes oder des Mesenteriums befallen sind (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013). Patientinnen mit einem makroskopisch nicht sichtbaren Tumorrest (R0) oder solche mit einem Tumorrest, der kleiner als ein Zentimeter ist (R1), zeigten ein besseres Überleben als Frauen, bei denen nach der Operation Tumorreste von mehr als zwei Zentimetern verblieben (R2) (Hoskins et al., 1994, Horowitz et al., 2015). Daher ist es sinnvoll, die Operation in speziellen gynäkoonkologischen Zentren durchführen zu lassen, da die Operateu-

re mehr Erfahrung aufweisen. Im Falle von Metastasen sollten auch diese reseziert werden, um die Prognose der Patientinnen zu verbessern (Kreienberg, 2009).

Im FIGO-Stadium I unilateral sowie bei Borderline-Tumoren kann bei noch bestehendem Kinderwunsch ein fertilitätserhaltendes Operationsverfahren in Erwägung gezogen werden, jedoch sollten die Patientinnen über das erhöhte Rezidivrisiko aufgeklärt werden (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013).

Chemotherapie

Nach abgeschlossenem Staging, beziehungsweise abgeschlossener Operation, kann Patientinnen eine Chemotherapie angeboten werden. Bei sehr früh entdeckten Ovarialkarzinomen im Stadium IA Grad 1 ist eine solche Therapie nicht sinnvoll. Bei fortgeschrittener Erkrankung können die Frauen jedoch von der Therapie profitieren. Ab Stadium IC oder Stadium IA/B und Grad 3 wird eine adjuvante platinhaltige Chemotherapie über 6 Zyklen empfohlen. Als Substanz für das frühe Ovarialkarzinom kommt vor allem Carboplatin (AUC 5) als Monotherapie in Frage (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013).

Beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom ist eine Kombinationstherapie aus Carboplatin (AUC 5) und Paclitaxel (175mg/m² über drei Stunden i.v.) Mittel der Wahl. Die Therapie wird in insgesamt sechs Zyklen alle drei Wochen verabreicht. Eine Therapie mit Cisplatin wäre ebenfalls möglich, Carboplatin weist jedoch das bessere Nebenwirkungsprofil auf. Ab Stadium IIIB kann zusätzlich als Erhaltungstherapie mit dem Angiogenesehemmer Bevacizumab therapiert werden, wodurch das Gefäßwachstum des Tumors reduziert wird (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer intraperitonealen Chemotherapie. Die Wirksamkeit wird aktuell jedoch diskutiert, einige Studien berichten von einer hohen Toxizität (Wright et al., 2016). Aus diesem Grund wird sie selten angewendet. Eine andere Form der intraperitonealen Chemotherapie, die hypertherme intraperitoneale Chemotherapie, wird aktuell in klinischen Studien untersucht und bisher als verträglich eingestuft (D'Hondt et al., 2016).

Auch die neoadjuvante Chemotherapie wird aktuell in der Klinik selten eingesetzt. Es wird jedoch diskutiert, ob sie in einigen Fällen als Alternative zu der Standardtherapie angewendet werden kann. Die erste große Studie, die den Effekt der neoadjuvanten

Chemotherapie auf das Ovarialkarzinom untersucht hat, stammt von Vergote et al. aus dem Jahre 2010. Frauen mit Tumoren im FIGO-Stadium IIIC und IV wurden entweder nach dem Standard therapiert oder sie erhielten vor der Operation drei Zyklen Chemotherapie. Es stellte sich heraus, dass das Operationsergebnis hinsichtlich des Tumorrestes bei den neoadjuvant therapierten Frauen besser war, nicht jedoch das Gesamtüberleben *(Vergote et al., 2010)*. Ähnliche Ergebnisse brachte eine andere Studie hervor. Das progressionsfreie Überleben der Frauen betrug 12 Monate in der Gruppe der neoadjuvant therapierten Frauen und 10,7 Monate in der Gruppe der primär operierten Frauen, die 3-Jahres-Überlebensrate 34% gegenüber 32% (Kehoe et al., 2015).

Alternative Therapien

Neben den beiden Standards bestehend aus Operation und Chemotherapie werden gelegentlich auch andere Verfahren, wie zum Beispiel die Strahlentherapie oder eine Hormontherapie, angewendet. Die Bestrahlung erfolgt im Sinne einer Gesamtabdomenbestrahlung bei Tumorresten kleiner 4 mm über sechs Wochen. Sie ist der Chemotherapie jedoch nicht überlegen und sollte somit nur in Ausnahmefällen, wie beispielsweise Rezidiven, angewendet werden (Kreienberg, 2009). Auch die Hormontherapie hat sich nicht durchgesetzt, obwohl viele Tumoren Hormonrezeptoren an ihrer Oberfläche aufweisen. Es wird diskutiert, ob sich die Rezeptoren an der Oberfläche im Laufe der Tumorprogression verändern und somit als Target nicht mehr in Frage kommen (Voutsadakis, 2016).

Ein weiterer Ansatz alternativer Therapien sind Antikörper. Hierfür zugelassene Medikamente sind Bevacizumab und Olaparib. Als Target nutzt Bevacizumab Rezeptoren vaskulärer Wachstumshormone (VEGF), Olaparib greift als Polymeraseinhibitor in den Zyklus von BRCA-positiven Tumorzellen ein (Kim et al., 2015). Der Effekt dieser Antikörpertherapie ist gering (Oza et al., 2015). Das Prinzip der Antikörpertherapie ist jedoch vielversprechend und Bedarf weiterer Forschung. Weitere potenzielle Ziele der Antikörpertherapie sind auch die in dieser Arbeit untersuchten Adhäsionsmoleküle.

Nachsorge

Die Nachsorge ist ein wichtiges Konzept in der weiteren Betreuung der Patientinnen. Für die betroffenen Frauen ist die Erkrankung ein einschneidendes Ereignis in ihr Leben und das Therapiekonzept sollte nach der Operation und der Chemotherapie nicht abgeschlossen sein. Die Art der Nachsorge richtet sich nach Art der Primärtherapie, den Therapiefolgen und den Prognosefaktoren. Wichtige Bestandteile dieses Konzeptes sind zum Beispiel die psychoonkologische Mitbetreuung, die Einleitung von Rehabilitationsmaßnahmen, die supportive Therapie im Falle von Nebenwirkungen der Chemotherapie, die Symptombehandlung von Schmerzen und Pleura- oder Peritonealergüssen sowie auch die Nachsorgediagnostik, um Rezidive rechtzeitig aufdecken zu können (Kreienberg, 2009). Im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen sollten regelmäßige Anamnesen erhoben werden und körperliche Untersuchungen, bestehend aus Tastuntersuchungen und vaginaler Sonografie, durchgeführt werden. Die früher routinemäßig durchgeführte Bestimmung des Tumormarkes CA-125 zur Detektion von Rezidiven wird nicht mehr empfohlen, da sie den Frauen keinen Überlebensvorteil bringt (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013).

Eine weitere Option der Nachsorgetherapie ist eine Behandlung mit Hormonen. Dies wird vor allem bei jüngeren Frauen in Erwägung gezogen, die therapiebedingt postmenopausal sind und nun unter klimakterischen Beschwerden leiden. Generell wird die Hormontherapie jedoch nicht empfohlen, sie dient lediglich der Besserung der Lebensqualität (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013).

Bei weit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen kommt ein palliatives Behandlungskonzept in Frage. Es beinhaltet die medizinische Symptomkontrolle, Palliativpflege und psychosoziale Betreuung der Patientinnen bis zu ihrem Tod. Das Konzept wird individuell an jede Frau angepasst und dient der Verbesserung der Lebensqualität (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013).

1.2.9 Prognosefaktoren

Das Ovarialkarzinom ist die am häufigsten zum Tode führende gynäkologische Krebserkrankung und seine Prognose ist schlecht, da es häufig erst sehr spät entdeckt wird. Es gibt viele bekannte Faktoren, die einen Einfluss auf das Überleben der Patientinnen nach einem Ovarialtumor nehmen. Dazu gehören

- der histologische Tumortyp,
- das Tumorstadium,
- das Grading,
- der postoperative Tumorrest,
- das Alter und der Allgemeinzustand der Patientin bei Diagnosestellung sowie
- die leitliniengerechte Therapie

(Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013).

Einen gesicherten prognostischen Effekt auf das Ovarialkarzinom hat der histologische Subtyp. So weisen klarzellige und muzinöse Tumoren eine signifikant schlechtere Prognose auf als serös-papilläre und endometrioide Tumoren (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013). Das liegt daran, dass klarzellige und muzinöse Tumoren deutlich schlechter auf die platinhaltige Chemotherapie ansprechen als Tumore anderer Entitäten (Enomoto et al., 2004, Hess et al., 2004).

Die Überlebensrate der Patientinnen ist ebenfalls abhängig vom Tumorstadium. So weisen Frauen mit einem FIGO Ia klassifizierten Tumor eine 5-Jahres-Überlebensrate von 90% auf, bei FIGO IIa 71%, bei FIGO IIIa 47% und bei FIGO IV schließlich nur noch 19% (Heintz et al., 2006).

Auch der Differenzierungsgrad der Tumore nimmt Einfluss auf das Überleben der Frauen. So zeigen Patientinnen mit einem R0-resezierten Tumor mit G1 oder G2 Grading ein signifikant besseres Überleben als Frauen mit einem G3-klassifizierten Tumor. Ein solcher Effekt lässt sich bei einem nicht restlos resezierten Tumor nicht beobachten (du Bois et al., 2009). In der Klinik hat dieser Unterschied zwischen den Differenzierungsgraden zur Folge, dass G1-klassifizierte Tumoren im frühen Stadium keiner Chemotherapie unterzogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013).

Der postoperative Tumorrest hat sich ebenfalls als sehr wichtiger Prognosefaktor herausgestellt. Mehrere Studien konnten zeigen, dass sich der nach der Operation verbliebene Tumorrest negativ auf das progressionsfreie sowie auf das Gesamtüberleben auswirkt (Bristow et al., 2002, Eisenhauer et al., 2006, du Bois et al., 2009, Horowitz et al., 2015). Von den tumorfrei operierten Frauen überlebten ca. 46% ohne ein Rezidiv, bei Frauen mit einem Rest größer 1 cm waren es nur noch 10%. Auch

die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidives ist bei R0-resezierten Tumoren mit im Mittel 15,5 Monaten größer als bei R1-resezierten Tumoren mit 7,8 Monaten (du Bois et al., 2009).

Das Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung nimmt ebenfalls Einfluss auf die Prognose des Karzinoms. Frauen, die im Alter von 70 Jahren oder älter erkrankten, verstarben häufiger und früher als jüngere Frauen (Thigpen et al., 1993). Ähnliches lässt sich für den Allgemeinzustand der erkrankten Frauen beobachten: Frauen, die einen Karnofsky-Index von 70 oder schlechter aufweisen, haben signifikant schlechtere Überlebenschancen als Frauen in einem besseren Allgemeinzustand (Omura et al., 1991).

Des Weiteren hat die Einhaltung der von der Leitlinie gebotenen Therapiekonzepte Auswirkungen auf den Therapieerfolg (du Bois et al., 2005). Auch die Art des operierenden Zentrums und die Qualifikation des Operateurs nehmen Einfluss auf das Outcome (Earle et al., 2006).

Weitere Parameter, die mit der Prognose des Ovarialkarzinoms assoziiert sind, sind das Vorhandensein von Aszites (Chi et al., 2001) und prä- und postoperativ erhöhte Serumspiegel von CA-125 (van Dalen et al., 2000, Paramasivam et al., 2005).

Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. rer. nat. Oliveira-Ferrer konnten zeigen, dass das Vorhandensein von c-Fos mit einer besseren Prognose einhergeht. Die Patientinnen, denen Tumormaterial mit einer hohen c-Fos-Expression entnommen wurde, weisen ein längeres rezidivfreies Intervall sowie ein höheres Gesamtüberleben auf (Mahner et al., 2008). Das Tumorsuppressorgen weist einen proapoptotischen Effekt auf und nimmt außerdem hemmenden Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen (Oliveira-Ferrer et al., 2014). Dafür werden unter anderem die Adhäsionsmoleküle ICAM1, ICAM2 und BCAM verantwortlich gemacht, die in Kapitel 1.3 näher beschrieben werden.

1.3 Metastasierung des Ovarialkarzinoms

Maligne Tumoren besitzen die Fähigkeit zur Metastasierung. Metastasen entstehen durch vom Primärtumor abgelöste Zellen. Diese wandern über das Blut, die Lymphflüssigkeit oder aber auch, wie beim Ovarialkarzinom, die peritoneale Flüssigkeit in andere Körperregionen. Sie siedeln sich dort an und vermehren sich, sodass ein

neuer, bösartiger Tumorherd entsteht.

Diese Herde besitzen, wie die Primärtumoren auch, die Fähigkeit zum invasiven und destruierenden Wachstum.

Zur lymphogenen Metastasierung kommt es nach Einbruch der Tumorzellen in die Lymphbahnen. Dabei erlangen die Zellen Anschluss an die lymphatischen Abflusswege und breiten sich schließlich in den Lymphknoten aus, wo sich Lymphknotenmetastasen bilden.

Bei der hämatogenen Metastasierung gelangen Tumorzellen in die Blutgefäße, wodurch es zu einer Verschleppung der Zellen in ferner gelegene Körperregionen kommt. Dort siedeln sich die Zellen an und eine Metastase entsteht (Fidler, 1978).

Die Metastasierung des Ovarialkarzinoms in der Bauchhöhle erfolgt per continuitatem. Das bedeutet, dass sich die Tumorzellen entlang benachbarter Strukturen im Bauchraum ausbreiten. Die Tumorzellen des Ovarialkarzinoms sind während der Tumorgenese einigen genetischen Änderungen ausgesetzt, wodurch sich die Zelladhäsionsmoleküle und die proteolytischen Eigenschaften der Zellen verändern. Aus Zellen des epithelialen Typs werden Zellen des mesenchymalen Typs. Dadurch ist es den Zellen möglich, sich aus dem Zellverband des Primärtumors zu lösen. Hierfür werden E-Cadherine verantwortlich gemacht, Adhäsionsmoleküle, deren Expression auf Tumorsphäroiden, die in Aszites schwimmen, niedriger ist als auf Zellen eines soliden Tumors. Durch den natürlich vorhandenen Aszites gelingt es den Tumorzellen, sich in der Bauchhöhle auszubreiten, wobei die Zellen bevorzugt am Omentum majus und dem Peritoneum anhaften. Sobald sich eine Metastase manifestiert hat, durchlaufen die Zellen wiederum eine Veränderung vom mesenchymalen zurück zum epithelialen Phänotyp (Lengyel, 2010).

Die so entstandenen Metastasen unterscheiden sich von denen anderer epithelialer Tumoren. Sie benötigen für ihre Migrationen keinen Anschluss an das Blutgefäßsystem und auch die Invasionstiefe beschränkt sich auf die oberflächliche Schicht des Peritoneums (Shield et al., 2009, Lengyel, 2010).

Zu den Zelladhäsionsmolekülen, die an der Metastasierung und der Zell-Zell-Interaktion beteiligt sein könnten, zählen die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle ICAM1, ICAM2 und BCAM.

1.4 Adhäsionsmoleküle

Fast alle Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Strukturen, durch die sie mit anderen Zellen oder Strukturen in Verbindung treten und an diese binden können. Diese Strukturen werden als Adhäsionsmoleküle bezeichnet, auch CAMs (Cell adhesion molecule) genannt. Es handelt sich hierbei um Proteine, die in der Zellmembran verankert sind und aus dieser herausragen. Es gibt unterschiedliche Klassen von Adhäsionsmolekülen, wie die Selektine, die Integrine, die Ca^{2+}-abhängige Cadherin-Familie und die Ca^{2+}-unabhängigen Proteine mit Immunglobulindomänen, zu der auch die I-CAMs (Intercellular Adhesion Molecule) gehören (Christen and Jaussi, 2005, Siegenthaler and Amann-Vesti, 2006).

Die Immunglobulindomäne der immunglobulingekoppelten Adhäsionsmoleküle hat eine Länge von 70-110 Aminosäuren. Ihre Struktur besteht aus zwei ß-Faltblättern, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Isacke and Horton, 2000). Durch die intrazellulär mit den Adhäsionsmolekülen verknüpften Tyrosin- bzw. Serinproteinkinasen erhält die Zelle wichtige Signale für Wachstum, Differenzierung oder Migration (Siegenthaler and Amann-Vesti, 2006). Es gibt eine Reihe weiterer spezialisierter Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie wie beispielsweise N-CAM (Neural cell adhesion molecule), L-CAM (Liver cell adhesion molecule) und V-CAM (Vascular cell adhesion molecule) (Edelman, 1983, Christen and Jaussi, 2005). Auch B-CAM (Basal cell adhesion molecule) gehört dieser Gruppe an (Eyler and Telen, 2006).

Im Folgenden werden die Adhäsionsmoleküle ICAM1, ICAM2 und BCAM, die als Vertreter der immunglobulingekoppelten Adhäsionsmoleküle relevant für diese Arbeit sind, vorgestellt.

1.4.1 ICAM1 - Intercellular adhesion molecule 1

ICAM1 ist das bedeutendste der bisher bekannten 5 ICAMs. Es wird auch als CD54 (Cluster of Differentiation 54) bezeichnet. Erstmals wurde es im Jahre 1986 von Rothlein et al. im Zusammenhang mit LFA-1-abhängigen Adhäsionsvorgängen beschrieben (Rothlein et al., 1986).

ICAM1 hat ein Gewicht von 90-115 kDa. Biochemisch handelt es sich um ein Glykoprotein, dessen N-Terminus extrazellulär und dessen C-Terminus intrazellulär gelegen ist. Die extrazelluläre Domäne bildet fünf antikörperähnliche Schleifen aus, über

die es mit seinen Liganden in Verbindung tritt (Abbildung 4). Die Bindungsstelle für das Integrin $\alpha_L\beta_2$ befindet sich nahe der ersten Domäne, die für $\alpha_M\beta_2$ im Bereich der dritten Domäne. ICAM1 kann sowohl in Dimeren als auch in Multimeren auf der Zelloberfläche auftreten (Diamond et al., 1991, Jun et al., 2001). Zu seinen Liganden zählen LFA-1 (auch CD11a/CD18 oder $\alpha_L\beta_2$) und Mac-1 (auch CD11b/CD18 oder $\alpha_M\beta_2$), die hauptsächlich auf Leukozyten exprimiert sind. Vor allem klinisch relevant sind die Bindungsstellen für Rhinoviren im Rahmen von Atemwegsinfekten und Erythrozyten, die mit dem Parasiten Plasmodium falciparum, dem Erreger der Malaria, infiziert sind (Diamond et al., 1991, Jun et al., 2001).

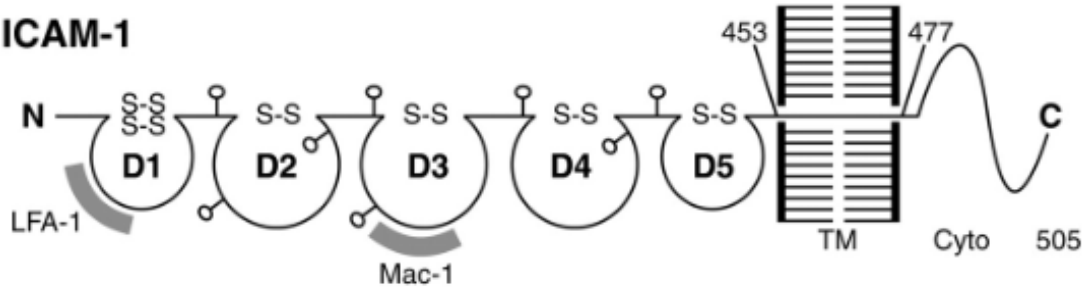

Abb. 4: Wild-Typ ICAM-1; die IgSF Domänen D1 – D5 sind schematisiert als Schleifen dargestellt (Jun C-D et al., 2001)

Die Expressionsrate von ICAM1 auf der Zelloberfläche kann durch verschiedene Faktoren moduliert werden und hängt davon ab, welche Rezeptoren eine Zelle exprimiert. Die Zytokine Interleukin-1β (IL-1β), Tumornekrosefaktor-α (TNFα), Interferon-γ (IFN-γ) sowie Retinsäure und eine Reihe weiterer Mediatoren bewirken durch Geninduktion eine vermehrte Expression von ICAM1 (Kuppner et al., 1990, Bassi et al., 1995, van de Stolpe and van der Saag, 1996). Andere Substanzen hingegen, wie Glucocorticoide und Nicotinamide, bewirken eine Herabregulierung von ICAM1 (van de Stolpe et al., 1993, van de Stolpe and van der Saag, 1996).

Im menschlichen Körper ist ICAM1 in unterschiedlichen Gewebearten zu finden. Beschrieben wurde ein Vorkommen auf diversen Epithelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Leukozyten (Dustin et al., 1986). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Immun- und Entzündungsreaktionen.

Die Interaktion zwischen ICAM1 und LFA-1 hat eine große Bedeutung in der T-Zell-

vermittelten Immunantwort. Naive T-Zellen tragen LFA-1 auf ihrer Oberfläche, während antigenpräsentierende Zellen wie B-Zellen, Makrophagen oder dendritische Zellen, ICAM1 exprimieren. Es kommt zu einer antigen-unabhängigen Adhäsion zwischen beiden Zellen. Die spezifische Aktivierung der Zelle beruht darauf, dass die auf den MHC-Molekülen präsentierten Antigene von den T-Zell-Rezeptoren erkannt werden, wodurch die T-Zelle aktiviert wird und die Immunantwort ausgelöst wird (Springer, 1990).

Auch andere Zellen des Blutes, die LFA-1 oder MAC-1 exprimieren, können mit dem auf Endothelzellen präsentierten ICAM1 in Verbindung treten. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen werden Zytokine sezerniert, die auch das Endothel aktivieren. Dadurch wird vermehrt ICAM1 exprimiert. Dies ermöglicht eine verstärkte Interaktion zwischen dem Endothel und den Leukozyten (Butcher, 1991, Murphy et al., 2012). Auch bei der Auswanderung von Lymphozyten aus der Blutbahn ins periphere Gewebe, beispielsweise in lymphatische Gewebe, spielt ICAM1 neben anderen Modulatoren eine Rolle (Oppenheimer-Marks et al., 1991).

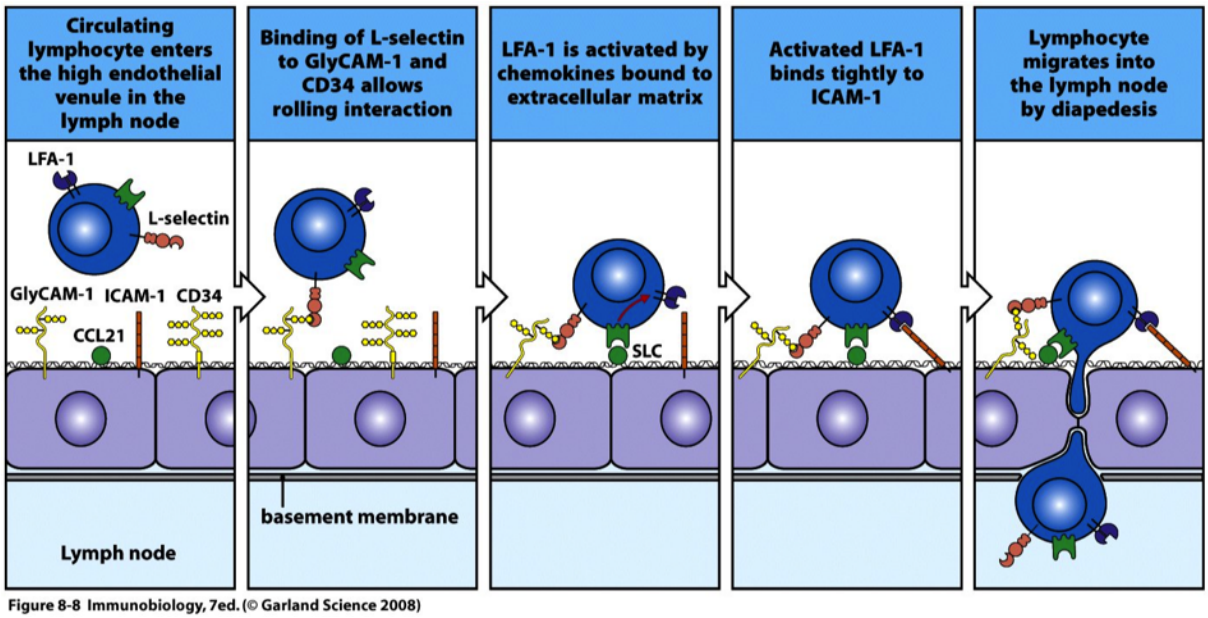

Abb. 5: Die Adhäsion und Transmigration von Lymphozyten durch Epithelien (Murphy et al., 2012)

Außer auf den oben genannten Gewebearten konnte ICAM1 auf den Zellen von einigen Tumorarten nachgewiesen werden. Plattenepithelkarzinome des Ösophagus und der Mundhöhle weisen ICAM1 auf. Beim Ösophaguskarzinom konnte nachgewiesen

werden, dass das Adhäsionsmolekül beteiligt ist an der Tumorbildung und -gestaltung sowie an der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Tsai et al., 2015). Das Mundhöhlenkarzinom exprimiert ICAM1 vor allem im Bereich der Invasionsfront des Tumors und die Menge der Expression ist assoziiert mit Lymphknotenmetastasen, der Invasivität des Tumors und einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen (Usami et al., 2013). Auch im papillären Schilddrüsenkarzinom wird ICAM1 in Verbindung gebracht mit Lymphknotenmetastasen und der extrathyroidalen Invasion von Tumorzellen (Zhang et al., 2016). Die Prognose des Lungenkarzinoms ist ebenfalls abhängig von der ICAM1-Expression (Kotteas et al., 2014). Auch im häufigsten Tumor der Frau, dem Mammakarzinom, konnten erhöhte ICAM1-Expressionsraten festgestellt werden (Rosette et al., 2005, Schroder et al., 2011). Tumore, die ein vermehrtes Vorkommen von ICAM1 zeigen, gehen mit einer schlechteren Zelldifferenzierung einher, weisen einen negativen Hormonrezeptorstatus auf, haben Lymphknotenmetastasen und sind mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall assoziiert (Schroder et al., 2011).

Tumore anderer Entitäten hingegen, wie das kolorektale Karzinom, zeigen mit vermehrter ICAM1-Expression ein gegenteiliges Verhalten: sie weisen eine bessere Prognose und weniger Lymphknoten- oder Lebermetastasen auf (Maeda et al., 2002).

Welchen Einfluss ICAM1 auf das Ovarialkarzinom hat ist bisher weitgehend unbekannt. Es gibt widersprüchliche Angaben darüber, ob gesundes Ovargewebe ICAM1 exprimiert (Arnold et al., 2001) oder nicht (Hayes and Seigel, 2009). Am Ovarialkarzinom erkrankte Frauen weisen erhöhte Werte des im Blut löslichen sICAM1 auf (Banks et al., 1993). Eine Studie konnte belegen, dass eine Hochregulation von ICAM1 auf Ovarialkarzinomzellen in vitro zu einem verringerten Zellwachstum und zu einer geringeren Sensitivität gegenüber Cisplatin führt (de Groote et al., 2014).

1.4.2 ICAM2 - Intercellular adhesion molecule 2

ICAM2, auch bekannt als CD102, gehört ebenfalls der Gruppe der immunglobulingekoppelten Adhäsionsmoleküle an. Erstmals beschrieben wurde es durch Dustin et al. im Jahre 1988 (Dustin and Springer, 1988). Es ist ähnlich aufgebaut wie ICAM1. Das Molekül besitzt eine intrazelluläre Domäne mit dem C-Terminus, eine hydrophobe transmembranöse Domäne sowie eine extrazelluläre Domäne mit dem N-Terminus.

Die extrazelluläre Domäne verfügt, im Gegensatz zu ICAM1, über lediglich zwei antikörperähnliche Schleifen, die in ihrer Aminosäuresequenz jedoch sehr ähnlich sind zu Anteilen des ICAM1 Moleküls (Staunton et al., 1989). ICAM2 hat ein Gewicht von 55-65 kDa (Isacke and Horton, 2000). Zu den Liganden von ICAM2 gehört LFA-1. Jedoch scheint für die Zell-Zell-Adhäsion ein engerer Kontakt nötig zu sein als für die Adhäsion von ICAM1 zu LFA-1, da die LFA-1 Bindungsstelle auf dem ICAM1 Molekül weiter von der Oberfläche entfernt ist als bei ICAM2. Mac-1 gehört hingegen nicht zu den Liganden von ICAM2 (de Fougerolles et al., 1991).

Ein weiterer Unterschied zwischen ICAM1 und ICAM2 ist, dass sich die Expressionsrate von ICAM2 auf der Zelloberfläche nicht durch Zytokine regulieren lässt (Staunton et al., 1989).

ICAM2 befindet sich ebenso auf Endothelzellen (Staunton et al., 1989), auf Leber- und Nierenzellen sowie auf Lymphozyten. Allgemein wird ICAM2 von deutlich weniger Zellen exprimiert als ICAM1. Auf nicht durch Zytokine aktiviertem Endothel ist die ICAM2-Expressionsrate zehnmal so hoch wie die von ICAM1. Aus diesem Grund wird angenommen, dass ICAM2 in ruhendem, nicht entzündetem Gewebe hauptsächlich verantwortlich ist für die Migration von Lymphozyten, während ICAM1 vorwiegend während einer Entzündung beteiligt ist. Darüber hinaus ist ICAM2 an der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und mit dem Epstein-Bar-Virus infizierten Lymphozyten beteiligt (de Fougerolles et al., 1991). Im Gegensatz zu ICAM1 befindet sich ICAM2 auch auf der Oberfläche von Thrombozyten. Dadurch kann es zu Interaktionen zwischen Thrombozyten und LFA-1 exprimierenden Lymphozyten kommen, die wesentlicher Bestandteil von Entzündungsreaktionen und der Genese von Thrombosen ist (Diacovo et al., 1994).

Bei Männern wird ICAM2 ebenfalls von den Sertoli- und Urkeimzellen im Hoden exprimiert, wo es eine Rolle in der Spermatogenese spielt (Xiao et al., 2013).

Weiterhin ist ICAM2 im Stande, Bindungen mit α-Actinin einzugehen, einem Strukturmolekül, das im Zytoskelett von Zellen vorkommt (Heiska et al., 1996). α-Actinin wiederum ist beteiligt an der Motilität von Zellen und beeinflusst die Invasivität von Tumorzellen (Honda et al., 1998). Diese Tatsache wird dafür verantwortlich gemacht, dass ICAM2 exprimierende Zellen von Neuroblastomen mit einer verminderten Fähigkeit zur Metastasierung ausgestattet sind, wie Feduska et al. 2015 belegen konnten (Feduska et al., 2015). Weitere Experimente konnten belegen, dass γδ-T-Zellen,

eine Untergruppe der T-Lymphozyten, an ICAM2 binden. γδ-T-Zellen können epitheliale Tumorzellen binden und eliminieren, sofern sie ICAM2 exprimieren, wie an Zelllinien des Pakreaskarzinoms gezeigt werden konnte (Liu et al., 2009). Eine weitere Studie, die sich mit dem Pankreaskarzinom beschäftigte, fand heraus, dass die ICAM2-Expression mit der Entwicklung von Adenom zum Karzinom abnimmt und somit die Identifikation und Elimination von Tumorzellen erschwert ist (Hiraoka et al., 2011). Die Arbeitsgruppe um Tanaka et al. fand in Versuchen heraus, dass auch das Magenkarzinom durch ICAM2 beeinflusst wird. Mäuse mit peritoneal metastasiertem Magenkarzinom, denen ICAM2 über Vektoren injiziert wurde, überlebten signifikant länger als Mäuse ohne ICAM2. Dieser Entdeckung könnte zu Grunde liegen, dass die Adhäsion und Aktivierung natürlicher Killerzellen durch die Anwesenheit von ICAM2 verbessert wird (Tanaka et al., 2004). Im Mundhöhlenkarzinom scheint ICAM2 eine erhöhte Resistenz gegenüber Strahlentherapie zu bewirken. Tumorzellen, die viel ICAM2 exprimierten, sprachen schlechter auf die Bestrahlung an und Zellen, in denen ICAM2 herabreguliert wurde, wiesen eine erhöhte Sensitivität auf (Ishigami et al., 2008). Daten zum Ovarialkarzinom gibt es bisher nicht.

1.4.3 BCAM - Basal cell adhesion molecule

Das Gen für BCAM, auch bekannt als CD239 oder F8/G253, wurde im Jahre 1984 durch Rettig et al. auf Chromosom 19 entdeckt (Rettig et al., 1984). BCAM und das Lutheran Antigen Glykoprotein sind zwei Splicevarianten des Gens auf Chromosom 19 und gehören beide der Gruppe der immunglobulingekoppelten Adhäsionsmoleküle an (Rahuel et al., 1996). Genauer beschrieben wurde BCAM durch Campbell et al. im Jahre 1994. BCAM hat ein Gewicht von 90 kDa und besteht aus einer intrazellulären Domäne mit dem C-Terminus, einer hydrophoben transmembranösen Domäne und einer extrazellulären Domäne mit dem N-Terminus. Die immunglobulinähnlichen, extrazellulären Domänen bestehen aus zwei variablen (V) und drei konstanten Schleifen (C2) (Abbildung 6). Die extrazellulären Anteile von BCAM und dem Lutheran Antigen Glykoprotein sind identisch, die beiden Moleküle unterscheiden sich nur durch ihre intrazelllluläre Domäne voneinander, die bei dem Lutheran Antigen Glykoprotein um 40 Aminosäuren länger ist. Die beiden Adhäsionsmoleküle binden an die gleichen Liganden, jedoch ist die intrazelluläre Signaltransduktion verschieden (Zen et al., 1999). BCAM weist ebenfalls strukturelle Ähnlichkeiten zu den Zelladhä-

sionsmolekülen MUC18 und SC1 auf. MUC18 ist beteiligt an der Metastasierung von Zellen des malignen Melanoms (Campbell et al., 1994).

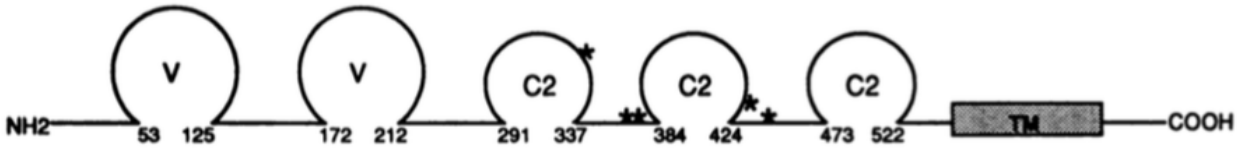

Abb. 6: Struktur von BCAM (Campbell et al., 1994)

Die Arbeitsgruppe um Qin Zen fand heraus, dass Sichelzellen, eine pathologisch veränderte Form der Erythrozyten, BCAM exprimieren, worüber sie an Laminin binden, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix. Bindungsstelle hierfür stellt die proximale fünfte Schleife des BCAM-Moleküls dar. Auch gesunde Erythrozyten tragen BCAM auf ihrer Oberfläche, jedoch etwa 67% weniger als die Sichelzellen (Udani et al., 1998, Zen et al., 1999). Diese Tatsache wird für die Sichelzellanämie verantwortlich gemacht. Bei diesem Krankheitsbild verfangen sich die pathologischen Erythrozyten im Gefäßnetz und werden lysiert, wodurch es zur Anämie kommt. Die Bindung von Laminin an BCAM wird bei diesen Zellen durch den erhöhten BCAM-Gehalt erleichtert (Hines et al., 2003). Im gesunden Gewebe befindet sich BCAM weiterhin auf dem Endothel von Hautgefäßen, in Mantelzellen von Haarfollikeln und auf Keratinozyten der Basalmembran der Epidermis (Schon et al., 2000).

BCAM wird auch von einer Reihe von Tumorzellen exprimiert. So zeigte sich in Versuchen, dass Zelllinien vom Neuroblastom, Melanom, Astrozytom, Chorionkarzinom, Nierenkarzinom und Fibroblastom BCAM auf ihrer Oberfläche exprimieren (Rettig et al., 1984). Bei Untersuchungen an verschiedenen Hauttumoren beobachteten Margarete Schön et al. eine Hochregulation von BCAM bei Basaliom, beim malignen Melanom, beim Plattenepithelkarzinom sowie bei einigen benignen epithelialen Hauttumoren (Schon et al., 2000). In diesen Tumoren scheint die Interaktion zwischen Laminin und BCAM an der Tumorprogression beteiligt zu sein (Drewniok et al., 2004). Studien, die sich mit dem hepatozellulären Karzinom beschäftigten, konnten belegen, dass BCAM bei diesem Tumor sowohl auf den Zellen als auch in gelöster Form im Serum gehäuft auftritt, eventuell als Tumormarker fungieren könnte und mit der Tu-

morprogression assoziiert ist (Kikkawa et al., 2008, Kikkawa et al., 2014). Auch im Pankreaskarzinom wurde eine erhöhte BCAM-Expression festgestellt, wobei die Höhe der Expression nicht mit dem Alter, dem Geschlecht oder der Resektabilität des Tumors korreliert (Yu et al., 2009). Beim Schilddrüsenkarzinom scheint eine Herabregulation von BCAM mit größeren Tumoren und dem Vorhandensein von Metastasen assoziiert zu sein (Latini et al., 2013). Neuere Untersuchungen an Zelllinien in vitro von Chang et al. konnten zeigen, dass BCAM auch eine Rolle bei der Entwicklung des Harnblasenkarzinoms spielt. In Gegenwart seines Liganden Laminin hätte BCAM ein onkogenes Potential und würde somit zur Tumorprogression beitragen (Chang et al., 2017).

Es gibt auch Untersuchungen zu dem Vorkommen von BCAM in Ovarialkarzinomen. So konnte BCAM bereits im Jahre 1994 auf Zellen des epithelialen Ovarialkarzinoms nachgewiesen werden (Garinchesa et al., 1994). Weitere Experimente konnten belegen, dass BCAM im Ovarialkarzinom zum einen in polarisierter Form auf den Zellen auftritt und damit eher am basalen Pol der Zellen lokalisiert ist oder dass es sich diffus an der Zelloberfläche verteilt. Beide Verteilungsmuster können in einem Tumornest vorkommen. Die zentralen Anteile der Nester wiesen weniger BCAM auf. Die höchste BCAM-Expression weisen demnach seröse Karzinome auf, gefolgt von endometrioiden Karzinomen (Maatta et al., 2005). Bisher wurden keine Daten erhoben, die den Einfluss von BCAM auf die Prognose des Ovarialkarzinoms untersuchten.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Unter den gynäkologischen Tumoren besitzt das Ovarialkarzinom die höchste Mortalität. Es zeichnet sich durch eine frühzeitige peritoneale Metastasierung und eine hohe Rezidivrate aus. Auch nach ausgedehnten Operationen mit dem Ziel der restlosen Tumorentfernung und anschließender Chemotherapie bleibt die Prognose weiterhin unbefriedigend.

Für die Entwicklung neuer Therapieansätze und für die Möglichkeit einer besseren Einschätzung der Prognose ist es hilfreich, die Tumorbiologie der Zellen besser zu verstehen. Dazu soll diese Arbeit unter anderem beitragen.

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. rer. nat. Oliveira-Ferrer konnten herausfinden, dass c-Fos in Ovarialkarzinomen als Tumorsuppressor fungiert. Es nimmt unter anderem Einfluss auf die Regulation der Adhäsionsmoleküle ICAM1, ICAM2 und BCAM. Die Bedeutung dieser Moleküle für die Metastasierung und für die Prognose des Ovarialkarzinoms wurden in dieser Arbeit mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen und Western-Blot-Analysen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientinnenkollektiv

Die in dieser Arbeit untersuchten Tumorproben entstammen Patientinnen, die zwischen 1996 und 2014 am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf an Ovarialtumoren operiert wurden. Die Patientinnen erklärten sich schriftlich damit einverstanden, dass Gewebeproben für Forschungszwecke verwendet werden, sofern diese nicht in der Pathologie für diagnostische Zwecke benötigt wurden.

Das Gewebe wurde zügig nach der Operation in das Gynäkologische Forschungslabor überführt. Hier wurden die Tumorproben weiter verarbeitet und von überschüssigen Geweben befreit, wie beispielsweise Fettgewebe, das keine Tumoranteile enthält. Die für die Western-Blots bestimmten Gewebe wurden in Kryoröhrchen überführt und bis zur Weiterverarbeitung in der Stickstofftonne konserviert. Die Handhabung des für die Immunhistochemie verwendeten Gewebes wird in Abschnitt 3.2.1 näher erläutert.

Die wichtigen Informationen für das so entstandene Kollektiv wurden in einer Datenbank gesammelt und regelmäßig aktualisiert. Zu diesen Informationen zählen beispielsweise das Operationsdatum, das Datum der Erstdiagnose, der klinisch-pathologische Befund der Tumoren und das Operationsergebnis.

2.1.2 Material und Geräte für die Immunhistochemie

Tabelle 3: Verwendete Geräte in der Immunhistochemie

Geräte und Materialien	Bezugsquelle
Deckgläschen	Carl Roth
Hubkolbenpipetten	Eppendorf
Kamera DFC 320	Leica
Kühlschrank	Liebherr
Mikroskop Axioskop 40	Zeiss
Mikrowelle MW800	Continent

Geräte und Materialien	Bezugsquelle
Multipipetten	Eppendorf
Objektträger Super Frost Plus	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, TipOne
Schlittenmikrotom	Leica
Trockenschrank TDO 60	Medite Medizintechnik
Wasserbad DG5552	AEG
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Greiner

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien in der Immunhistochemie

Substanz	Bezugsquelle/ Rezept
ABC-Kit Elite	Vector Laboratories
ABC-Kit Standard	Vector Laboratories
Antibody-Diluent	Dako
Aqua destillata	UKE-eigene Destillationsanlage
Citrat-Puffer (10 mM, pH 6)	2,9g tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 1000ml Aqua dest., pH-Einstellung mit NaCl
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories
Ethanol >99,8%	Sigma-Aldrich
Eukitt	Fluka
Fettstift	Dako Pen
H2O2 30%	Merck KgaA, Darmstadt
Hämatoxylin	Merck KgaA
Methanol	J. T. Baker
TBST-Waschpuffer	0,2M Tris-HCl + 1,37M NaCl; 1:10 in Aqua dest + 0,05% Tween 20; pH 7,6
Xylol	Sigma-Aldrich

Tabelle 5: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-BCAM (rabbit monoclonal)	LSBio (LifeSpan BioSciences, Inc), Best.-Nr. LS-C138475
Anti-ICAM1 15.2 (mouse monoclonal)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Best.-Nr. sc-107
Anti-ICAM2 (mouse monoclonal)	Sino Biological Inc., Best.-Nr. #10332-MM06
Anti-mouse IgG (biotinylated horse antibody)	Vector Laboratories, Best.-Nr. BA-2000
Anti-rabbit IgG (biotinylated goat antibody)	Vector Laboratories, Best.-Nr. BA-1000
Isotype Control IgG (mouse monoclonal)	Dako, Best.-Nr. X0931
Isotype Control IgG (rabbit monoclonal)	Dako, Best.-Nr. X0903

2.1.3 Material und Geräte für die BCA-Proteinbestimmung

Tabelle 6: Verwendete Geräte in der Proteinbestimmung

Geräte	Bezugsquelle
96-Well-Platte	life technologies
Photometer Sunrise Remoteq	Tecan
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Vortex Genie 2	Scientific Industries

Tabelle 7: Verwendete Geräte in der Proteinbestimmung

Substanzen	Bezugsquelle/ Rezept
Albumin Standard	Thermo Scientific
BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific
BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Scientific
RIPA	790mg Tris in 75 ml Aqua dest + 900mg NaCl, pH auf 7,4 einstellen mit HCl + 10ML NONIDET P40 +200µl 0,5 M EDTA, auf 100ml auffüllen

2.1.4 Material und Geräte für den Western-Blot

Tabelle 8: Verwendete Geräte für den Western-Blot

Geräte und Materialien	Bezugsquelle
Bechergläser	z.B. Schott Duran, VWR
Biofuge fresco	Heraeus Instruments (Kendro Laboratory Products)
Cryotome SME	Thermo Shandon
Einschweißgerät	Ciatronic
Electrophoresis Power Supply EPS-601	Amersham Pharmacia Biotech
Electrophoresis unit SE 600	Pharmacia Biotech
GS-800 Calibrated Densitometer	BioRad
Heizplatte Ikamag Reo	Ikawerke Janke & Künkel
Hoefer Standard Vertical Slab Unit SE600	Amersham Pharmacia Biotech
Hoefer Transphor Unit TE 42	Amersham Pharmacia Biotech
Homogenisator	Precellys
Hubkolbenpipetten	Eppendorf
Multipipetten	Eppendorf
Objektträger Super Frost Plus	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research (MS Laborgeräte, Heidelberg)
Pipettenspitzen	Eppendorf, TipOne
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenkassetten (18x24cm)	A. Hartenstein bzw. Philips
Rührplatte RO 5 power	Ikawerke Janke & Künkel
Schüttler WT16	Biometra
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage KB 600-2	Kern & Sohn

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien für den Western-Blot

Substanzen	Bezugsquelle
Acrylamide/Bis-Acrylamide 40%	MP (North America)
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
Aqua destillata	UKE-eigene Destillationsanlage
Blotting grade Blocker Nonfat dry Milk	BioRad
Blotting Paper	Machery-Nagel
Bromphenolblau	Merck KgaA
Chemiluminescent	Thermo Scientific
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KgaA
Ethanol	Sigma-Aldrich
Fuji Medical X-Ray-Film	Fuji
Glycerol	Merck KgaA
Glycin	Carl Roth
Hämatoxylin	Merck KgaA
Immobilon P PVDF-Membran	Millipore
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Methanol	J. T. Baker
Natriumchlorid	Carl Roth
Natronlauge	Merck KgaA
Saccharose	Serva
Salzsäure	Merck KgaA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka Biochemika
ß-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Tertramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Tissue-Tek	Sakura
Tricine	Carl Roth
Trizma-Base	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck KgaA

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für den Western-Blot

Antikörper	Bezugsquelle
BCAM	LSBio (LifeSpan BioSciences, Inc), Best.-Nr. LS-C138475
GAPDH (FL-335)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Best.-Nr. sc-25778
ICAM1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Best.-Nr. sc-8439
Sekundärantikörper goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Best.-Nr. sc-2055
Sekundärantikörper goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Best.-Nr. sc-2054

2.2 Methoden

2.2.1 Immunhistochemische Untersuchung

Gewebe für die Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Tumorproben verwendet. Die verwendeten Gewebe entstammen Patientinnen aus dem oben genannten Kollektiv. Die Tumore wurden von den Gynäkologen des UKE operativ entfernt und von den Mitarbeiterinnen des Labors unverzüglich in Formalin fixiert. In dem Formalin verweilten die Gewebeproben für ca. 12-20 Stunden bei Raumtemperatur und wurden dann mit PBS-Puffer gewaschen.

Anschließend wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Die Tumorblöcke wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Um sie zu schneiden und auf die Objektträger zu bringen wurden sie für einige Stunden bei -20°C gelagert.

Die Paraffinblöcke wurden dann tiefgekühlt in das Schlittenmikrotom eingespannt. Das Gerät wurde auf 4 µm eingestellt und die so hergestellten Schnitte zuerst in ein Gefäß mit entionisiertem, ca. 20°C warmem Wasser überführt, um sich zu entfalten. Anschließend wurden sie mit Hilfe der Objektträger in ein Wärmebad, das auf 45°C eingestellt war, transportiert. Durch die Wärme entfalten sich die noch in Paraffin gebetteten Schnitte und ziehen sich glatt. Dann konnten sie endgültig auf die Objektträger aufgezogen und zum Trocknen auf eine Heizplatte gelegt werden. Damit sich die Schnitte auch sicher mit dem Objektträger verbinden und in den nachfolgenden Versuchen nicht abschwimmen, wurden sie nach dem Schneiden über Nacht bei 50-60°C in den Wärmeschrank gestellt.

Immunhistochemische Färbung

Mit Hilfe der Immunhistochemie können Proteine durch markierte Antikörper sichtbar gemacht werden. Daraus lassen sich Rückschlüsse ziehen auf die Lokalisation eines Proteins.

Zunächst musste das in Paraffin eingebettete Tumormaterial entparaffiniert werden. Paraffin ist lipophil. Da die Antikörper jedoch in wässrigem Milieu vorliegen, müssen die Schnitte schrittweise an dieses gewöhnt werden. Hierfür wurden die Objektträger in einer Halterung für zweimal zehn Minuten in ein Xylol-Bad gestellt. Danach sollte

das Paraffin aus den Schnitten entfernt sein. Um sie an das wässrige Milieu zu gewöhnen, wurden die Schnitte für jeweils fünf Minuten in 99% und 96% Alkohol getaucht.

Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, mussten im nächsten Schritt die endogenen Peroxidasen blockiert werden. Dabei handelt es sich um körpereigene Enzyme, die sich vor allem in Hämoglobin, Myoglobin, Zytochrom und Katalase befinden, und die durch ihre Aktivität eine Färbung hervorrufen können. Zur Blockade eignet sich eine Lösung von 3,3 ml 30%igem H_2O_2 auf 200 ml Methanol. In dieser Lösung blieben die Objektträger für 30 Minuten stehen. Anschließend wurde die absteigende Alkoholreihe fortgesetzt, wobei nochmals für fünf Minuten in 96% Alkohol und für zweimal fünf Minuten in 80% Alkohol inkubiert wurde. Um den Alkohol aus dem Gewebe zu entfernen, wurden die Schnitte wieder für zweimal fünf Minuten in destilliertes Wasser getaucht.

Durch das vorangegangene Fixieren mit Formalin wird eine Quervernetzung unter den Molekülen eingegangen. Dadurch ist es notwendig, diese vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wieder zu lösen, damit letzterer an die entsprechenden Epitope der Proteine binden kann. Diesen Vorgang bezeichnet man als Antigen-Demaskierung. Hierfür wurden die Objektträger in eine mit Citrat-Puffer gefüllte, auf 90°C vorgeheizte Küvette gestellt und für 20 Minuten im Dampfgarer stehen gelassen. Um die Schnitte wieder abzukühlen, wurden sie je zweimal fünf Minuten in Leitungswasser und TBS gewaschen.

Nun folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Um Antikörper zu sparen, wurden die Schnitte ihrer Form entsprechend auf dem Objektträger mit einem Fettstift umkreist und danach in eine feuchte Kammer überführt. Die Primärantikörper wurden in Dako Antibody Diluent verdünnt. Von dieser Lösung wurden je 100 µl auf die Schnitte gegeben. Die Dauer der Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C plus eine zusätzliche Stunde bei Raumtemperatur am nächsten Morgen.

Nach der Inkubation wurde der Primärantikörper abgeschüttet und die Schnitte dreimal fünf Minuten mit TBS gewaschen.

Als nächstes wurde der biotinylierte Sekundärantikörper, 1:200 verdünnt in TBS, für eine Stunde auf die Schnitte aufgetragen. Während der Inkubationszeit wurde das ABC-Reagenz vorbereitet. Es wurden je zwei Tropfen Reagenz A und Reagenz B auf

5 ml TBS gegeben. Diese Lösung soll für mindestens 30 Minuten stehen bleiben, bevor sie auf die Objektträger gegeben wird. Das Prinzip der ABC-Methode beruht darauf, dass ein mit Biotin markierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper bindet. An diesen biotinylierten Sekundärantikörper kann der enzymmarkierte (Strept)Avidin-Biotin-Komplex (ABC) binden, da Avidin eine sehr hohe Affinität zu Biotin hat. Bei Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin, welches sich gut an verschiedene Strukturen wie Antikörper koppeln lässt, ohne deren chemische Eigenschaften zu verändern. Avidin ist ein Glycoprotein und wird aus Hühnereiweiß gewonnen. Es besitzt vier Polypeptid-Untereinheiten und seine Tertiärstruktur ermöglicht eine spezifische Bindungsstelle für vier Moleküle Biotin. Der Komplex ist so aufgebaut, dass an das Avidin bereits drei Moleküle Biotin gekoppelt sind. Die vierte Bindungsstelle bleibt frei für das Biotin des Sekundärantikörpers (Noll and Schaub-Kuhnen, 2000).

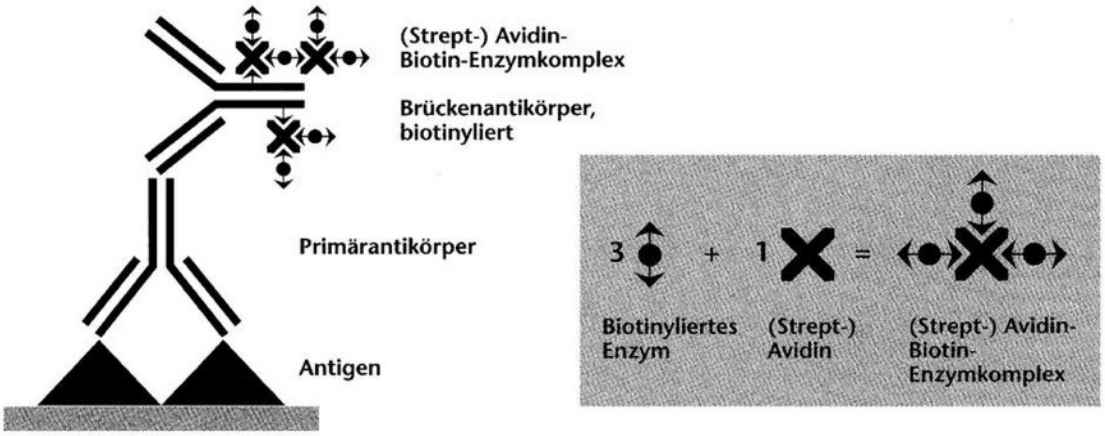

Abb. 7: Prinzip der ABC-Methode (Noll and Schaub-Kuhnen, 2000)

Nach der Inkubationszeit von 60 Minuten wurde der überschüssige Sekundärantikörper abgeschüttet und die Reste durch dreimaliges Waschen mit TBS für jeweils fünf Minuten herausgespült.

Dann wurde der ABC-Komplex auf die Schnitte aufgetragen und für 30 Minuten dort belassen. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit TBS gewaschen. Die Detektion der Antigene erfolgte mit Hilfe von DAB (3,3-Diamino-Peroxidase-Substrat). Hierfür wurden zwei Tropfen Puffer Stock Solution und vier Tropfen DAB Solution mit 5 ml destilliertem Wasser vermengt. Zum Start der Reaktion wurden weitere zwei

Tropfen Hydrogen Peroxide Solution hinzugefügt und die Lösung auf die Schnitte verteilt, wodurch ein brauner Farbkomplex entsteht. Die Schnitte wurden beobachtet, um eine Überfärbung zu vermeiden. Bei gewünschter Intensität der Färbung wurde die DAB-Lösung abgegossen und für fünf Minuten in Leitungswasser gewaschen.

Danach wurden die Schnitte für ca. zehn Sekunden in saurem Hämalaun nach Mayer getaucht, anschließend kurz in HCl-Ethanol getaucht um dann für fünf Minuten unter fließendem Wasser gebläut zu werden. Hämalaun ist ein basischer Farbstoff in saurer Lösung, deren pH-Wert zwischen vier und fünf liegt. Er färbt die Kerne der Zellen blau an, da nur diese im sauren Milieu negative Ladungen besitzen, an die sich die basischen Farbstoffe anlagern.

Nach dem Färben wurden die Schnitte mit Hilfe der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und zwar für je fünf Minuten in 80%, 96% und 99% Alkohol und für zweimal zehn Minuten in Xylol. Nun konnten die Objektträger mit dem Kunstharzlack Eukitt überzogen und mit Deckgläsern eingedeckt werden. Die Schnitte trockneten über Nacht unter dem Abzug und konnten am nächsten Tag mikroskopiert werden.

Kontrollen

Um sicherzugehen, dass die Färbung spezifisch ist, wurden in den Durchgängen Negativkontrollen und Isotypkontrollen durchgeführt. Für die Negativkontrollen wurde TBS auf die Schnitte gegeben anstelle des Primärantikörpers. Wenn unter dem Mikroskop keine Färbung sichtbar war, konnte davon ausgegangen werden, dass die Reaktion spezifisch ist. Für die Isotypkontrolle wurde der Isotyp-Antikörper, der der gleichen Spezies entspricht wie der Primärantikörper, in der gleichen Verdünnung wie dieser aufgetragen und ebenfalls über Nacht inkubiert. Auch in diesem Fall war von einer spezifischen Reaktion des Primärantikörpers auszugehen, wenn der Schnitt keine Färbungen aufwies.

Als Positivkontrolle wurde in jedem Färbedurchgang ein Schnitt mitgeführt, der eine eindeutige Färbung aufweist. Dieser diente in allen Durchgängen als Vergleich und stellte sicher, dass der Antikörper funktionierte.

Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der Färbung erfolgte anhand des Immunreaktiven Scores (IRS), bei dem zwei Untersucher unabhängig voneinander die Schnitte unter dem Mikroskop betrachteten und die Intensität und die Quantität der Färbung beurteilten. Für die Intensität wurden Werte von 0-3 vergeben:

0 = keine Farbreaktion
1 = schwache Farbreaktion
2 = mäßige Farbreaktion
3 = starke Farbreaktion

Um die Quantität der positiven Tumorzellen beurteilen zu können, wurde die Anzahl gefärbter Zellen in Prozent ermittelt. In diesem Fall wurden fünf Werte von 0-4 vergeben:

0 = keine Zellen
1 = weniger als 10% der Zellen
2 = zwischen 10 und 50% der Zellen
3 = zwischen 51 und 80% der Zellen
4 = mehr als 80% der Zellen

Die ermittelten Werte für den jeweiligen Tumor wurden multipliziert. So ergaben sich die Werte für den IRS, die folgendermaßen interpretiert wurden:

0-2 = negativ
3-5 = schwach positiv
6-8 = mäßig positiv
9-12 = stark positiv

Nun ließen sich die Werte statistisch auswerten.

2.2.2 Western-Blot-Analyse

Herstellung von Tumorlysaten

Der erste Schritt für den Western-Blot bestand darin, aus vorhandenen Gewebeproben Proteinlysate herzustellen. Hierfür wurden zunächst Kryoschnitte angefertigt, um sicherzugehen, dass das asservierte Gewebe tatsächlich Tumorzellen enthält.

Das Gewebe wird bei einer Temperatur von ca. -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Damit es nicht degradiert, sollte es stets gekühlt gelagert werden. Um die Kryoschnitte anzufertigen, wurden die Gewebeproben dem Stickstoff entnommen und auf Trockeneis lagernd transportiert. Es wurden kleine Stücke von jeder Probe entnommen und mit Hilfe von Tissue Glue auf einem Metallstempel befestigt. Die Stempel wurden im Kryotom eingespannt. Dann konnten von dem tiefgekühlten Gewebe Schnitte angefertigt und auf die Objektträger aufgebracht werden. Dieses Verfahren wurde für jeden Tumor durchgeführt, von dem ein Lysat hergestellt werden sollte.

Zur Beurteilung der Schnitte wurden diese mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Durch Hämatoxylin wurden die Zellkerne durch oben beschriebenen Mechanismus blau angefärbt. Eosin als saurer Farbstoff färbt insbesondere basische Strukturen, wie Plasmaproteine, Mitochondrien und Kollagen, rosa.

Nach der Färbung konnten die Schnitte unter dem Mikroskop begutachtet werden. Für jeden einzelnen wurde dokumentiert, in welchem Bereich Tumorzellen enthalten waren, um diesen für die Lysatherstellung herauszuschneiden. Gewebeschnitte, die unter dem Mikroskop keine oder nicht ausreichend Tumorzellen enthielten, wurden aus dem Kollektiv gestrichen.

Für die eigentliche Herstellung der Lysate wurden aus dem Gewebestück Portionen von 40-70 mg herausgeschnitten und in ein kleines Gefäß überführt, das zusätzlich Porzellankügelchen enthielt. Diesem Gefäß wurde 1 ml des Lysepuffers RIPA hinzugefügt. Anschließend wurden die Gefäße zum Homogenisieren für zweimal 20 Sekunden in den Homogenisator überführt. Um das eigentliche Tumorlysat von unerwünschtem Fett und den Porzellankügelchen zu trennen, wurden die Proben für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das unter der Fettschicht entstandene Lysat abpipettiert und in Reaktionsgefäße überführt, in denen die Proben bei -80°C kryokonserviert werden.

Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmenge in den hergestellten Lysaten erfolgte mithilfe der Bicinchoninsäure-Assay-Methode (BCA-Assay). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die Proteine im alkalischen Milieu die Cu^{2+}-Ionen zu Cu^{+}-Ionen reduzieren. Die Cu^{+}-Ionen bilden mit der Bicinchoninsäure einen Farbkomplex, dessen Extinktion im Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt werden kann. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zu dem Proteingehalt der zu messenden Probe. Auf diese Weise lässt sich die Menge der Proteine bestimmen.

Für die Kalibrierung des Photometers wurde zunächst eine Eichkurve erstellt mit einem Proteinstandard aus Rinderserumalbumin (BSA), dessen Proteingehalt bereits bekannt war. Hierfür wurden sieben 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße von A-G beschriftet. Aus der BSA Stammlösung wurden 500 µl in Gefäß A und 375 µl in Gefäß B pipettiert. Ein weiteres Eppendorf-Gefäß wurde für die Leerprobe vorbereitet. Das Pipettierschema sieht wie folgt aus:

Tabelle 11: Pipettierschema der Proteinbestimmung

Eppendorf -Gefäß	BSA-Konzentration in	BSA Zugabe in µl	RIPA-Zugabe in µl	TRIS/HCl Zugabe in µl
A	1000	500 aus Stammlösung	200	300
B	750	375 aus Stammlösung	200	425
C	500	500 aus A	100	400
D	250	500 aus C	100	400
E	125	500 aus D	100	400
F	62,5	500 aus E	100	400
G	31,25	500 aus F	100	400
blank	-	-	20	80

Die Tumorlysate wurden bei -20°C verwahrt und mussten langsam auf Eis lagernd aufgetaut werden. Von den aufgetauten Proben wurden jeweils 25 µl in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit 100 µl Tris/HCl (50 mM) versetzt. Auf dem Vortexer wurde beides gut vermischt.

Anschließend wurden der Standard und die vorbereiteten Tumorproben in eine 96-Well-Platte pipettiert.

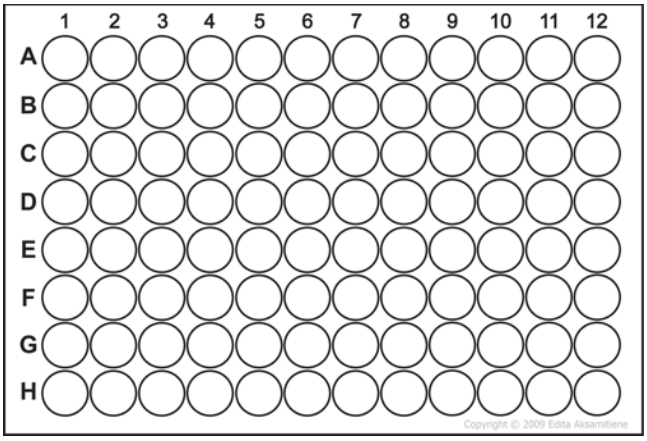

Abb. 8: 96-Well-Platte (Aksamitiene, 2009)

Alle Bestimmungen erfolgten im Doppelansatz. Die Werte sollten nicht zu stark voneinander abweichen, ansonsten wurde die Bestimmung wiederholt. In Spalte 1 und 2 in die Zeilen A-G wurden jeweils 25 µl des Standards pipettiert, H war dem Leerwert vorbehalten. In die Spalten 3-12 wurden 25 µl der Tumorproben pipettiert, auch hier jeweils im Doppelansatz. Den Wells mussten noch jeweils 200 µl der BCA-Arbeitslösung hinzugefügt werden, die aus den Lösungen A und B des BCA-Kits von Thermo Scientific hergestellt wurde. Hierfür wurden Arbeitslösung A und Arbeitslösung B in einem Verhältnis von 50:1 vermengt. Im Anschluss daran erfolgte ein violetter Farbumschlag der Flüssigkeiten in den Wells.

Die Platte wurde bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Nach 60 Minuten erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei 562 nm im Photometer. Aus den Extinktionswerten der Standards konnte die Eichkurve ermittelt und anschließend die Proteinkonzentration der Tumorproben berechnet werden.

Western Blotting

Das eigentliche Western-Blot-Verfahren erfolgte in drei größeren Arbeitsschritten. Zunächst wurden die Proteine aus den Lysaten durch die Gelelektrophorese ihrer

Größe nach aufgetrennt. Die Proteine wurden durch das Blotten von dem Gel auf eine Membran transferiert. Anschließend wurde bei der Detektion die Membran spezifischen Antikörpern ausgesetzt, wodurch die Proteine sichtbar gemacht wurden. Im Folgenden werden die einzelnen Versuchsschritte näher erläutert.

Herstellung der Gele

Für die Elektrophorese mussten zuerst die beiden Kammern zusammengebaut werden, in die das Gel gegossen wurde. Sie bestehen aus je zwei Glasscheiben, die durch Klammern zusammengehalten werden und auf einem Fußteil stehen. In die Kammern wurden übereinander zwei Arten von Gel geschichtet, und zwar zum einen das Trenngel unten, das der Auftrennung der Proteine diente und zum anderen das Sammelgel, in dem die Proteinlysate konzentriert wurden. Trenn- und Sammelgel konnten gleichzeitig angesetzt werden. Bei dem hier verwendeten Verfahren handelt es sich um SDS-PAGE nach Laemmli (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide-Gel-Elektrophoresis). Es beruht auf der Erkenntnis, dass die Eigenladung der Proteine durch Zugabe des anionischen Tensids SDS überdeckt wird. SDS bindet an die Proteine, wodurch diese eine negative Ladungsverteilung aufweisen. Während der Elektrophorese stoßen sich die negativen SDS-Moleküle im Gel und die negativ geladenen Proteine ab, wodurch es zu einer Auftrennung des Proteinlysats nach Molekülmasse kommt. Moleküle höheren Gewichts werden stärker zurückgehalten als Moleküle niedrigeren Gewichts.

Das im hier beschriebenen Western Blot verwendete Trenngel war 10%ig und diente der Auftrennung von Proteinen mit einer Molekülmasse zwischen 40-90 kDa. Es eignete sich daher am ehesten für die zu detektierenden Moleküle ICAM 1, BCAM und GAPDH, deren Molekülmasse zwischen 35-100 kDa liegt. Die Zusammensetzung war wie folgt:

8 g Glycerin
17 ml Aqua dest.
20 ml mit SDS versetztem Gelpuffer
15 ml AA/BAA

Die Substanzen wurden zusammenpipettiert und auf dem Magnetrührer vermischt. Die Polymerisation wurde bewirkt durch 300 µl APS (Ammoniumpersulfat) als Radikalstarter und 30 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin) als Katalysator der Reaktion. Das noch flüssige Gel wurde zügig und möglichst blasenfrei zwischen die Glasplatten eingefüllt. Auf das Trenngel wurde anschließend 1 ml Aqua dest. pipettiert, um eventuell vorhandene Blasen aufschwimmen zu lassen. Die Polymerisation dauerte mindestens 45 Minuten, danach konnte das Wasser abgegossen und die Kämme für das Sammelgel eingesetzt werden. Das Sammelgel bestand aus:

11,9 ml Aqua dest.
4,7 ml mit SDS versetztem Gelpuffer
2,3 ml AA/BAA
225 µl APS
25 µl TEMED

Die Polymerisation dauerte hier 30 Minuten, danach konnten die Kämme gezogen und die Taschen mit Aqua dest. ausgespült werden, um Gelreste zu entfernen. Im Anschluss konnte die Kathodenkammer aufgesetzt werden. Sie wurde mit Kathodenpuffer gefüllt, der dann die Sammeltaschen ausfüllte.

Probenvorbereitung

Im nächsten Schritt mussten die zuvor vorbereiteten Tumorproben in die Taschen pipettiert werden. Für die Vorbereitung war zunächst ein Pipettierschema nötig, das genau festlegte, welche Probe in welche der 20 Taschen gehörte. Die erste und die letzte Tasche waren jeweils eine Leertasche, das heißt, dass sie nur mit Puffer aufgefüllt wurden und kein Tumorlysat enthielten. Die zweite enthielt einen Marker. Die dritte und die vierte Tasche waren den Kontrollen vorbehalten, die in jedem Western-Blot mit aufgetragen wurden. Folglich waren pro Gel 15 Taschen für die eigentlichen Lysate frei.

Die Tumorlysate lagerten bei -80°C und mussten zum Pipettieren auf Eis liegend aufgetaut werden. In der Proteinbestimmung wurde ermittelt, wie viel Mikroliter des Lysats notwendig sind, um auf ein Proteingewicht von 20 µg zu kommen. Da alle Ta-

schen das gleiche Volumen benötigten, wurde das Restvolumen zu 30 µl mit einem Lysepuffer aufgefüllt. Anschließend konnten die Tumorlysate nach kurzem Aufmischen hinzupipettiert werden. Der Pcsb2-Puffer wurde im Verhältnis von 1:1 hinzugefügt und damit das Endvolumen von 60 µl erreicht. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Proben im Thermozykler bei 95°C für fünf Minuten denaturiert und konnten nach erneutem Zentrifugieren in die Taschen des Sammelgels pipettiert werden.

Die Elektrophorese-Kammer war mit 4,5 Litern Anodenpuffer gefüllt. Die Gelkammern mit der Kathodenkammer konnten nun in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt werden. Es wurde eine Spannung von 56 V eingestellt. Dieses Programm lief im Schnitt für 18 Stunden über Nacht.

Blotten der Proteine

Die nun durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteine mussten aus dem Gel auf eine Membran übertragen werden. Die Membran ist in der Lage, die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen irreversibel zu fixieren.

Um die Membran zu aktivieren, wurde sie zuerst in Methanol, dann in Aqua dest. und anschließend in Transferpuffer getränkt, bevor sie auf das Gel gelegt wurde. Damit die Membran auf dem Gel nicht verrutschte, wurde eine Kassette vorbereitet, die mit ebenfalls in Transferpuffer getränkten Schwämmen ausgelegt war. Auf und unter Gel und Membran lagen noch jeweils drei Bögen Whatman-Papier. Die Kassette wurde verschlossen und senkrecht in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer gestellt. Dabei war es wichtig darauf zu achten, dass die Membran in Richtung der Anode der Kammer zeigte, da ansonsten in das Whatman-Papier geblottet worden wäre und nicht auf die Membran. Mit dem zweiten Gel wurde ebenso verfahren. Bei einer Stromstärke von 400 mA wurde für 4,5 Stunden geblottet.

Im Anschluss wurden die Kassetten der Kammer entnommen und die Membran vorsichtig von dem Gel abgehoben. Der Marker diente in diesem Fall als Kontrolle, ob auch tatsächlich auf die Membran geblottet wurde. Die Membran wurde erneut in Methanol geschwenkt und danach zum Trocknen für 20 Minuten liegen gelassen. Anschließend konnte die Membran entweder eingefroren werden oder es konnte mit dem Blocken für die Detektion begonnen werden.

Blocken und Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper

Die getrockneten Membranen wurden auf Höhe der 50 kDa Bande zerschnitten. Auf dem oberen Abschnitt waren die eigentlichen Proteine ICAM1 und BCAM zu finden, auf dem unteren das Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), ein Enzym der Glykolyse. Von diesen Genen wird angenommen, dass sie in allen Zellen in der gleichen Menge exprimiert werden. Sie dienen daher als zusätzliche Kontrolle, ob von allen Lysaten in etwa die gleiche Menge an Proteinen aufgetragen wurde.

Die Membranstücke wurden erneut in Methanol und Aqua dest. geschwenkt und anschließend mit einer Lösung von Milchpulver als Blockingreagenz überschichtet. Die Membranen wurden für mindestens eine Stunde in der Blockingreagenz auf dem Schüttler belassen. Durch das Milchpulver wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran blockiert, die für starke Hintergrundsignale verantwortlich waren. Nach dem Abgießen des Blockreagenzes wurde die Membran für eine Stunde oder aber auch über Nacht im Kühlraum mit dem Primärantikörper inkubiert. Dieser wurde in 1,5% Milchpulverlösung verdünnt, das optimale Verdünnungsverhältnis wurde im Vorfeld bestimmt. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBST gewaschen, um eventuelle Rückstände von der Membran zu entfernen. Nun konnte der Sekundärantikörper auf die Membran gegeben werden, ebenfalls in 1,5% Milchpulverlösung verdünnt, in einem Verhältnis von 1:8000. Die Spezifität des Sekundärantikörpers richtete sich nach der Spezies, in der der Primärantikörper produziert wurde, in diesem Fall Kaninchen und Ziege, wobei der Sekundärantikörper an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet. Dieser Antikörper hatte eine Inkubationszeit von einer Stunde. Nach dieser Zeit wurde die Membran ebenfalls mit TBST gewaschen und zwar für viermal zehn Minuten.

Detektion

Für die eigentliche Detektion, mit der die Proteinbanden sichtbar gemacht wurden, wurde die Membran für fünf Minuten mit 15 ml des chemilumineszierenden SuperSignal®-Substrat versetzt. Dieses ist zusammengesetzt aus einer Luminol- und einer Peroxidlösung im Verhältnis 1:1. Durch die an den Sekundärantikörper gebundene Horseradish-Peroxidase (HRP) wurde das Luminol oxidiert. Das Reaktionsprodukt

sendete Lichtstrahlen mit einer Wellenlänge von 430 nm aus. Dadurch wurde ein in der Dunkelkammer aufgelegter Röntgenfilm in dem Bereich geschwärzt, in dem sich die zu detektierenden Proteine befanden. Hierfür wurde die Membran luftblasenfrei in eine matte Klarsichthülle gelegt, die in einer Röntgenkassette befestigt war. In der Dunkelkammer konnten die Röntgenfilme aufgelegt werden, wobei die Belichtungszeit bei den verschiedenen Antikörpern zwischen fünf Sekunden und 20 Minuten schwankte. Im Anschluss wurde der belichtete Film in eine Entwicklermaschine gelegt, wodurch die Schwärzung sichtbar wurde.

Um die Membranen nach dem Gebrauch zu verwahren, wurden sie in Klarsichtfolie eingeschweißt und bei -20°C eingefroren.

Re-Blot-Verfahren

Nach der Detektion können die Membranen erneut verwendet und auf andere Proteine untersucht werden. Das Verfahren nennt sich Re-Blot, was in diesem Fall für das Protein BCAM verwendet wurde. Hierfür wurden die eingefrorenen Membranen für fünf Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut, der Folie entnommen und für fünf Minuten mit entionisiertem Wasser gespült. Um die alten Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde sie für 25 Minuten auf dem Taumelschüttler mit einer speziellen Re-Blot-Solution (in diesem Fall Re-Blot Plus Mild Solution von Millipore), die 1:10 mit Aqua dest. verdünnt wurde, gewaschen. Im Anschluss wurden die freien unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit einer Blocking-Reagenz blockiert. Auch der Primärantikörper BCAM wurde dementsprechend in einem Verhältnis von 1:5000 in der 10%-Blocking-Reagenz verdünnt. Die weitere Detektion erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema.

Densitometrische Auswertung

Die durch die Detektion erhaltenen Filme mussten im Anschluss densitometrisch ausgewertet werden, um Zahlenwerte zu erhalten, die sich statistisch auswerten ließen. Zunächst mussten von jedem Western-Blot und zu jedem Antikörper all die Filme ausgewählt werden, bei denen die Kontrollen ein in etwa ähnlich starkes Signal zeigten. Dann wurden die Filme mit Hilfe eines Densitometers eingescannt und die Dichte der Schwärze bestimmt. Das Programm errechnete Zahlenwerte für jede

Schwärzung. Die Werte konnten jedoch nicht direkt miteinander verglichen werden, da davon auszugehen ist, dass in jedem Western-Blot und der nachfolgenden Detektion andere Bedingungen vorlagen. Aus diesem Grund wurde der Kontrolle ein Wert von 100 zugeschrieben, mit dem alle anderen Werte abgeglichen wurden. Nun ließen sich die Werte aller Western-Blots zueinander ins Verhältnis setzen und statistische Berechnungen erheben.

3. Ergebnisse

Diese Arbeit setzt sich zusammen aus zwei experimentellen Teilen. Zunächst wurden einige Tumorproben immunhistochemisch untersucht, um die Verteilung der Proteine BCAM, ICAM1 und ICAM2 zu analysieren. Anschließend wurden die Proteinexpressionen des gesamten Kollektivs mittels Western-Blot ermittelt.

3.1 Das Patientinnenkollektiv

Das Gesamtkollektiv besteht aus 250 Ovarialkarzinomen. Die klinisch-pathologischen Parameter sehen wie folgt aus:

Tabelle 12: Klinisch-pathologische Parameter des Gesamtkollektivs

Malignität	
Primäres Karzinom	217
Rezidiv	14
Borderline-Tumor	15
Zystadenome	4
Alter in Jahren	
Mittelwert	60
Median	62
Altersspanne	21-90
FIGO-Stadium	
I	9
II	8
III	156
IV	46
fehlend	31
Grading	
1	12
2	57
3	155
fehlend	26
Metastasenstatus	
positiv	49
negativ	149
fehlend	52
Metastasenort	
Leber	14
Lunge	2
Pleurakarzinose	13
Skelett	1
Thorax	1
retroperitoneale Lymphknoten	1
Sonstige	5
fehlend	12

Lymphknotenstatus	
positiv	58
negativ	132
fehlend	60
Histologie	
serös-papillar	194
muzinös	4
endometrioid	10
gemischt	6
undifferenziert	5
klarzellig	4
fehlend	27
OP-Ergebnis	
tumorfrei	147
Tumorrest < 1cm	39
Tumorrest > 1cm	27
fehlend	37
Rezidivfreies Intervall	
Mittelwert	24,4
Median	16
Bereich	0-176
fehlend	27
Gesamtüberleben in Monaten	
Mittelwert	33,4
Median	22
Bereich	0-176
fehlend	21
Verstorben	
ja	140
nein	90

Das Gesamtkollektiv wurde hinsichtlich der bekannten Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben untersucht. Für die Gruppe der Borderline-Tumoren und die der Zystadenome lagen keine Follow-Up-Daten vor, sodass diese in die Berechnungen nicht integriert sind. Die mittels Log-Rank-Test ermittelten Werte zeigten signifikante Korrelationen zwischen dem Gesamtüberleben beziehungsweise dem rezidivfreien Intervall und dem FIGO-Stadium, dem Nodalstatus, dem Metastasenstatus, der Histologie und dem OP-Ergebnis. Lediglich die Analyse des Gradings zeigte keine signifikanten Korrelationen. In der nachfolgenden Tabelle 13 sind die p-Werte sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das rezidivfreie Intervall dargestellt.

Tabelle 13: Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben bzw. dem rezidivfreien Intervall und den Prognosefaktoren

Prognosefaktor	**Log-Rank Gesamt-überleben**	**Log-Rank Rezidivfreies Überleben**
FIGO-Stadium gruppiert (FIGO I+II/ FIGO III/ FIGO IV)	< 0,001	< 0,001
FIGO-Stadium	< 0,001	< 0,001
Nodalstatus	< 0,001	< 0,001
Metastasenstatus	< 0,001	< 0,001
Histologie	< 0,001	< 0,001
OP-Ergebnis	< 0,001	< 0,001
Tumortyp	0,033	-
Alter bei Erstdiagnose	0,104	0,752
Grading	0,609	0,219

In den Abbildungen 9-20 sind die Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Intervalls in Abhängigkeit von den jeweiligen Prognosefaktoren nebeneinander dargestellt.

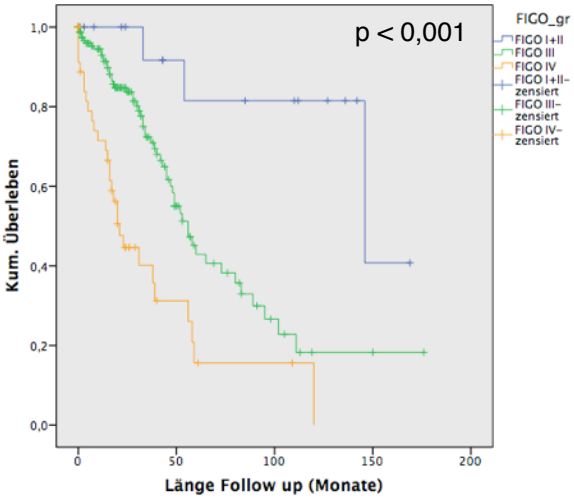

Abb. 9: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem gruppierten FIGO-Stadium (FIGO I+II/ FIGO III/ FIGO IV)

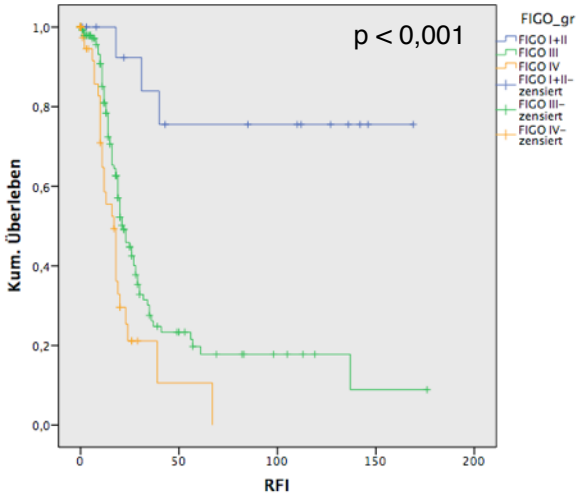

Abb. 10: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem gruppierten FIGO-Stadium (FIGO I+II/ FIGO III/ FIGO IV)

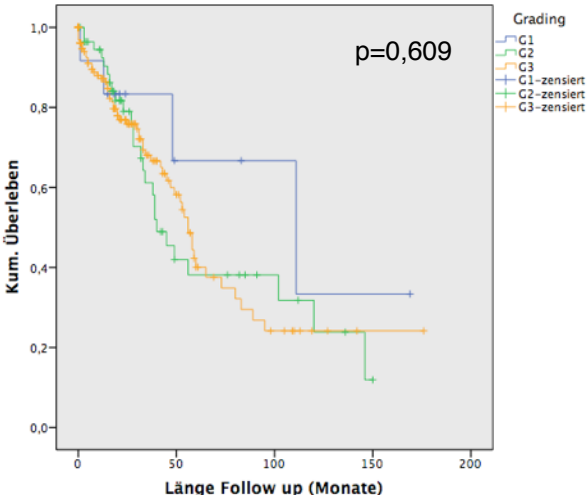

Abb. 11: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem Grading

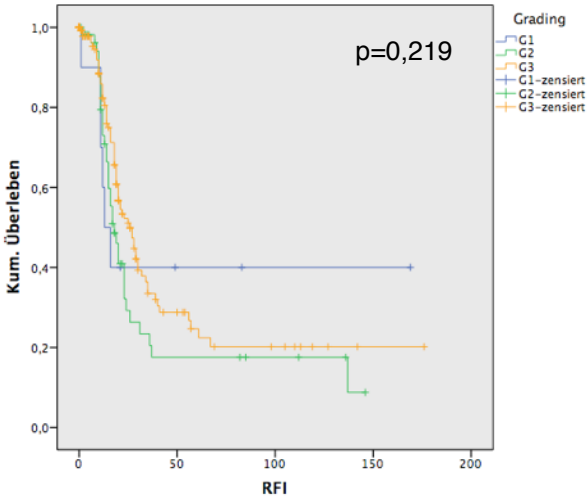

Abb. 12: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem Grading

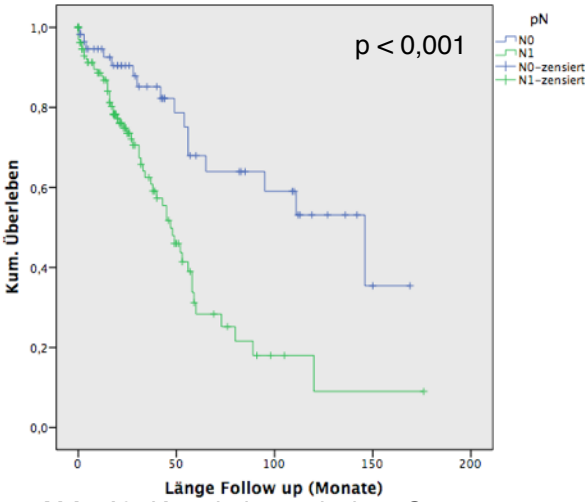

Abb. 13: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem Nodalstatus

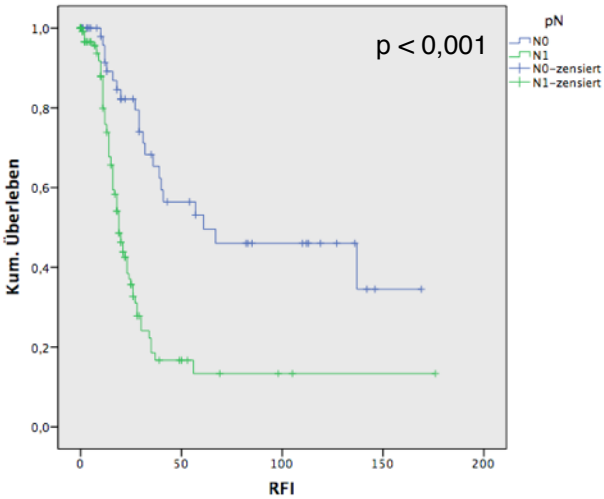

Abb. 14: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem Nodalstatus

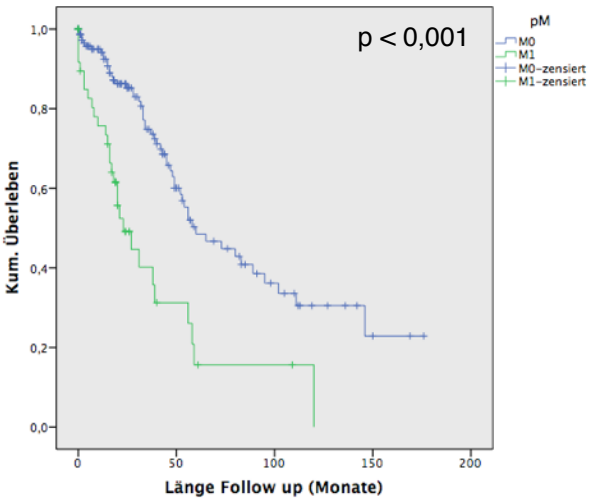

Abb. 15: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem Metastasenstatus

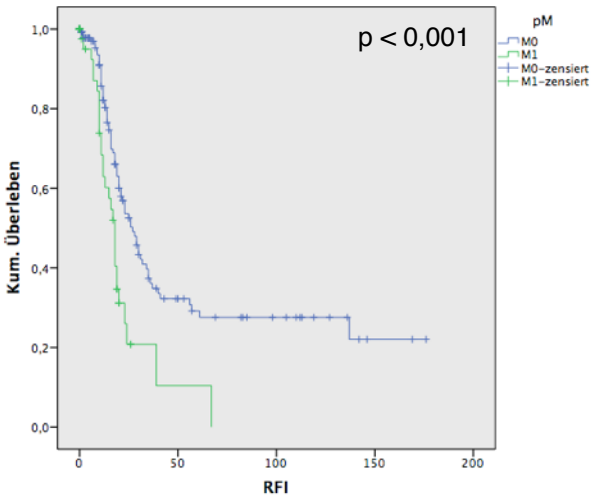

Abb. 16: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem Metastasenstatus

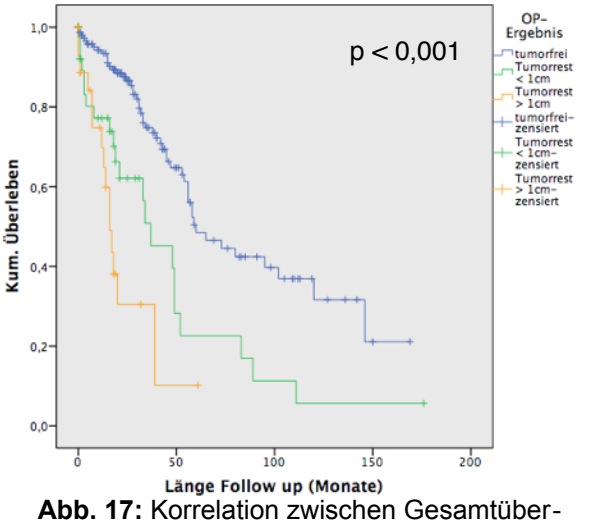

Abb. 17: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem OP-Ergebnis

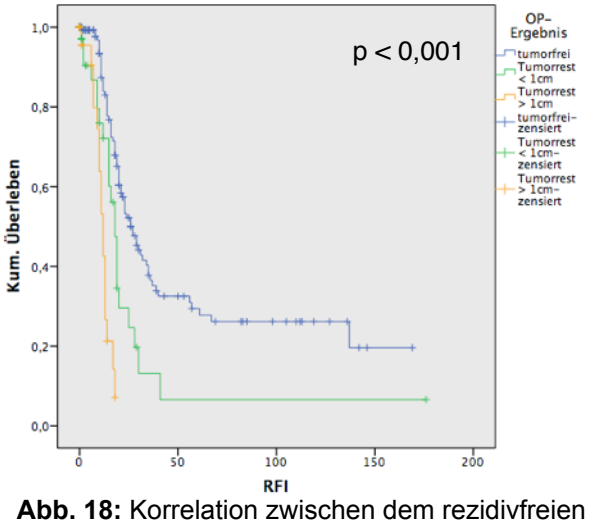

Abb. 18: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem OP-Ergebnis

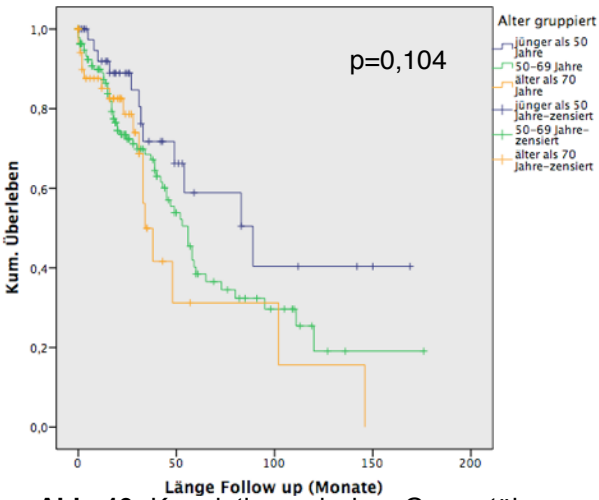

Abb. 19: Korrelation zwischen Gesamtüberleben und dem Alter bei der Erstdiagnose

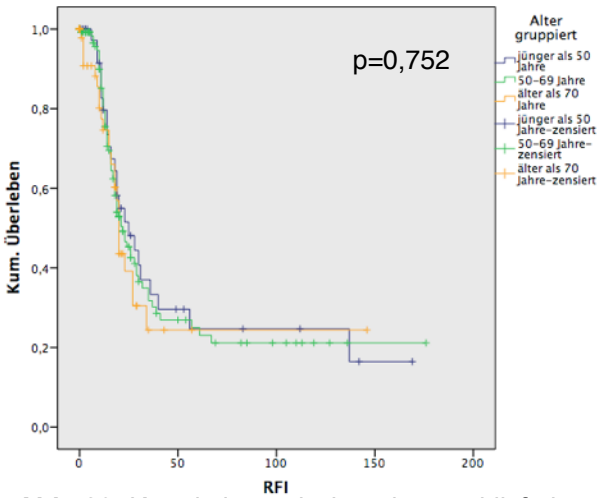

Abb. 20: Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und dem Alter bei der Erstdiagnose

3.2 Immunhistochemische Analyse

Für die immunhistochemische Analyse wurden 37 in Paraffin eingebettete Tumorproben untersucht. Die Expression der Proteine BCAM, ICAM1 und ICAM2 wurde anschließend mikroskopisch analysiert.

Die Beobachtungen für ICAM2 entsprachen nicht den Erwartungen. Das Protein zeigte nicht wie vermutet eine Expression auf der Zellmembran, sondern hauptsächlich im Zytoplasma, in den Zellkernen und auch auf nicht tumorös entarteten Zellen, wie beispielsweise Bindegewebszellen. Aus diesem Grund wurden die immunhistochemischen Beobachtungen nicht ausgewertet. Es wurde auch keine Western-Blot-Analyse durchgeführt, da die tatsächliche Proteinmenge aus den Tumorproben nicht ausschließlich den Tumorzellen zugeordnet werden kann.

Die Untersuchungen für ICAM1 und BCAM zeigten die erwarteten Verteilungen der Adhäsionsmolküle im Zellverband. Die quantitative Auswertung für BCAM und ICAM1 erfolgte anhand des IRS-Scores.

3.2.1 ICAM1

Nach der Auswertung mit Hilfe des IRS-Scores ergab sich folgende Verteilung:

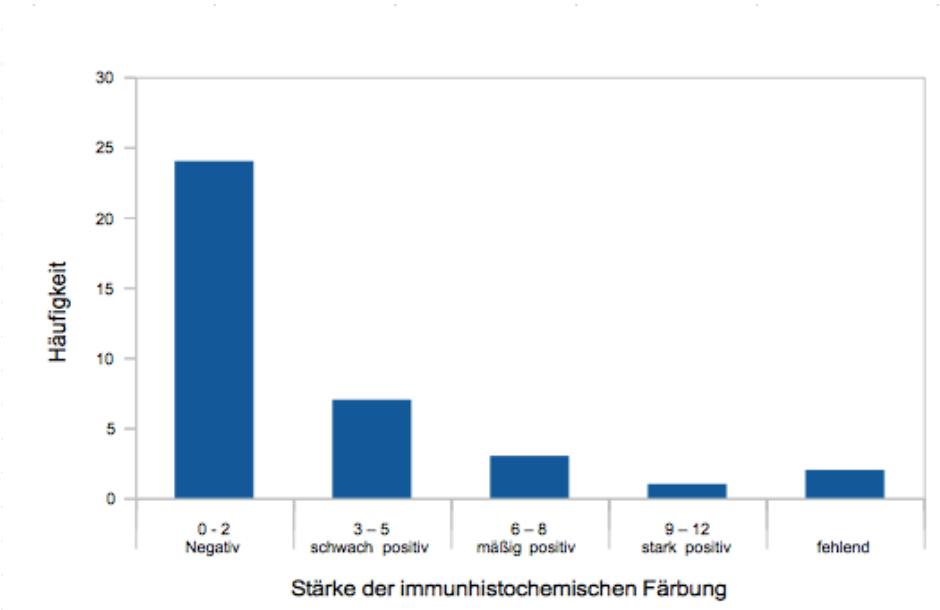

Abb. 21: Verteilung der Stärke der immunhistochemischen Färbung von ICAM1

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Stärke von ICAM1 (Abb. 21) stellte sich heraus, dass ein Großteil der Tumoren, und zwar 24, keine ICAM1 Expression aufwies. Bei sieben Tumoren zeigte sich eine schwach positive ICAM1 Expression, bei dreien eine mäßig positive und lediglich ein Tumor wies eine stark positive Expression auf. Bei zwei Schnitten war keine Beurteilung möglich, da das Material nicht auswertbar war.

Auf der folgenden Abbildung 22 sind exemplarisch mikroskopische Bilder der Tumoren mit den vier verschiedenen Färbungsstufen nach dem IRS-Score dargestellt.

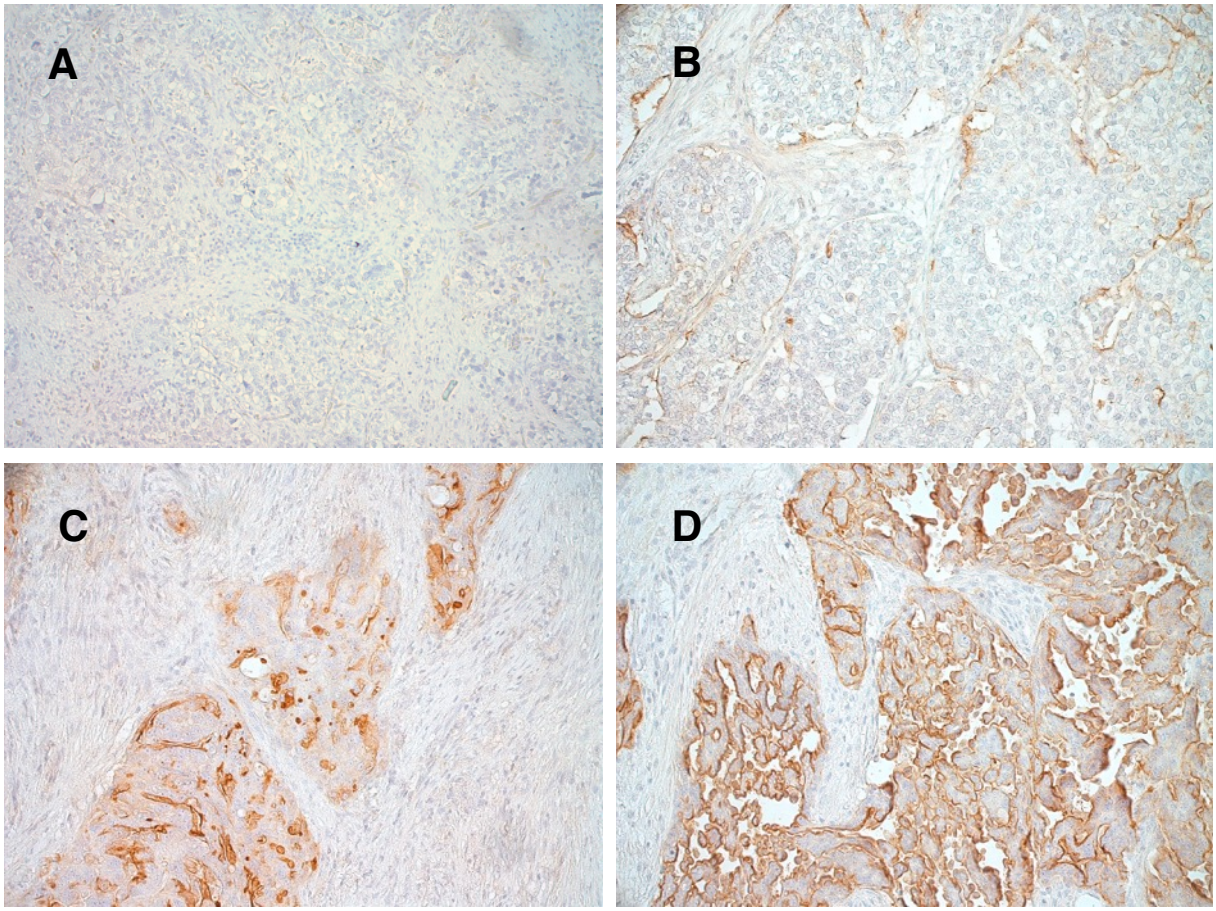

Abb. 22: Stärke der immunhistochemischen Färbung von ICAM1

A) Seröses Ovarialkarzinom, 200-fache Vergrößerung, G3, negativ

B) Seröses Ovarialkarzinom, 200-fache Vergrößerung, G2, schwach positiv

C) Seröses Ovarialkarzinom, 200-fache Vergrößerung, G3, mäßig positiv

D) Seröses Ovarialkarzinom, 200-fache Vergrößerung, G3, stark positiv

Bild A entspricht einem Tumor mit negativer ICAM1 Expression. Sowohl die Intensität als auch die Anteile an positiv gefärbten Zellen sind sehr gering. Bild B stellt einen gering positiven Tumor dar. Die Intensität der Färbung ist gegenüber Bild A leicht erhöht und es zeigen sich auch mehr ICAM1-positive Tumorzellen. Die Intensität der Färbung auf Bild C ist deutlich erhöht gegenüber Bild B. Dieser Tumor wurde als mäßig positiv eingestuft. Bild D stellt einen stark positiven Tumor dar, sowohl die Intensität als auch die Menge an gefärbten Zellen wurden mit der höchsten Punktzahl bewertet.

Bei genauerer Betrachtung der Verteilung von ICAM1 ließen sich folgende Bilder unter dem Mikroskop beobachten:

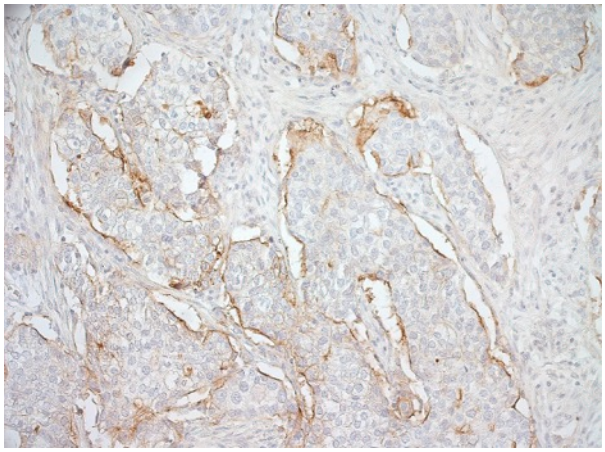

Abb. 23: Ovarialkarzinom in 200-facher Vergrößerung, G2

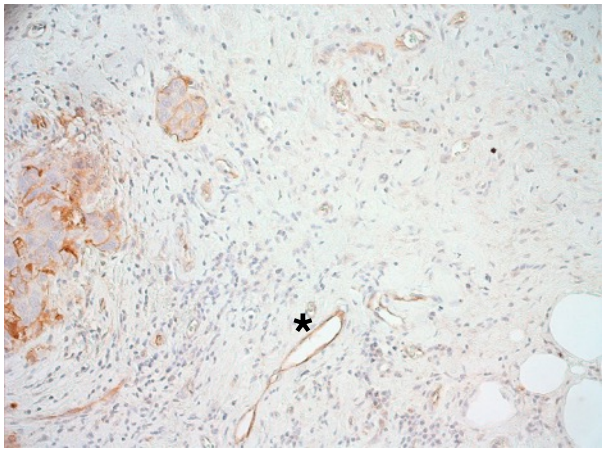

Abb. 24: Ovarialkarzinom und ein Gefäß in 200-facher Vergrößerung, G2

Auf der Abbildung 23 sind Nester von Tumorzellen zu erkennen. Insbesondere am Rand der Nester zeigt sich die immunhistochemische Färbung von ICAM1 an der Zellmembran. Das Zytoplasma und der Zellkern sind frei von dem Adhäsionsmolekül. Auch die am rechten Bildrand gelegenen Fibroblasten weisen kein ICAM1 auf.

Auf der Abbildung 24 ist ebenfalls ein Ovarialkarzinom dargestellt. Auch hier zeigen sich die Außenbereiche der Tumornester deutlich ICAM1-positiv, das Bindegewebe jedoch negativ. Im linken Bildrand sind die von ICAM1 umrandeten Tumorzellen zu erkennen. Bei der Struktur am unteren Bildrand (*) handelt es sich um ein Gefäß im Längsschnitt, das ebenfalls eine Färbung aufweist.

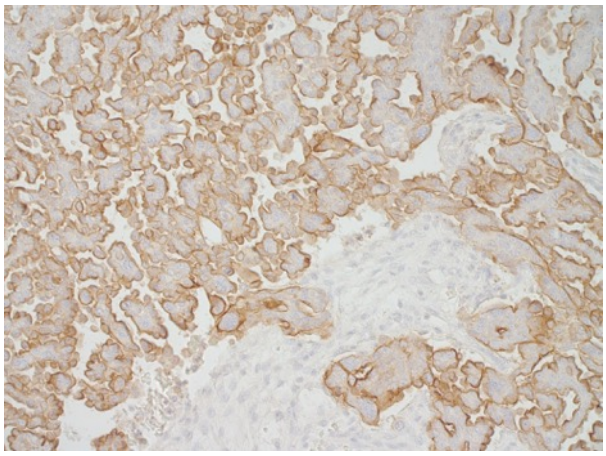

Abb. 25: Ovarialkarzinom in 200-facher Vergrößerung, G3

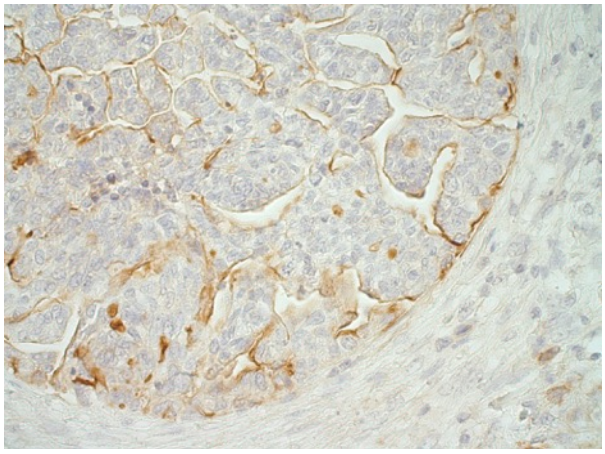

Abb. 26: Ovarialkarzinom in 400-facher Vergrößerung, G2

Auf der Abbildung 25 ist ein stark positiv gefärbtes Ovarialkarzinom zu erkennen. Die Tumorzellen haben sich in kleinen Grüppchen zusammengelagert und insbesondere die Außenbereiche der Zellansammlungen weisen eine intensive Anfärbung von ICAM1 auf.

Der in Abbildung 26 dargestellte Tumor zeigt ebenfalls eine die Karzinomzellen umrandende Verteilung von ICAM1.

3.2.2 BCAM

Die Verteilung von BCAM zeigte sich nach der Auswertung folgendermaßen:

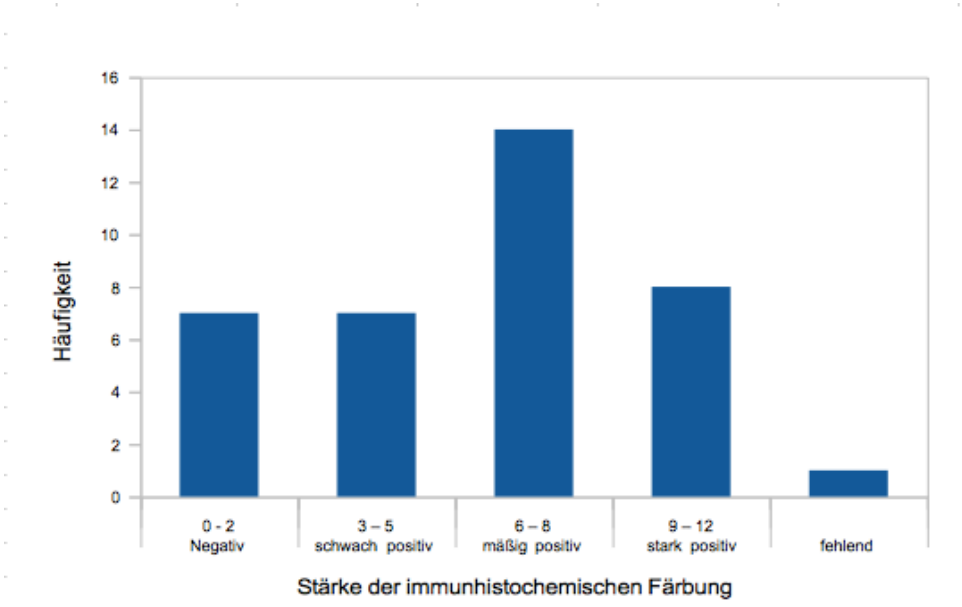

Abb. 27: Verteilung der Stärke der immunhistochemischen Färbung von BCAM

Im Gegensatz zur Verteilung von ICAM1 zeigen nur sieben Tumore keine BCAM-Expression. Weitere sieben Tumore weisen eine schwach positive Färbung auf. 14 Tumore sind mäßig positiv angefärbt, was der Mehrheit entspricht. Eine stark positive BCAM-Expression liegt bei acht Tumoren vor. Ein Tumorschnitt war nicht auswertbar.

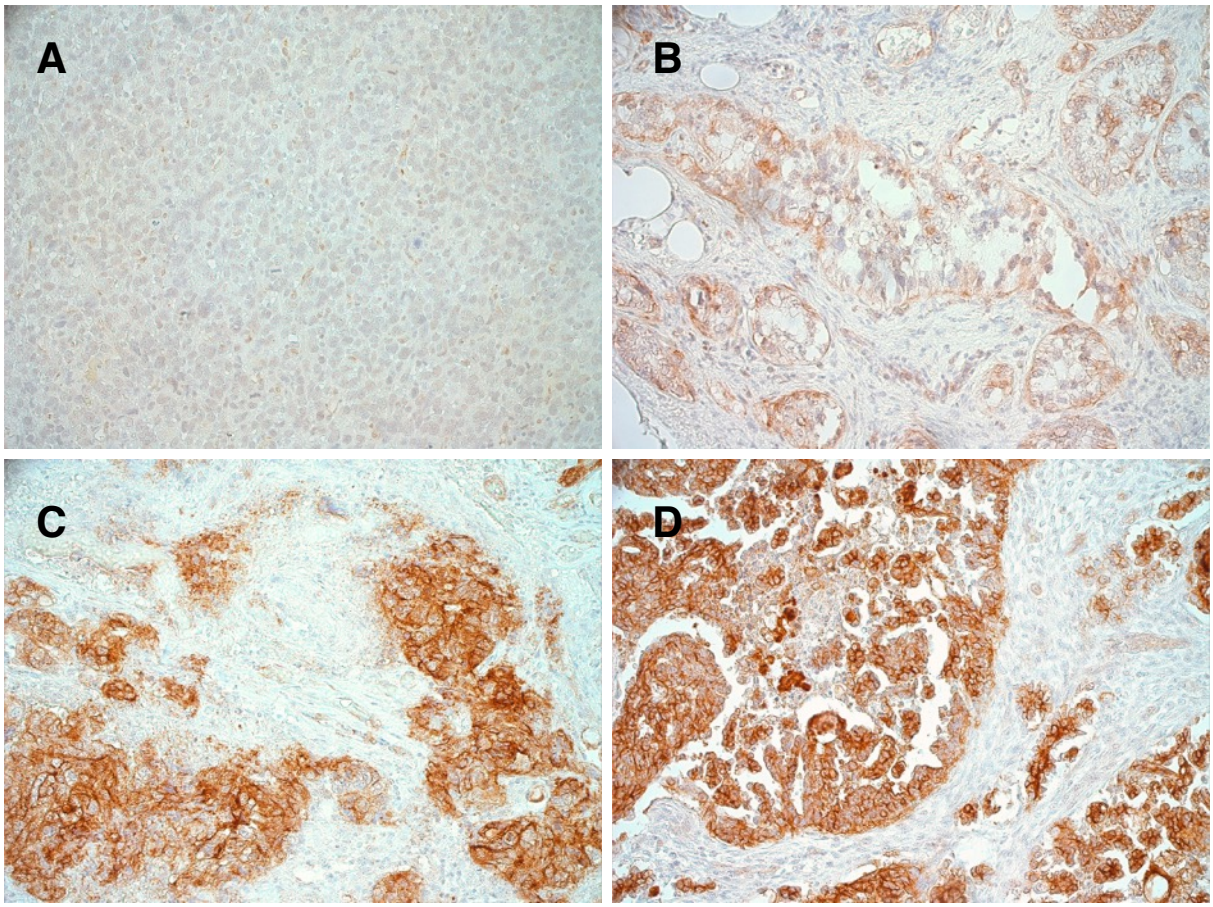

Abb. 28: Stärke der immunhistochemischen Färbung von BCAM
A) Rezidiv eines Ovarialkarzinoms, 200-fache Vergrößerung, G3, negativ
B) Seröses Ovarialkarzinom, 200-fache Vergrößerung, G2, schwach positiv
C) Seröses Ovarialkarzinom, 200-fache Vergrößerung, G3, mäßig positiv
D) Seröses Ovarialkarzinom, 200-fache Vergrößerung, G3, stark positiv

Auf der Abbildung 28 sind beispielhaft Tumore mit den unterschiedlichen Stärken der immunhistochemischen Färbung dargestellt. Generell ließ sich beobachten, dass die BCAM-Expression kräftiger ausfällt als die von ICAM1. Auch die Endothelien der Blutgefäße zeigen eine stärkere Färbung von BCAM als von ICAM1.

Mithilfe der folgenden Bilder wird die Verteilung der Färbung von BCAM genauer erläutert:

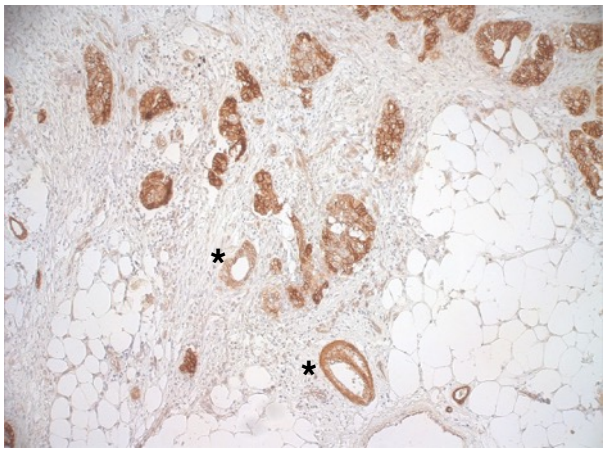

Abb. 29: Ovarialkarzinom in 100-facher Vergrößerung, G2

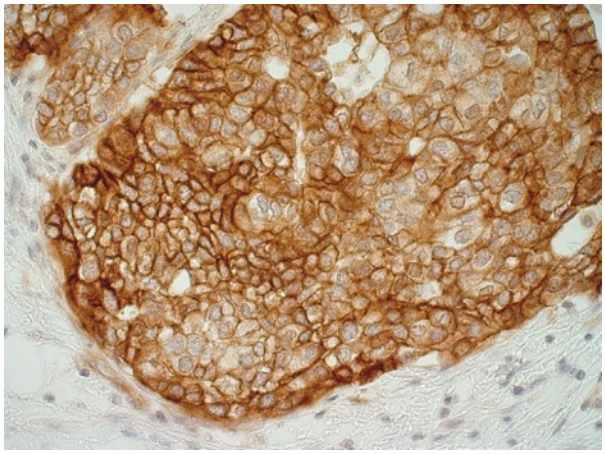

Abb. 30: Ovarialkarzinom in 400-facher Vergrößerung, G2

Auf den Abbildungen 29 und 30 ist derselbe Tumor in unterschiedlichen Vergrößerungen dargestellt. Die linke Abbildung dient der Übersicht. Zu sehen sind BCAM-positiv gefärbte Tumorzellnester, einige Fettzellen und umgebendes Bindegewebe. Die Endothelzellen von Blutgefäßen (*) stellen sich ebenfalls positiv dar. Auf dem zweiten Bild ist eine stark vergrößerte Ansammlung von Tumorzellen zu erkennen. Die Membranen jeder einzelnen Zelle in dem Verband sind stark positiv gefärbt.

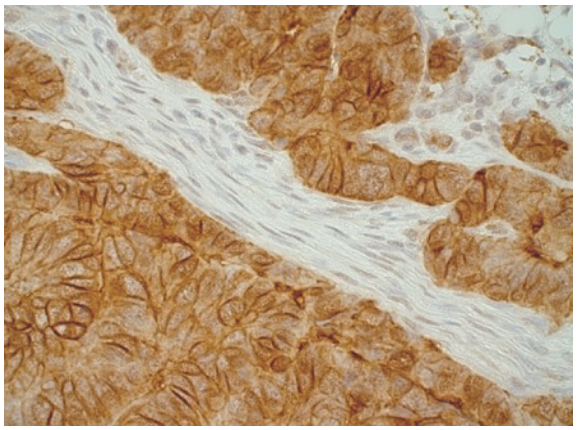

Abb. 31: Ovarialkarzinom in 400-facher Vergrößerung, G2

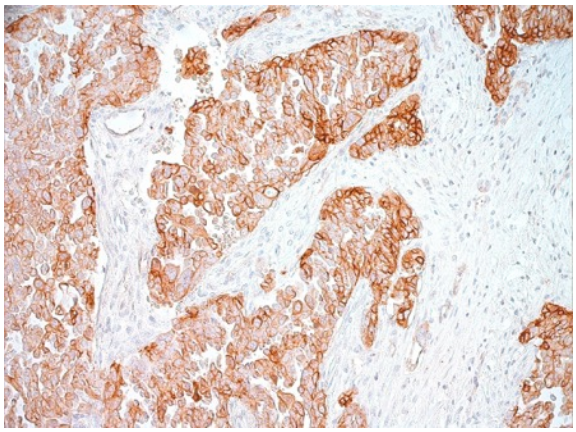

Abb. 32: Ovarialkarzinom in 200-facher Vergrößerung, G3

Auf der Abbildung 31 sind Tumorzellen und umgebendes Bindegewebe zu sehen. Die Tumorzellen zeigen eine intensive Anfärbung. Beim Mikroskopieren des Tumors ließ sich beobachten, dass insbesondere die Invasionsfronten des Tumors eine stark positive Färbung zeigen. Beim Vergrößern des Schnittes lässt sich erkennen, dass sowohl die Membranen jeder Tumorzellen als auch das Zytoplasma BCAM exprimieren, wenn auch weniger stark.

Abbildung 32 zeigt wiederum einen Tumor, dessen Membranen eine intensive BCAM-Expression aufweisen. Beim Zytoplasma sowie beim Bindegewebe fehlt diese.

3.3 Western-Blot-Analyse

Die Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS durchgeführt. Es erfolgten eine Untersuchung des Gesamtkollektivs und eine getrennte Untersuchung der Primärtumoren, der Rezidivtumore, der Borderline-Tumoren sowie der Zystadenome.

Auf der Abbildung 33 sind beispielhaft drei Western-Blot-Filme dargestellt. Auf dem oberen Film ist das Kontrollgen GAPDH zu sehen, auf dem mittleren ICAM1 und auf dem unteren BCAM. Die Detektionsbereiche liegen zwischen 35-100 kDa.

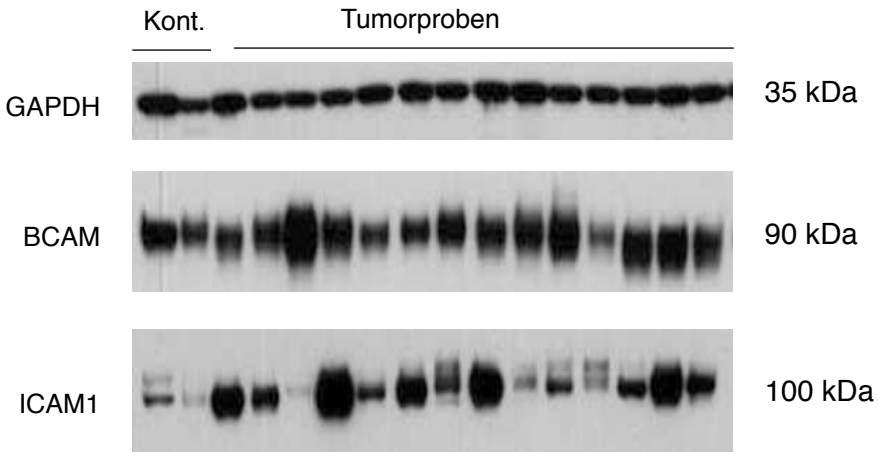

Abb. 33: Beispielfilm eines Western-Blots

3.3.1 Untersuchung des Gesamtkollektivs

Häufigkeiten und t-Test-Berechnungen

Die Untersuchung des Gesamtkollektivs (n=250) ergibt Werte der ICAM-Expression zwischen 0 und 1150. Der Mittelwert liegt bei 82,37, der Median bei 62,21.

Die Analyse der Primärtumoren (n=217) ergibt Werte zwischen 0 und 696, einen Mittelwert von 80,98 sowie ein Median von 66,93.

In den Abbildungen 34 und 35 sind die logarithmierten ICAM-Expressionswerte des Gesamtkollektivs und der Primärtumoren dargestellt.

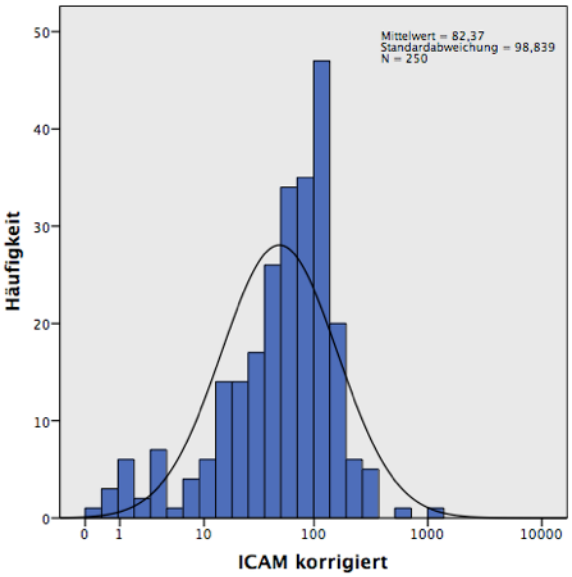

Abb. 34: Histogramm der logarithmierten ICAM1-Verteilung im Gesamtkollektiv

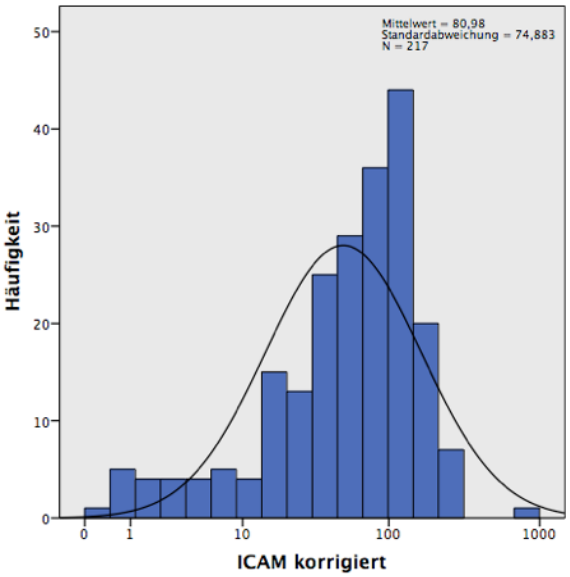

Abb. 35: Histogramm der logarithmierten ICAM1-Verteilung bei Primärtumoren

Die Borderline-Tumoren (n=15) weisen Expressionsraten zwischen 2 und 1150 auf. Der Mittelwert liegt bei 107,76, der Median bei 37. Bei den Rezidivtumoren (n=14) zeigen sich ein Minimum von 11, ein Maximum von 156, ein Mittelwert von 80,31 und ein Median von 85. Die vier Zystadenome zeigen Expressionen im Bereich von 25 und 166. Der Mittelwert liegt bei 69,97, der Median bei 44,35.

Die Tabelle 14 dient der Veranschaulichung der zuvor im Text genannten Werte.

Tabelle 14: ICAM1-Expression nach Tumortyp

Tumortyp	Anzahl	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
Primär	217	0	696	80,98	66,93
Borderliner	15	2	1150	107,76	37
Rezidive	14	11	156	80,31	85
Zystadenome	4	25	166	69,97	44,35
Gesamt	250	0	1150	82,37	62,21

Ein Vergleich der ICAM1-Expression in Primärtumoren, Borderline-Tumoren, Rezidiven und Zystadenomen mit Hilfe des t-Tests ergibt keine statistisch signifikanten Korrelationen.

Die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ergiebt keinen Zusammenhang zwischen der ICAM-Expression und der BCAM-Expression. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,074 mit einem p-Wert von 0,246.

Die Auswertung der BCAM-Expression für die 250 Ovarialtumoren ergibt Werte zwischen 0 und 2496. Der Mittelwert der Expression liegt bei 308,52, der Median bei 171,55. Werden ausschließlich die Primärtumoren (n=217) betrachtet, so ergeben sich Werte zwischen 3 und 2144 mit einem Mittelwert von 306,5 und einem Median von 187. Die Abbildungen 36 und 37 zeigen die Histogramme der BCAM-Expression für das Gesamtkollektiv und die Primärtumoren.

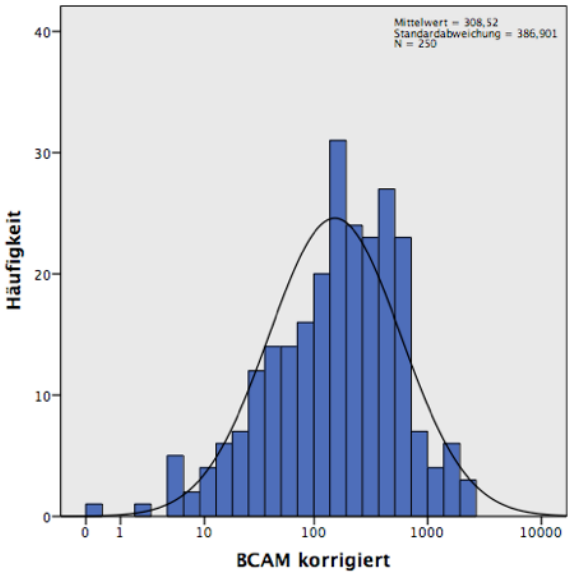

Abb. 36: Histogramm der logarithmierten BCAM-Verteilung im Gesamtkollektiv

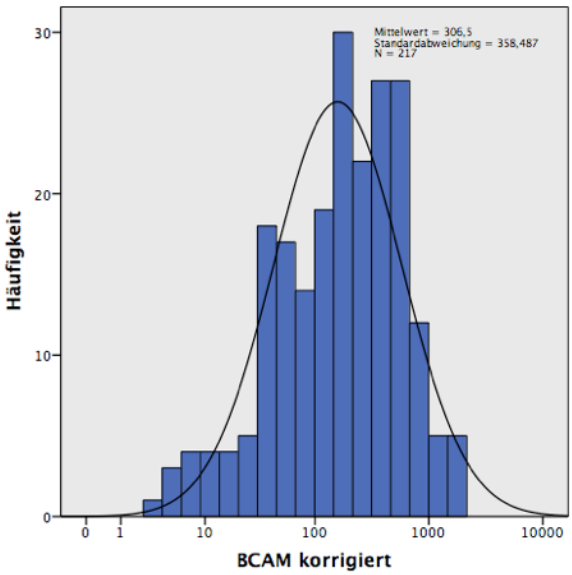

Abb. 37: Histogramm der logarithmierten BCAM-Verteilung bei Primärtumoren

Der Expressionsbereich der Borderline-Tumoren (n=15) liegt zwischen 16 und 272. Der Mittelwert beträgt 108,54, der Median liegt bei 96,82. Für die 14 Rezidivtumoren gilt ein Bereich zwischen 21 und 2496. Der Mittelwert liegt bei 611,28, der Median ist

290. Bei den Zystadenomen (n=4) zeigt sich ein Minimum von 0, ein Maximum von 404, ein Mittelwert von 107,98 und ein Median von 13,89. Eine übersichtliche Darstellung der Werte zeigt Tabelle 15.

Tabelle 15: BCAM-Expression nach Tumortyp

Tumortyp	Anzahl	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
Primärtumor	217	3	2144	306,5	187
Borderliner	15	16	272	108,54	96,82
Rezidive	14	21	2496	611,28	290
Zystadenome	4	0	404	107,98	13,89
Gesamt	250	0	2496	308,53	171,55

Die t-Test-Berechnungen zum Vergleich der BCAM-Expression in den verschiedenen Tumortypen zeigten statistisch signifikante Ergebnisse. Der Mittelwert der Expression von BCAM in den Rezidivtumoren unterscheidet sich von dem in den Primärtumoren ($p=0,05$). Der Mittelwert der BCAM-Expression der Primärtumoren wiederum unterscheidet sich von dem der Borderline-Tumoren ($p=0,034$). Dementsprechend zeigt auch der Vergleich von Rezidivtumoren und Borderline-Tumoren einen signifikanten Unterschied in beiden Gruppen mit einem p-Wert von 0,015. Vergleiche mit der Gruppe der Zystadenome ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

Die Abbildung 38 veranschaulicht den Vergleich der ICAM1- und der BCAM-Expression in Abhängigkeit von den Tumortypen.

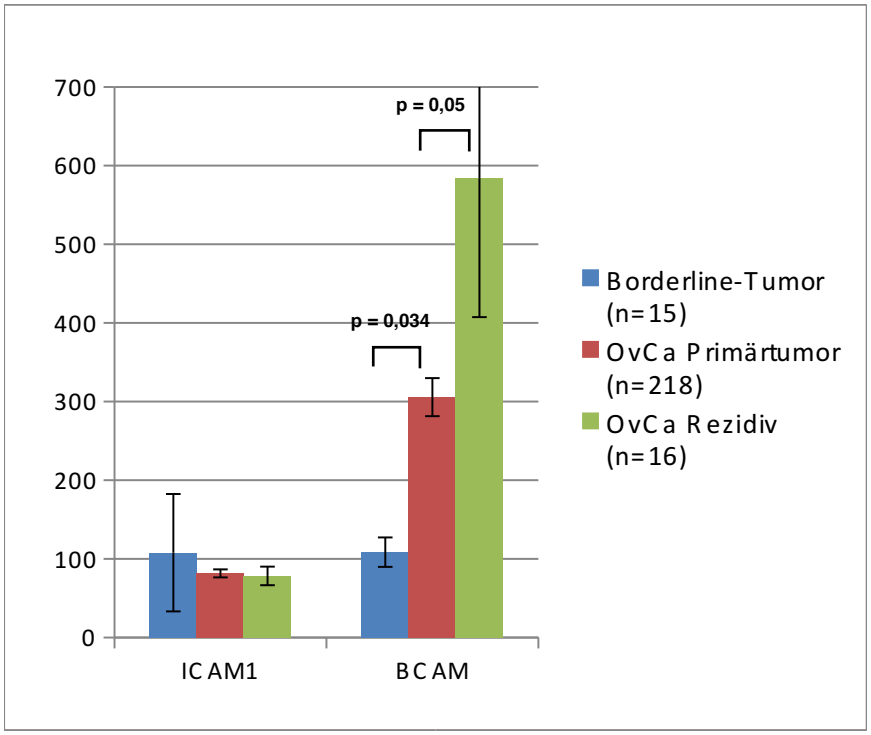

Abb. 38: Balkendiagramm der ICAM1- bzw. BCAM-Expressionswerte der Tumortypen im Vergleich

3.3.2 ICAM1

Analyse der Primärtumoren mittels χ^2-Test und Log-Rank-Test

Die weiteren Untersuchungen wurden nur mit der Gruppe der Primärtumoren durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das Kollektiv in Quartile nach Höhe der ICAM1-Expression eingeteilt. Das erste Quartil weist eine vergleichsweise geringe ICAM1-Expression auf, das zweite und das dritte Quartil eine mäßige und das vierte Quartil schließlich eine hohe Expression. Die drei Grenzwerte liegen bei 29,75, 66,93 und 115,31.

Zunächst wurde die Korrelation zwischen ICAM1-Expression und den Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms mittels χ^2-Test untersucht. Hierbei ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen ICAM1-Expression und dem FIGO-Stadium ($p < 0,001$). Für das Grading ($p=0,318$), den Nodalstatus ($p=0,081$) und den Metastasenstatus ($p=0,124$) lassen sich die Tendenzen eines Zusammenhanges im Balkendiagramm erkennen, wenn auch keine statistisch signifikanten Werte vorliegen. Zu weiteren klinisch-pathologischen Parametern wie dem Alter, dem histologischen Typen und dem postoperativen Tumorrest gab es ebenfalls keine signifikanten Korrelationen.

Wird das Kollektiv anhand der ICAM1-Expressionswerte in zwei Gruppen mit einem Grenzwert von 66,93 eingeteilt, so ergeben sich statistisch signifikante Werte für den Nodalstatus (p=0,032) und den Metastasenstatus (p=0,023). Auch das Grading nähert sich mit einem p-Wert von 0,095 einer statistischen Signifikanz an.

Die Abbildungen 39-42 veranschaulichen in Balkendiagrammen die Korrelation des FIGO-Stadiums, des Gradings, des Nodalstatus und des Metastasenstatus mit der in Quartile aufgeteilten ICAM1-Expression.

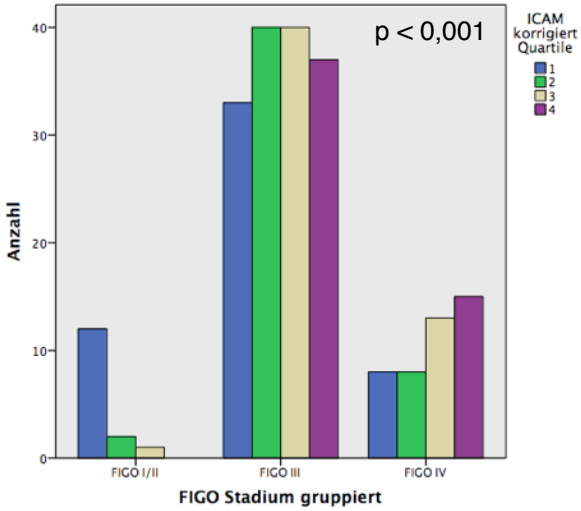

Abb. 39: Korrelation zwischen ICAM1 und dem gruppierten FIGO-Stadium

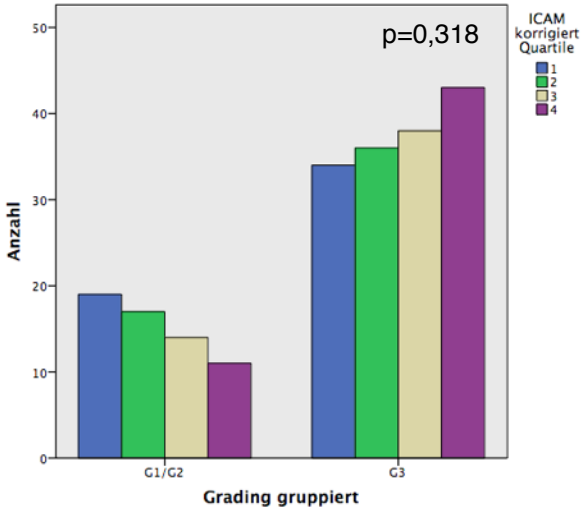

Abb. 40: Korrelation zwischen ICAM1 und dem gruppierten Grading (G1+G2/ G3)

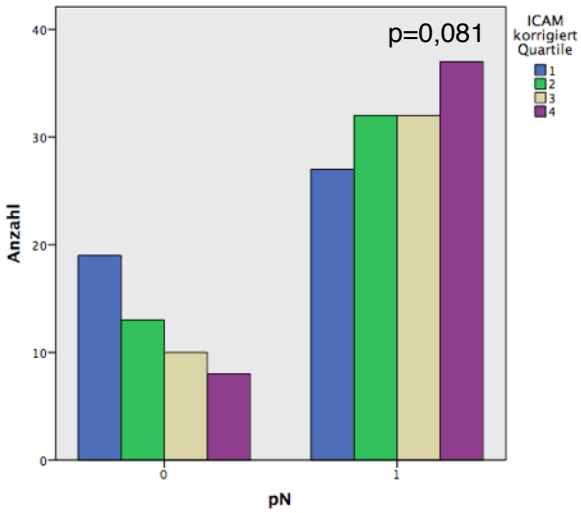

Abb. 41: Korrelation zwischen ICAM1 und dem Nodalstatus (N0/ N1)

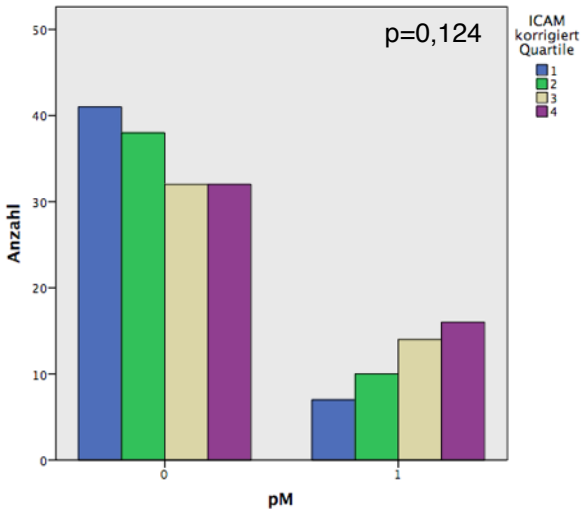

Abb. 42: Korrelation zwischen ICAM1 und dem Metastasenstatus (M0/ M1)

In der Tabelle 16 sind die Prognoseparameter mit den jeweiligen Signifikanzwerten dargestellt.

Tabelle 16: Korrelation zwischen ICAM1-Expression und Prognosefaktoren

Prognosefaktor	p-Wert
FIGO-Stadium gruppiert (FIGO I+II/ FIGO III/ FIGO IV)	< 0,001
FIGO-Stadium	0,030
Nodalstatus	0,081
Metastasenstatus	0,124
Alter bei Erstdiagnose	0,162
Histologie	0,178
OP-Ergebnis	0,194
Grading gruppiert (G 1+2/ G3)	0,318
Grading	0,355
CA-125 präoperativ	0,369

Die anhand des Log-Rank-Tests ermittelten Korrelationen der ICAM1-Expression mit dem Gesamtüberleben und dem rezidivfreien Intervall ergaben keine signifikanten Ergebnisse. Nachfolgend sind die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (p=0,572) und das rezidivfreie Intervall (p=0,481) für die jeweiligen Quartile dargestellt.

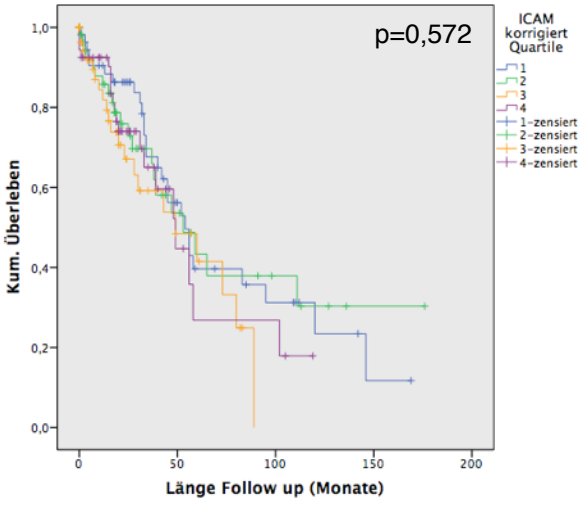

Abb. 43: Korrelation zwischen ICAM1-Expression und Gesamtüberleben

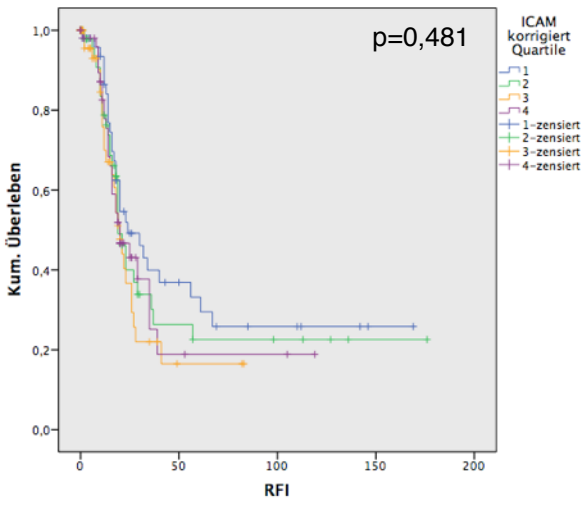

Abb. 44: Korrelation zwischen ICAM1-Expression und rezidivfreiem Intervall

3.3.3 BCAM

Analyse der Primärtumoren mittels χ^2-Test und Log-Rank-Test

Wie schon bei ICAM1 wurden für die weiteren Analysen nur die Primärtumoren betrachtet und das Kollektiv nach Höhe der BCAM-Expression ebenfalls in Quartile eingeteilt. Die drei Grenzwerte liegen bei 66, 187 und 437.

Die Analysen der Korrelation zwischen der BCAM-Expression und den relevanten Prognoseparametern ergaben keine statistisch signifikanten Werte. Lediglich das in zwei Gruppen aufgeteilte Grading (G1+G2/ G3) weist mit einem p-Wert von 0,063 eine Tendenz zur Signifikanz auf.

Auch in diesem Fall wurden die Berechnungen ebenfalls mit der anhand des Medians in zwei Gruppen geteilten BCAM-Expression durchgeführt. Die eine Hälfte weist eine eher niedrige BCAM-Expression auf, die zweite eine eher hohe. Der Grenzwert der beiden Gruppen lag bei 187. Bei einer Zweiteilung des Kollektivs anhand der Höhe der BCAM-Expression ergeben sich statistisch signifikante Werte für das Grading (p=0,008) und für den histologischen Subtypen (p=0,011).

Ausgewählte Prognoseparameter sind in den Abbildungen 45-48 dargestellt.

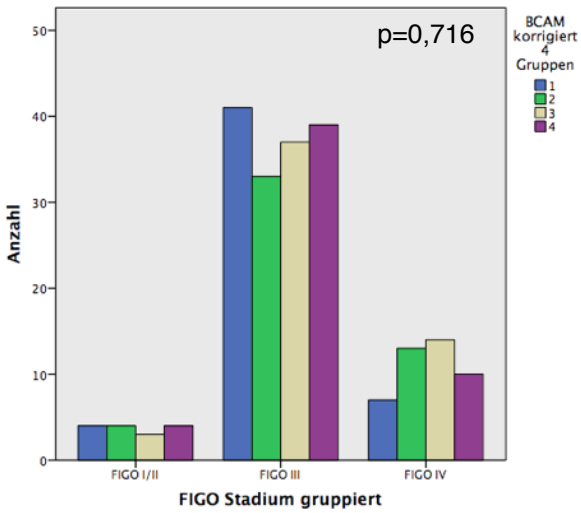

Abb. 45: Korrelation zwischen BCAM und dem gruppierten FIGO-Stadium (FIGO I+II/ FIGO III/ FIGO IV)

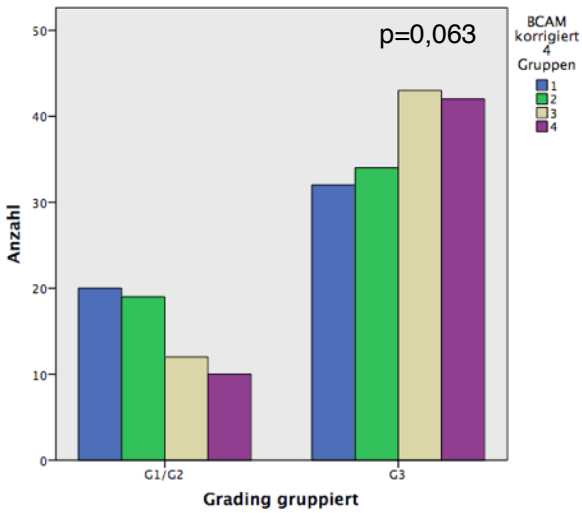

Abb. 46: Korrelation zwischen BCAM und dem gruppierten Grading (G1+G2/ G3)

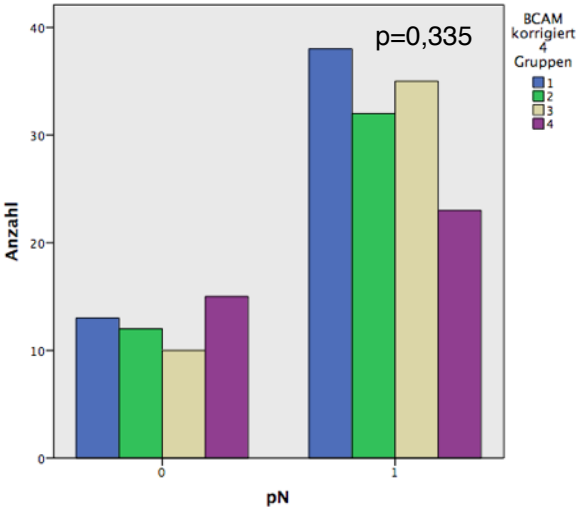

Abb. 47: Korrelation zwischen BCAM und dem Nodalstatus (N0/ N1)

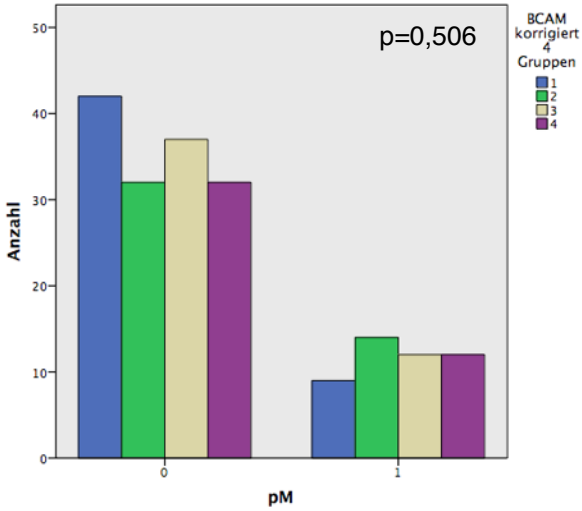

Abb. 48: Korrelation zwischen BCAM und dem Metastasenstatus (M0/ M1)

Alle berechneten p-Werte finden sich in der Tabelle 17.

Tabelle 17: Korrelation zwischen BCAM-Expression und Prognosefaktoren

Prognosefaktor	**p-Wert**
FIGO-Stadium gruppiert (FIGO I+II/ FIGO III/ FIGO IV)	0,716
FIGO-Stadium	0,528
Nodalstatus	0,335
Metastasenstatus	0,506
Alter bei Erstdiagnose	0,396
Histologie	0,122
OP-Ergebnis	0,897
Grading gruppiert (G 1+2/ G3)	0,063
Grading	0,135
CA-125 präoperativ	0,504

Die anhand des Log-Rank-Tests ermittelten Korrelationen der BCAM-Expression mit dem Gesamtüberleben und dem rezidivfreien Intervall ergaben keine signifikanten Ergebnisse. Die Abbildungen 49 und 50 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (p=0,209) und das rezidivfreie Intervall (p=0,243) für die jeweiligen Quartile.

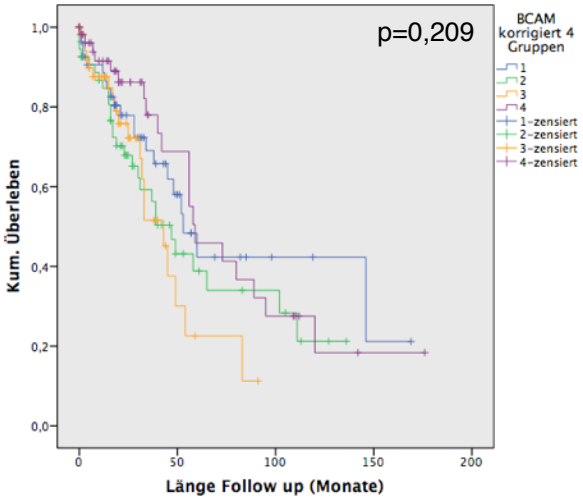

Abb. 49: Korrelation zwischen BCAM-Expression und Gesamtüberleben

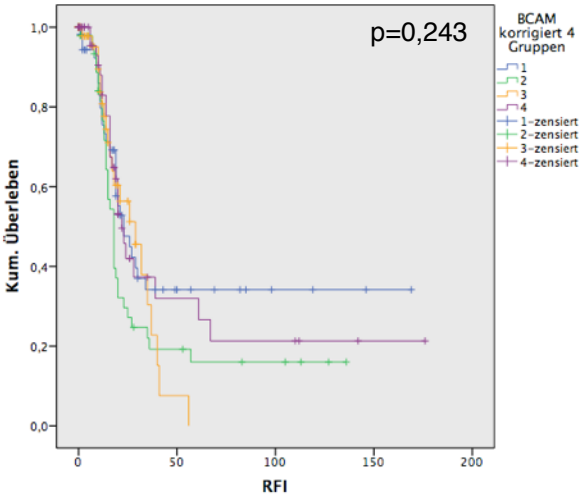

Abb. 50: Korrelation zwischen BCAM-Expression und rezidivfreien Intervall

4. Diskussion

Das Ovarialkarzinom ist der gynäkologische Tumor mit der höchsten Mortalität. Die schlechte Prognose des Ovarialkarzinoms geht in erster Linie auf die frühzeitige peritoneale Streuung und die hohe Rezidivrate zurück. Trotz radikaler Operationen mit anschließender Chemotherapie ist die Prognose heute noch unbefriedigend. Für die Entwicklung neuer und effizienterer Therapiekonzepte ist es erforderlich, die Tumorbiologie der Zellen besser zu verstehen und neue prognostische und prädiktive Faktoren zu identifizieren.

Bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms spielen Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Mit Hilfe dieser Moleküle haften Tumorzellen an dem Peritoneum an und bilden neue Tumorherde. Die vorliegende Arbeit hat eine Gruppe von Adhäsionsmolekülen untersucht, bei denen vermutet wurde, dass sie eine Rolle bei diesen Prozessen spielen. Das Expressionsmuster von ICAM1, ICAM2 und BCAM in den Tumorzellen wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen genauer analysiert. Die prognostische Relevanz der Adhäsionsmoleküle wurde durch Berechnungen der Korrelation zwischen Expressionshöhe und dem Rezidivfreien- und Gesamtüberleben geprüft. Als Grundlage hierfür diente ein Kollektiv aus 250 Tumoren des gynäkologischen Forschungslabors des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf.

4.1. Einfluss von klinisch-pathologischen Parametern auf die Prognose des Ovarialkarzinoms

Es ist eine Vielzahl von Faktoren bekannt, die Einfluss auf die Prognose des Ovarialkarzinoms nehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Hamburger Western-Blot-Kollektiv auf die bereits in der Einleitung erwähnten Prognosefaktoren auf Signifikanz untersucht.

Der histologische Subtyp des Ovarialkarzinoms ist ein gesicherter Prognosefaktor. Seröse und endometrioide Tumoren weisen eine bessere Prognose auf als klarzellige und muzinöse Tumoren (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013). In den Berechnungen korreliert der histologische Subtyp sowohl mit dem Gesamtüberleben ($p < 0{,}001$) als auch mit dem rezidivfreien Intervall ($p < 0{,}001$).

Auch das Tumorstadium nach FIGO gehört zu den Prognoseparametern des Ovari-

alkarzinoms. Patientinnen im FIGO-Stadium I weisen eine deutlich bessere Prognose auf als Patientinnen im FIGO-Stadium IV (Heintz et al., 2006). Das gleiche Ergebnis konnten die in dieser Arbeit erhobenen Berechnungen darlegen. Auch hier zeigten sich sowohl zwischen FIGO-Stadium und Gesamtüberleben ($p < 0,001$) als auch zwischen FIGO-Stadium und dem rezidivfreien Intervall ($p < 0,001$) signifikante Korrelationen. Das FIGO-Stadium IV geht mit Fernmetastasen einher. Dementsprechend konnten die Berechnungen zeigen, dass auch der Metastasenstatus der Patientinnen mit dem Gesamtüberleben ($p < 0,001$) und dem rezidivfreien Intervall ($p < 0,001$) korreliert.

Der wohl wichtigste Prognosefaktor des Ovarialkarzinoms ist der postoperativ verbleibende Tumorrest. Frauen, die ohne Tumorrest operiert werden konnten, überleben länger und erleiden seltener Rezidive als Frauen, bei denen makroskopisch sichtbares Tumorgewebe verbleibt (Bristow et al., 2002, Eisenhauer et al., 2006, du Bois et al., 2009, Horowitz et al., 2015). Ebenso verhält es sich bei den Patientinnen des in dieser Arbeit untersuchten Western-Blot-Kollektivs. Das Operationsergebnis nimmt signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p < 0,001$) und das rezidivfreie Intervall ($p < 0,001$).

Auch das Alter der Patientinnen bei der Erstdiagnose des Ovarialkarzinoms nimmt einen Einfluss auf die Prognose. Frauen, die in einem Alter von 70 Jahren oder mehr erkrankten, starben früher und auch häufiger an der Erkrankung (Thigpen et al., 1993). Aus der Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben der Patientinnen des Western-Blot-Kollektivs lässt sich ablesen, dass Patientinnen, die in einem Alter unter 50 Jahren am Ovarialkarzinom erkrankten, ein besseres Gesamtüberleben aufweisen als Patientinnen, die in einem Alter 50-69 Jahren oder gar über 70 Jahren erkrankten. Statistisch signifikant ist diese Beobachtung jedoch nicht ($p=0,104$). Auch das rezidivfreie Intervall scheint nicht mit dem Alter bei der Erstdiagnose im Zusammenhang zu stehen ($p=0,752$).

Bei restlos operierten Tumoren ist auch das Grading als Prognoseparameter zu werten. In diesem Fall zeigten Patientinnen mit G1- und G2-klassifizierten Tumoren ein längeres Überleben als Patientinnen mit einem G3-klassifizierten Tumor. Dieser Effekt ließ sich nicht beobachten, wenn der Tumor nicht restlos reseziert werden konnte (du Bois et al., 2009). Die Analysen für das Gesamtüberleben ($p=0,609$) und das rezidivfreie Intervall ($p=0,219$) in Bezug auf das Grading ergaben in den hier vorge-

stellten Analysen keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

Die Log-Rank-Tests am Western-Blot-Kollektiv ergaben signifikante Korrelationen zwischen dem Nodalstatus und dem Gesamtüberleben einerseits ($p < 0,001$) und dem rezidivfreien Intervall ($p < 0,001$) andererseits. Ähnliche Ergebnisse lassen sich in der Literatur finden. Patientinnen mit einem negativen Nodalstatus überleben signifikant länger als Patientinnen mit bekannten Lymphknotenmetastasen (Di Re et al., 1989, di Re et al., 1996).

4.2 Immunhistochemische Analyse

Die Immunhistochemie ist eine etablierte und langjährig angewandte Methode, mit der es gelingt, spezielle Moleküle mit der Hilfe von Antikörpern zu markieren und damit lichtmikroskopisch sichtbar zu machen. Sie dient eher dem qualitativen als dem quantitativen Nachweis von Proteinen. Bei den Adhäsionsmolekülen ICAM1, ICAM2 und BCAM handelt es sich um Proteine, die in erster Linie auf der Zellmembran von maligne entarteten Zellen zu erwarten sind. Für ICAM1 und BCAM stimmen die Beobachtungen mit den Erwartungen überein. Das Expressionsmuster von ICAM1 konzentriert sich auf tumorös entartete Zellen. Im Tumorzellverband weisen insbesondere die Zellmembranen der am Rande gelegenen Tumorzellen eine verstärkte ICAM1-Expression auf. Die in der Literatur beschriebene Expression von ICAM1 auf Endothelzellen (Dustin et al., 1986) ließ sich in dieser Arbeit ebenfalls beobachten. Das die Tumorzellnester umgebende Bindegewebe ist frei von ICAM1. Die beobachtete Verteilung von ICAM1 deckt sich mit den von Arnold et al. beschriebenen Befunden ihrer immunhistochemischen Untersuchungen (Arnold et al., 2001).

Auch das Expressionsmuster von BCAM deckt sich mit vorab beschriebenen Befunden. Die Zellmembranen der Tumorzellen wiesen eine kräftige Färbung auf. Lediglich einige wenige Tumoren wiesen eine zytoplasmatische Expression der Adhäsionsmoleküle auf, was sich durch zelluläre Transportmechanismen erklären lässt. Ebenso zeigten die Endothelzellen angeschnittener Gefäße eine kräftige BCAM-Expression, wie von Schon et al. beschrieben (Schon et al., 2000). Immunhistochemische Voruntersuchungen konnten zeigen, dass BCAM diffus an der Zelloberfläche verteilt ist bei Zellen, die in zentralen Anteilen der Tumorzellnester eine geringere BCAM-Expression aufweisen (Maatta et al., 2005). Ein ähnliches Verhalten ließ sich auch bei den in

dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen beobachten. Die am Rande zum Stromagewebe gelegenen Bereiche des Tumors, also die Invasionsfront, zeigten ein erhöhtes Vorkommen von BCAM.

Die Beobachtungen für ICAM2 deckten sich nicht mit den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen. Die untersuchten Tumorproben exprimierten ICAM2 nicht nur auf den Zellmembranen, sondern zusätzlich auch in großer Menge in den Zellkernen, im Zytoplasma und auch auf Zellen, die normalerweise keine ICAM2-Expression aufweisen sollten, wie Bindegewebszellen. Das vermehrte Vorkommen von ICAM2 im Zytoplasma und in den Zellkernen lässt sich ebenfalls durch den intrazellulären Transport im Rahmen der Proteinsynthese erklären. Nicht entartete Bindegewebszellen sollten jedoch frei von ICAM2 sein (Thompson et al., 2002). Da es keine Voruntersuchungen zum Expressionsmuster in Ovarialkarzinomen gibt, ist es denkbar, dass es innerhalb der Tumoren zu einer vollständigen Deregulation der ICAM2-Expression kommt. Ebenso ist es möglich, dass der verwendete ICAM2-Antikörper nicht spezifisch an das Zielmolekül gebunden hat.

4.3 Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot dient dem quantitativen Nachweis von Proteinen. Es handelt sich hierbei um eine sehr spezifische und etablierte Methode. Dennoch ist es möglich, dass es bei diesem Verfahren zu Messungenauigkeiten oder Verzerrungen kommen könnte.

Zum einen ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit untersuchten Adhäsionsmoleküle im Tumor in vivo nicht homogen verteilt sind. Mikroskopisch ließ sich beobachten, dass die Expressionsstärke der Adhäsionsmoleküle variiert, je nachdem ob man das Zentrum des Tumors oder die Invasionsfront betrachtet. Die Menge an Adhäsionsmolekülen im Lysat könnte sich dementsprechend unterscheiden, je nachdem welcher Teil des Tumors lysiert wurde.

Es ist weiterhin davon auszugehen, dass die Menge an Adhäsionsmolekülen vom Tumorsitz abhängig ist. Während der Operation wird nach Möglichkeit der gesamte makroskopisch sichtbare Tumor entfernt. Es lässt sich nicht beeinflussen, welcher Teil des Tumors in die Pathologie geschickt wird und welcher der Forschung zur Verfügung gestellt wird. Es ist also möglich, dass sich in dem Kollektiv sowohl Peritone-

almetastasen befinden als auch Tumorstücke des ursprünglichen Primarius, die unterschiedliche Mengen der Adhäsionsmoleküle exprimieren. Um zumindest eine größtmögliche Konzentration an Tumorzellen für die Untersuchung zur Verfügung zu haben, wurden nur solche Tumorstücke lysiert, die 70% oder mehr Tumorgewebe enthalten.

Eine mögliche Messungenauigkeit könnte bei der Auswertung der Filme vorliegen. Bei einigen Proben ließ sich eine sehr starke und intensive Schwärzung des Films beobachten. Es ist davon auszugehen, dass bei diesen Proben eine Sättigung erreicht war und somit sehr hohe Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle nicht genau bestimmt werden konnten.

4.3.1 Western-Blot-Analyse von ICAM1

Die einzelnen Tumoren der untersuchten Ovarialkarzinome unterscheiden sich zum Teil stark in der Höhe der Expression (Minimum 0, Maximum 1150). Die Höhe der ICAM1-Expression scheint nach der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman nicht mit der Höhe der BCAM-Expression in Zusammenhang zu stehen. Dies lässt sich damit begründen, dass die Regulationsmechanismen der beiden Adhäsionsmoleküle, die für eine vermehrte oder verminderte Expression verantwortlich sind, sich unterscheiden (Kuppner et al., 1990, Bassi et al., 1995, van de Stolpe and van der Saag, 1996, Chang et al., 2017).

Die Expressionshöhe von Primärtumoren, Borderline-Tumoren, Rezidivtumoren und Zystadenomen unterscheidet sich nicht signifikant voneinander. Allerdings ist zu bedenken, dass die Fallzahlen der Borderline-Tumoren (n=15), der Rezidivtumoren (n=14) und der Zystadenome (n=4) gering ist. Es wäre denkbar, dass eventuell vorhandene Unterschiede aufgrund der geringen Fallzahlen nicht aufgedeckt werden konnten.

Bei der Analyse der Korrelation zwischen ICAM1-Expression und den Prognosefaktoren konnte ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0{,}001$) zwischen der ICAM1-Expression und dem FIGO-Stadium der Tumoren festgestellt werden. Bisher hat es keine Analysen gegeben, die dieses Ergebnis bestätigen oder widerlegen konnten.

Der Nodalstatus in Tumoren mit niedriger ICAM1-Expression unterschied sich signifikant von denen mit höherer Expression ($p=0{,}032$). Das gleiche gilt für den Metasta-

senstatus (p=0,023). Tumoren mit positivem Nodal- oder Metastasenstatus exprimierten im Mittel mehr ICAM1 als Tumoren mit negativem Status. Auch das Grading weist mit einem p-Wert von 0,095 eine Tendenz zur Signifikanz auf. Somit ist davon auszugehen, dass eine hohe ICAM1-Expression in Ovarialkarzinomen ein aggressiveres Wachstum der Tumorzellen begünstigt. Das Mammakarzinom, der häufigste Tumor der Frau, zeigte einen ähnlichen Einfluss von ICAM1 auf die Prognoseparameter. Schröder et al. konnten eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Höhe der Expression und dem Nodalstatus und dem Grading aufdecken. In den Zellen des Mammakarzinoms korrelierte die Höhe der ICAM1-Expression ebenfalls mit der Länge des rezidivfreien Intervalls (Schroder et al., 2011). Ähnliches konnten Usami et al. in ihren Studien am Mundhöhlenkarzinom feststellen. Sie beobachteten, dass die ICAM1-Expressionshöhe mit der Invasivität und dem Lymphknotenmetastasenstatus assoziert ist (Usami et al., 2013). Grupp et al. hingegen konnten keinen Einfluss von ICAM1 auf die Metastasierung des Pankreaskarzinoms beobachten (Grupp et al., 2018). Das könnte darin begründet liegen, dass sich Ovarialkarzinome, Mammakarzinome, Mundhöhlenkarzinome und Pankreaskarzinome in ihrer Entstehung und Ausbreitung voneinander unterscheiden.

Alle weiteren Prognosefaktoren wie das Alter bei der Erstdiagnose, der histologische Typ, das OP-Ergebnis und der präoperativ bestimmte Tumormarker CA-125 zeigten sich unabhängig von der ICAM1-Expression.

Auch das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Intervall zeigten in der Kaplan-Meier-Analyse keinen Zusammenhang mit der ICAM1-Expression.

Im Hinblick auf das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von ICAM1 auf die Metastasierung und die Prognose des Ovarialkarzinoms zu untersuchen, lässt sich nun schlussfolgern, dass ICAM1 sowohl mit dem Nodal- als auch mit dem Metastasenstatus korreliert. Dieser Zusammenhang konnte in dieser Arbeit erstmals festgestellt werden. Es ist also davon auszugehen, dass das Adhäsionsmolekül sowohl bei der Metastasierung von Tumorzellen in die Lymphknoten als auch bei der Fernmetastasierung eine Rolle spielt. Einen Einfluss auf die Prognose des Ovarialkarzinoms in Form des Gesamtüberlebens oder des rezidivfreien Intervalls ließ sich jedoch nicht feststellen. Somit ist es unwahrscheinlich, dass ICAM1 als potenzielles Ziel einer Antikörpertherapie im Rahmen einer prognoseverbessernden Therapie in Frage kommt.

4.3.2 Western-Blot-Analyse von BCAM

Die Expressionswerte von BCAM in den Ovarialtumoren variieren stark. Es gibt Tumoren, die gar kein BCAM enthalten, es gibt jedoch auch solche, die sehr viel BCAM exprimieren (Maximum 2496).

Die t-Test-Analysen ergaben einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der BCAM-Expression in Borderline-Tumoren und Primärtumoren einerseits sowie zwischen der Expression in Primärtumoren und Rezidivtumoren andererseits. Borderline-Tumoren wiesen eine eher niedrige Konzentration des Adhäsionsmoleküls auf, während die Menge in Primärtumoren und Rezidivtumoren anstieg. Bei Borderline-Tumoren handelt es sich um Tumoren mit einem niedrigen malignen Potenzial. Sie zeigen kein destruierendes Wachstum und weisen eine deutlich bessere Prognose auf als invasive Tumoren. Rezidivtumoren hingegen zeichnen sich durch einen besonders malignen Verlauf aus. Die Tumorzellen sind resistent gegenüber der üblichen Therapie und es gelingt ihnen, erneut einen manifesten Tumor auszubilden. Die Tatsache, dass die Borderline-Tumoren am wenigsten BCAM exprimieren, gefolgt von den Primärtumoren und den Rezidivtumoren, legt den Verdacht nahe, dass besonders maligne Zellen besonders viel BCAM exprimieren und wenig maligne Zellen dementsprechend weniger. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Fallzahlen der Borderline-Tumoren (n=15) und der Rezidivtumoren (n=14) gering waren.

Die Analyse der Korrelation zwischen den Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms und der BCAM-Expression mittels χ^2-Test ergab bei einer Aufteilung des Kollektivs in Quartile keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Bei einer Aufteilung der BCAM-Expressionsrate in zwei Gruppen mit höherer und niedrigerer Expression als der Median ergaben sich jedoch signifikante Ergebnisse für das Grading (p=0,008) und den histologischen Subtypen (p=0,011). Gut differenzierte Tumoren mit einem als G1 oder G2 eingestuften Grading wiesen eine niedrigere BCAM-Expression auf als schlecht differenzierte Tumoren (G3). Untersuchungen an einem kleinen Kollektiv von Harnblasenkarzinomen konnten einen solchen Zusammenhang von BCAM-Expression und Grading nicht nachweisen, was jedoch auf die Größe des Kollektivs zurückzuführen sein könnte. In diesen Tumorzellen ist die Hochregulation des Adhäsionsmoleküls durch eine mutierte Variante des H-ras V12 induziert worden (Chang et al., 2017).

Bei dem histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms ergaben die Analysen eben-

falls ein statistisch signifikantes Ergebnis. Aufgrund der geringen Fallzahlen ist es allerdings schwierig, eine Aussage über den Zusammenhang zu treffen. Es scheint jedoch so, als würden klarzellige, endometrioide und gemischtzellige Tumoren weniger BCAM exprimieren als undifferenzierte Tumoren, die eher viel BCAM aufweisen. Bei serösen und muzinösen Tumoren hingegen ist das Verhältnis ausgeglichen. Um genauere Aussagen über diesen Zusammenhang zu treffen, müssten weitere Versuche mit höheren Fallzahlen durchgeführt werden.

Die Analyse des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Intervalls nach Kaplan-Meier ergab auch für BCAM keine statistisch signifikanten Korrelationen.

Einige Studien konnten belegen, dass Laminin als Ligand für BCAM eine wichtige Rolle in der Progression von Tumoren spielt (Drewniok et al., 2004, Kikkawa et al., 2014, Chang et al., 2017). Es ist denkbar, dass dies auch bei Ovarialtumoren der Fall ist. Hierzu könnten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die genauen Verhältnisse zu verstehen.

Es zeigte sich letztlich kein Zusammenhang zwischen der Höhe der BCAM-Expression und der Metastasierung des Ovarialkarzinoms. Sowohl Lymphknotenmetastasen als auch Fernmetastasen sind unabhängig von dem Adhäsionsmolekül. BCAM nimmt auch keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben sowie das rezidivfreie Intervall und somit auf die Prognose der Patientinnen. Es ist also ebenfalls ungeeignet als therapeutisches Target. Der erstmals aufgedeckte Zusammenhang zwischen der BCAM-Expression und der Malignität der Tumoren ist jedoch interessant und leistet einen Beitrag zum Verständnis der Tumorprogression.

5. Zusammenfassung

Die schlechte Prognose des Ovarialkarzinoms ist vor allem durch die frühzeitige peritoneale Metastasierung und die hohe Rezidivrate zu erklären. Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. rer. nat. Oliveira-Ferrer legten die Vermutung nahe, dass die Adhäsionsmoleküle ICAM1, ICAM2 und BCAM eine wichtige Rolle bei der Metastasierung der Ovarialkarzinomzellen spielen. Der Einfluss dieser Moleküle auf die Metastasierung und die Prognose des Ovarialkarzinoms wurden in dieser Arbeit durch immunhistochemische Untersuchungen und Western-Blot-Analysen genauer untersucht.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ICAM1 signifikant mit dem FIGO-Stadium und in einer anderen Einteilung des Kollektivs auch signifikant mit dem Nodal- und dem Metastasenstatus korreliert. Somit ist davon auszugehen, dass ICAM1 in der Tat eine Rolle spielt bei der Metastasierung von Tumorzellen des Ovarialkarzinoms. Ein Einfluss auf die Prognose konnte jedoch nicht festgestellt werden.

BCAM hingegen beeinflusst weder die Metastasierung noch die Prognose des Ovarialkarzinoms. Die Untersuchungen konnten allerdings zeigen, dass die Expressionswerte von BCAM mit zunehmender Malignität in den Tumorzellen ansteigen. Rezidivtumoren weisen signifikant höhere Werte auf als Primärtumoren und diese wiederum signifikant höhere Werte als Borderline-Tumoren.

Die Rolle von ICAM2 bleibt weiterhin unklar, da die Analysen nicht wie erwartet durchgeführt werden konnten.

Abstract

The poor prognosis of ovarian cancer is mainly due to the early peritoneal metastasis and the high recurrence rate. Investigations of the working group of Dr. med. rer. nat. Oliveira-Ferrer suggested that the adhesion molecules ICAM1, ICAM2, and BCAM play an important role in the metastasis of ovarian carcinoma cells. The impact of these molecules on metastasis and prognosis of ovarian cancer was further investigated through immunohistochemistry and Western blot analysis in this study.

This study is the first to show that ICAM1 significantly correlates with the FIGO stage. In another division of the patient cohort it also correlates significantly with the nodal and the metastasis status. Thus, ICAM1 is believed to play a role in the metastasis of ovarian cancer tumor cells. Nevertheless, an influence on the prognosis could not be determined.

However, BCAM does not affect metastasis or the prognosis of ovarian cancer. The studies have shown that the expression levels of BCAM increase with increasing malignancy of the tumor cells. Recurrent tumors have significantly higher scores than primary tumors and these in turn have significantly higher scores than borderline tumors.

The role of ICAM2 remains unclear as the analyses could not be performed as expected.

6. Abkürzungsverzeichnis

AA/BAA	Acrylamide/Bis-Acrylamide
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
APS	Ammoniumpersulfat
AUC	Area under the curve
BCA	Bicinchonic acid (Bicichoninsäure)
BCAM	Basal cell adhesion molecule
BRCA	Breast cancer gene
BSA	Rinderserumalbumin
c-Fos	Zelluläres Fos
CA-125	Cancer antigen 125
CAMs	Cell adhesion molecules
CD	Cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall
COX-1	Cylclooxigenase 1
CT	Computertomographie
DAB	3,3-Diamino-Peroxidase-Substrat
Dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H-ras	Human rat sarcoma
H2O2	Wasserstoffperoxid
HBOC	Hereditary breast–ovarian cancer syndrome
HCl	Salzsäure
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal carcinoma
HRP	Horseradish-Peroxidase
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
ICAM2	Intercellular adhesion molecule 2

IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IL-1β	Interleukin-1β
IRS	Immunreaktiven Scores
kDa	Kilodalton
L-CAM	Liver cell adhesion molecule
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LH	Luteinisierendes Hormon
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH	MutS homolog
MUC18	Melanoma cell adhesion molecule 18
N-CAM	Neural cell adhesion molecule
OP	Operation
OvCa	Ovarialkarzinom
PBS	Phosphate buffered saline
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RR	Relatives Riskio
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide-Gelelektrophoresis
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
TNM	Tumor Nodus Metastasen
UICC	Union internationale contre le cancer
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
V-CAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

7. Literaturverzeichnis

1996. Der Onkologe: Organ der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. Berlin ; Heidelberg ; New York: Springer.

AKSAMITIENE, E. 2009. *96-Well Plate* [Online]. Available: http://www.cellsignet.com/media/plates/96.jpg [Accessed].

ARNOLD, J. M., CUMMINGS, M., PURDIE, D. & CHENEVIX-TRENCH, G. 2001. Reduced expression of intercellular adhesion molecule-1 in ovarian adenocarcinomas. *Br J Cancer,* 85**,** 1351-8.

BANKS, R. E., GEARING, A. J., HEMINGWAY, I. K., NORFOLK, D. R., PERREN, T. J. & SELBY, P. J. 1993. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer,* 68**,** 122-4.

BASSI, V., VITALE, M., FELICIELLO, A., DE RIU, S., ROSSI, G. & FENZI, G. 1995. Retinoic acid induces intercellular adhesion molecule-1 hyperexpression in human thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab,* 80**,** 1129-35.

BAST, R. C., JR., FEENEY, M., LAZARUS, H., NADLER, L. M., COLVIN, R. B. & KNAPP, R. C. 1981. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest,* 68**,** 1331-7.

BOSETTI, C., NEGRI, E., TRICHOPOULOS, D., FRANCESCHI, S., BERAL, V., TZONOU, A., PARAZZINI, F., GREGGI, S. & LA VECCHIA, C. 2002. Long-term effects of oral contraceptives on ovarian cancer risk. *Int J Cancer,* 102**,** 262-5.

BRISTOW, R. E., TOMACRUZ, R. S., ARMSTRONG, D. K., TRIMBLE, E. L. & MONTZ, F. J. 2002. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol,* 20**,** 1248-59.

BRITT, K. & SHORT, R. 2012. The plight of nuns: hazards of nulliparity. *Lancet,* 379**,** 2322-3.

BROWN, P. O. & PALMER, C. 2009. The preclinical natural history of serous ovarian cancer: defining the target for early detection. *PLoS medicine,* 6**,** e1000114.

BUTCHER, E. C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell,* 67**,** 1033-6.

CAMPBELL, I. G., FOULKES, W. D., SENGER, G., TROWSDALE, J., GARIN-CHESA, P. & RETTIG, W. J. 1994. Molecular cloning of the B-CAM cell surface glycoprotein of epithelial cancers: a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res,* 54**,** 5761-5.

CHANG, H. Y., CHANG, H. M., WU, T. J., CHAING, C. Y., TZAI, T. S., CHENG, H. L., RAGHAVARAJU, G., CHOW, N. H. & LIU, H. S. 2017. The role of Lutheran/basal cell adhesion molecule in human bladder carcinogenesis. *J Biomed Sci,* 24**,** 61.

CHI, D. S., LIAO, J. B., LEON, L. F., VENKATRAMAN, E. S., HENSLEY, M. L., BHASKARAN, D. & HOSKINS, W. J. 2001. Identification of prognostic factors in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol,* 82**,** 532-7.

CHOI, J. H., CHOI, K. C., AUERSPERG, N. & LEUNG, P. C. 2006. Gonadotropins activate proteolysis and increase invasion through protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res,* 66**,** 3912-20.

CHRISTEN, P. & JAUSSI, R. 2005. Biochemie: eine Einführung mit 40 Lerneinheiten, Berlin u.a., Springer.

COLLABORATIVE GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF OVARIAN, C., BERAL, V., GAITSKELL, K., HERMON, C., MOSER, K., REEVES, G., PETO, R., GAPSTUR, S. M., PATEL, A. V., BANKS, E., DAL MASO, L., TALAMINI, R., CHETRIT, A., HIRSH-YECHEZKEL, G., LUBIN, F., SADETZKI, S., BERAL, V., BULL, D., CAIRNS, B., CROSSLEY, B., GAITSKELL, K., GOODILL, A., GREEN, J., HERMON, C., KEY, T., MOSER, K., REEVES, G., SITAS, F., COLLINS, R., PETO, R., GONZALEZ, C. A., LEE, N., MARCHBANKS, P., ORY, H. W., PETERSON, H. B., WINGO, P. A., MARTIN, N., SILPISORNKOSOL, S., THEETRANONT, C., BOOSIRI, B., CHUTIVONGSE, S., JIMAKORN, P., VIRUTAMASEN, P., WONGSRICHANALAI, C., GOODMAN, M. T., LIDEGAARD, O., KJAER, S. K., MORCH, L. S., KJAER, S. K., TJONNELAND, A., BYERS, T., ROHAN, T., MOSGAARD, B., VESSEY, M., YEATES, D., FREUDENHEIM, J. L., TITUS, L. J., CHANG-CLAUDE, J., KAAKS, R., ANDERSON, K. E., LAZOVICH, D., ROBIEN, K., HAMPTON, J., NEWCOMB, P. A., ROSSING, M. A., THOMAS, D. B., WEISS, N. S., LOKKEGAARD, E., RIBOLI, E., CLAVEL-CHAPELON, F., CRAMER, D., HANKINSON, S. E., TAMIMI, R. M., TWOROGER, S. S., FRANCESCHI, S., LA VECCHIA, C., NEGRI, E., ADAMI, H. O., MAGNUSSON, C., RIMAN, T., WEIDERPASS, E., WOLK, A., SCHOUTEN, L. J., VAN DEN BRANDT, P. A., CHANTARAKUL, N., KOETSAWANG, S., RACHAWAT, D., PALLI, D., BLACK, A., BRINTON, L. A., FREEDMAN, D. M., HARTGE, P., HSING, A. W., LACEY JNR, J. V., LISSOWSKA, J., HOOVER, R. N., SCHAIRER, C., BABB, C., URBAN, M., GRAFF -IVERSEN, S., et al. 2015. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *Lancet (London, England),* 385**,** 1835-42.

CRUM, C. P., DRAPKIN, R., MIRON, A., INCE, T. A., MUTO, M., KINDELBERGER, D. W. & LEE, Y. 2007. The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis. *Curr Opin Obstet Gynecol,* 19**,** 3-9.

D'HONDT, V., GOFFIN, F., ROCA, L., DRESSE, D., LEROY, C., KERGER, J., CORDIER, L., DE FORGES, H., VEYS, I. & LIBERALE, G. 2016. Interval Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in First-Line Treatment for Advanced Ovarian Carcinoma: A Feasibility Study. *Int J Gynecol Cancer*.

DE FOUGEROLLES, A. R., STACKER, S. A., SCHWARTING, R. & SPRINGER, T. A. 1991. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med,* 174**,** 253-67.

DE GROOTE, M. L., KAZEMIER, H. G., HUISMAN, C., VAN DER GUN, B. T., FAAS, M. M. & ROTS, M. G. 2014. Upregulation of endogenous ICAM-1 reduces ovarian cancer cell growth in the absence of immune cells. *Int J Cancer,* 134**,** 280-90.

DI RE, F., BAIOCCHI, G., FONTANELLI, R., GROSSO, G., COBELLIS, L., RASPAGLIESI, F. & DI RE, E. 1996. Systematic pelvic and paraaortic lymphadenectomy for advanced ovarian cancer: prognostic significance of node metastases. *Gynecologic oncology,* 62**,** 360-5.

DI RE, F., FONTANELLI, R., RASPAGLIESI, F. & DI RE, E. 1989. Pelvic and para-aortic lymphadenectomy in cancer of the ovary. *Bailliere's clinical obstetrics and gynaecology,* 3**,** 131-42.

DIACOVO, T. G., DEFOUGEROLLES, A. R., BAINTON, D. F. & SPRINGER, T. A. 1994. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest,* 94**,** 1243-51.

DIAMOND, M. S., STAUNTON, D. E., MARLIN, S. D. & SPRINGER, T. A. 1991. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell,* 65**,** 961-71.

DREWNIOK, C., WIENRICH, B. G., SCHON, M., ULRICH, J., ZEN, Q., TELEN, M. J., HARTIG, R. J., WIELAND, I., GOLLNICK, H. & SCHON, M. P. 2004. Molecular interactions of B-CAM (basal-cell adhesion molecule) and laminin in epithelial skin cancer. *Arch Dermatol Res,* 296**,** 59-66.

DU BOIS, A., REUSS, A., PUJADE-LAURAINE, E., HARTER, P., RAY-COQUARD, I. & PFISTERER, J. 2009. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer,* 115**,** 1234-44.

DU BOIS, A., ROCHON, J., LAMPARTER, C. & PFISTERER, J. 2005. [Impact of center characteristics on outcome in ovarian cancer in Germany]. *Zentralbl Gynakol,* 127**,** 18-30.

DUSTIN, M. L., ROTHLEIN, R., BHAN, A. K., DINARELLO, C. A. & SPRINGER, T. A. 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol,* 137**,** 245-54.

DUSTIN, M. L. & SPRINGER, T. A. 1988. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol,* 107**,** 321-31.

EARLE, C. C., SCHRAG, D., NEVILLE, B. A., YABROFF, K. R., TOPOR, M., FAHEY, A., TRIMBLE, E. L., BODURKA, D. C., BRISTOW, R. E., CARNEY, M. & WARREN, J. L. 2006. Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst,* 98**,** 172-80.

EDELMAN, G. M. 1983. Cell adhesion molecules. *Science,* 219**,** 450-7.

EILATI, E., PAN, L., BAHR, J. M. & HALES, D. B. 2012. Age dependent increase in prostaglandin pathway coincides with onset of ovarian cancer in laying hens. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,* 87**,** 177-84.

EISENHAUER, E. L., ABU-RUSTUM, N. R., SONODA, Y., LEVINE, D. A., POYNOR, E. A., AGHAJANIAN, C., JARNAGIN, W. R., DEMATTEO, R. P., D'ANGELICA, M. I., BARAKAT, R. R. & CHI, D. S. 2006. The addition of extensive upper abdominal surgery to achieve optimal cytoreduction improves survival in patients with stages IIIC-IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol,* 103**,** 1083-90.

ENGELAND, A., TRETLI, S. & BJORGE, T. 2003. Height, body mass index, and ovarian cancer: a follow-up of 1.1 million Norwegian women. *Journal of the National Cancer Institute,* 95**,** 1244-8.

ENOMOTO, T., OKAZAWA, M., KURAGAKI, C., YAMASAKI, M., IKEGAMI, H., OHTSUKI, Y., YAMAMOTO, T., TAKAGI, T., YAMADA, T., ITO, K., ASADA, M., TOKUGAWA, Y. & MURATA, Y. 2004. Is Clear Cell Carcinoma and Mucinous Carcinoma of the Ovary Sensitive to Combination Chemotherapy with Paclitaxel and Carboplatin?: A Multi-Institute Prospective Study (GOGO-OV1). *International Journal of Gynecological Cancer,* 14.

EYLER, C. E. & TELEN, M. J. 2006. The Lutheran glycoprotein: a multifunctional adhesion receptor. *Transfusion,* 46**,** 668-77.

FADER, A. N., JAVA, J., KRIVAK, T. C., BRISTOW, R. E., TERGAS, A. I., BOOKMAN, M. A., ARMSTRONG, D. K., TANNER, E. J. & GERSHENSON, D. M. 2014. The prognostic significance of pre- and post-treatment CA-125 in grade 1 serous ovarian carcinoma: a gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology,* 132**,** 560-5.

FATHALLA, M. F. 1971. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet,* 2**,** 163.

FEDUSKA, J. M., ALLER, S. G., GARCIA, P. L., CRAMER, S. L., COUNCIL, L. N., VAN WAARDENBURG, R. C. & YOON, K. J. 2015. ICAM-2 confers a non-metastatic phenotype in neuroblastoma cells by interaction with alpha-actinin. *Oncogene,* 34**,** 1553-62.

FIDLER, I. J. 1978. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res,* 38**,** 2651-60.

GARINCHESA, P., SANZMONCASI, M., CAMPBELL, I. & RETTIG, W. 1994. Non-polarized expression of Basal-cell adhesion molecule B-cam in epithelial ovarian cancers. *Int J Oncol,* 5**,** 1261-6.

GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND. 2017. *Der interaktive Krebs-Atlas der GEKID* [Online]. Available: http://www.gekid.de/Doc/Krebs_in_Deutschland_2013-2014_Web.pdf [Accessed].

GRUPP, K., MELLING, N., BOGOEVSKA, V., REEH, M., UZUNOGLU, F. G., EL GAMMAL, A. T., NENTWICH, M. F., IZBICKI, J. R. & BOGOEVSKI, D. 2018. Expression of ICAM-1, E-cadherin, periostin and midkine in metastases of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Exp Mol Pathol,* 104**,** 109-113.

GUPTA, R. A., TEJADA, L. V., TONG, B. J., DAS, S. K., MORROW, J. D., DEY, S. K. & DUBOIS, R. N. 2003. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer research,* 63**,** 906-11.

HAYES, S. H. & SEIGEL, G. M. 2009. Immunoreactivity of ICAM-1 in human tumors, metastases and normal tissues. *Int J Clin Exp Pathol,* 2**,** 553-60.

HEINTZ, A. P., ODICINO, F., MAISONNEUVE, P., QUINN, M. A., BENEDET, J. L., CREASMAN, W. T., NGAN, H. Y., PECORELLI, S. & BELLER, U. 2006. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet,* 95 Suppl 1**,** S161-92.

HEISKA, L., KANTOR, C., PARR, T., CRITCHLEY, D. R., VILJA, P., GAHMBERG, C. G. & CARPEN, O. 1996. Binding of the cytoplasmic domain of intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) to alpha-actinin. *J Biol Chem,* 271**,** 26214-9.

HESS, V., A'HERN, R., NASIRI, N., KING, D. M., BLAKE, P. R., BARTON, D. P., SHEPHERD, J. H., IND, T., BRIDGES, J., HARRINGTON, K., KAYE, S. B. & GORE, M. E. 2004. Mucinous epithelial ovarian cancer: a separate entity requiring specific treatment. *J Clin Oncol,* 22**,** 1040-4.

HINES, P. C., ZEN, Q., BURNEY, S. N., SHEA, D. A., ATAGA, K. I., ORRINGER, E. P., TELEN, M. J. & PARISE, L. V. 2003. Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion. *Blood,* 101**,** 3281-7.

HIRAOKA, N., YAMAZAKI-ITOH, R., INO, Y., MIZUGUCHI, Y., YAMADA, T., HIROHASHI, S. & KANAI, Y. 2011. CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology,* 140**,** 310-21.

HONDA, K., YAMADA, T., ENDO, R., INO, Y., GOTOH, M., TSUDA, H., YAMADA, Y., CHIBA, H. & HIROHASHI, S. 1998. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol,* 140**,** 1383-93.

HOROWITZ, N. S., MILLER, A., RUNGRUANG, B., RICHARD, S. D., RODRIGUEZ, N., BOOKMAN, M. A., HAMILTON, C. A., KRIVAK, T. C. & MAXWELL, G. L. 2015. Does aggressive surgery improve outcomes? Interaction between preoperative disease burden and complex surgery in patients with advanced-stage ovarian cancer: an analysis of GOG 182. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology,* 33**,** 937-43.

HOSKINS, W. J., MCGUIRE, W. P., BRADY, M. F., HOMESLEY, H. D., CREASMAN, W. T., BERMAN, M., BALL, H. & BEREK, J. S. 1994. The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol,* 170**,** 974-9; discussion 979-80.

ISACKE, C. M. & HORTON, M. A. 2000. *The adhesion molecule factsbook,* San Diego, Academic Press.

ISHIGAMI, T., UZAWA, K., FUSHIMI, K., SAITO, K., KATO, Y., NAKASHIMA, D., HIGO, M., KOUZU, Y., BUKAWA, H., KAWATA, T., ITO, H. & TANZAWA, H. 2008. Inhibition of ICAM2 induces radiosensitization in oral squamous cell carcinoma cells. *Br J Cancer,* 98**,** 1357-65.

JACOBS, I. J., MENON, U., RYAN, A., GENTRY-MAHARAJ, A., BURNELL, M., KALSI, J. K., AMSO, N. N., APOSTOLIDOU, S., BENJAMIN, E., CRUICKSHANK, D., CRUMP, D. N., DAVIES, S. K., DAWNAY, A., DOBBS, S., FLETCHER, G., FORD, J., GODFREY, K., GUNU, R., HABIB, M., HALLETT, R., HEROD, J., JENKINS, H., KARPINSKYJ, C., LEESON, S., LEWIS, S. J., LISTON, W. R., LOPES, A., MOULD, T., MURDOCH, J., ORAM, D., RABIDEAU, D. J., REYNOLDS, K., SCOTT, I., SEIF, M. W., SHARMA, A., SINGH, N., TAYLOR, J., WARBURTON, F., WIDSCHWENDTER, M., WILLIAMSON, K., WOOLAS, R., FALLOWFIELD, L., MCGUIRE, A. J., CAMPBELL, S., PARMAR, M. & SKATES, S. J. 2015. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*.

JUN, C. D., CARMAN, C. V., REDICK, S. D., SHIMAOKA, M., ERICKSON, H. P. & SPRINGER, T. A. 2001. Ultrastructure and function of dimeric, soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem,* 276**,** 29019-27.

KEHOE, S., HOOK, J., NANKIVELL, M., JAYSON, G. C., KITCHENER, H., LOPES, T., LUESLEY, D., PERREN, T., BANNOO, S., MASCARENHAS, M., DOBBS, S., ESSAPEN, S., TWIGG, J., HEROD, J., MCCLUGGAGE, G., PARMAR, M. & SWART, A. M. 2015. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet,* 386**,** 249-57.

KIKKAWA, Y., MIWA, T., TANIMIZU, N., KADOYA, Y., OGAWA, T., KATAGIRI, F., HOZUMI, K., NOMIZU, M., MIZUGUCHI, T., HIRATA, K. & MITAKA, T. 2014. Soluble Lutheran/basal cell adhesion molecule is detectable in plasma of hepatocellular carcinoma patients and modulates cellular interaction with laminin-511 in vitro. *Exp Cell Res,* 328**,** 197-206.

KIKKAWA, Y., SUDO, R., KON, J., MIZUGUCHI, T., NOMIZU, M., HIRATA, K. & MITAKA, T. 2008. Laminin alpha 5 mediates ectopic adhesion of hepatocellular carcinoma through integrins and/or Lutheran/basal cell adhesion molecule. *Exp Cell Res,* 314**,** 2579-90.

KIM, G., ISON, G., MCKEE, A. E., ZHANG, H., TANG, S., GWISE, T., SRIDHARA, R., LEE, E., TZOU, A., PHILIP, R., CHIU, H. J., RICKS, T. K., PALMBY, T., RUSSELL, A. M., LADOUCEUR, G., PFUMA, E., LI, H., ZHAO, L., LIU, Q., VENUGOPAL, R., IBRAHIM, A. &

PAZDUR, R. 2015. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. *Clin Cancer Res,* 21**,** 4257-61.

KLÖPPEL, G., KREIPE, H., REMMELE, W. & DIETEL, M. 2013. Pathologie: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen, Berlin, Heidelberg, Springer.

KOMMOSS, F., RICHTER, B. & BREITBACH, G.-P. 2001. Borderline-Tumoren des Ovars. *Der Gynäkologe***,** 1003-1012.

KOTTEAS, E. A., BOULAS, P., GKIOZOS, I., TSAGKOULI, S., TSOUKALAS, G. & SYRIGOS, K. N. 2014. The intercellular cell adhesion molecule-1 (icam-1) in lung cancer: implications for disease progression and prognosis. *Anticancer Res,* 34**,** 4665-72.

KREIENBERG, R. 2009. Management des Ovarialkarzinoms: interdisziplinäres Vorgehen ; mit 90 Tabellen, Heidelberg, Springer.

KUPPNER, M. C., VAN MEIR, E., HAMOU, M. F. & DE TRIBOLET, N. 1990. Cytokine regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression on human glioblastoma cells. *Clin Exp Immunol,* 81**,** 142-8.

LACEY, J. V., JR., MINK, P. J., LUBIN, J. H., SHERMAN, M. E., TROISI, R., HARTGE, P., SCHATZKIN, A. & SCHAIRER, C. 2002. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. *Jama,* 288**,** 334-41.

LATINI, F. R., BASTOS, A. U., ARNONI, C. P., MUNIZ, J. G., PERSON, R. M., BALEOTTI, W., JR., BARRETO, J. A., CASTILHO, L. & CERUTTI, J. M. 2013. DARC (Duffy) and BCAM (Lutheran) reduced expression in thyroid cancer. *Blood Cells Mol Dis,* 50**,** 161-5.

LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE & AWMF 2013. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren.

LENGYEL, E. 2010. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol,* 177**,** 1053-64.

LIPPERT, H. & DELLER, T. 2011. Lehrbuch Anatomie: 204 Tabellen, München, Elsevier.

LIU, Z., GUO, B. & LOPEZ, R. D. 2009. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 or ICAM-2 is critical in determining sensitivity of pancreatic cancer cells to cytolysis by human gammadelta-T cells: implications in the design of gammadelta-T-cell-based immunotherapies for pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol,* 24**,** 900-11.

MAATTA, M., BUTZOW, R., LUOSTARINEN, J., PETAJANIEMI, N., PIHLAJANIEMI, T., SALO, S., MIYAZAKI, K., AUTIO-HARMAINEN, H. & VIRTANEN, I. 2005. Differential expression of laminin isoforms in ovarian epithelial carcinomas suggesting different origin and providing tools for differential diagnosis. *J Histochem Cytochem,* 53**,** 1293-300.

MAEDA, K., KANG, S. M., SAWADA, T., NISHIGUCHI, Y., YASHIRO, M., OGAWA, Y., OHIRA, M., ISHIKAWA, T. & HIRAKAWA, Y. S. C. K. 2002. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep,* 9**,** 511-4.

MAHNER, S., BAASCH, C., SCHWARZ, J., HEIN, S., WOLBER, L., JANICKE, F. & MILDE-LANGOSCH, K. 2008. C-Fos expression is a molecular predictor of progression and survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer,* 99**,** 1269-75.

MERRITT, M. A., TZOULAKI, I., VAN DEN BRANDT, P. A., SCHOUTEN, L. J., TSILIDIS, K. K., WEIDERPASS, E., PATEL, C. J., TJONNELAND, A., HANSEN, L., OVERVAD, K., HIS, M., DARTOIS, L., BOUTRON-RUAULT, M. C., FORTNER, R. T., KAAKS, R., ALEKSANDROVA, K., BOEING, H., TRICHOPOULOU, A., LAGIOU, P., BAMIA, C., PALLI, D., KROGH, V., TUMINO, R., RICCERI, F., MATTIELLO, A., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., ONLAND-MORET, N. C., PEETERS, P. H., SKEIE, G., JAREID, M., QUIROS, J. R., OBON-SANTACANA, M., SANCHEZ, M. J., CHAMOSA, S., HUERTA, J. M., BARRICARTE, A., DIAS, J. A., SONESTEDT, E., IDAHL, A., LUNDIN, E., WAREHAM, N. J., KHAW, K. T., TRAVIS, R. C., FERRARI, P., RIBOLI, E. & GUNTER, M. J. 2015. Nutrient-wide association study of 57 foods/nutrients and epithelial ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study and the Netherlands Cohort Study. *Am J Clin Nutr*.

MOORE, K. L., PERSAUD, T. V. N., TORCHIA, M. G. & VIEBAHN, C. 2013. Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik, München, Elsevier.

MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. & JANEWAY, C. 2012. *Janeway's immunobiology,* New York, Garland Science.

NESS, R. B. 2003. Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology. *American journal of obstetrics and gynecology,* 189**,** 280-94.

NIWA, Y., WAKAI, K., SUZUKI, S., TAMAKOSHI, K., LIN, Y., YATSUYA, H., KONDO, T., NISHIO, K., YAMAMOTO, A., TOKUDOME, S., HAMAJIMA, N., TOYOSHIMA, H., TAMAKOSHI, A. & GROUP, J. S. 2005. Cigarette smoking and the risk of ovarian cancer in the Japanese population: findings from the Japanese Collaborate Cohort study. *The journal of obstetrics and gynaecology research,* 31**,** 144-51.

NOLL, S. & SCHAUB-KUHNEN, S. 2000. *Praxis der Immunhistochemie,* München u.a., Urban und Fischer.

OLIVEIRA-FERRER, L., ROSSLER, K., HAUSTEIN, V., SCHRODER, C., WICKLEIN, D., MALTSEVA, D., KHAUSTOVA, N., SAMATOV, T., TONEVITSKY, A., MAHNER, S., JANICKE, F., SCHUMACHER, U. & MILDE-LANGOSCH, K. 2014. c-FOS suppresses ovarian cancer progression by changing adhesion. *Br J Cancer,* 110**,** 753-63.

OMURA, G. A., BRADY, M. F., HOMESLEY, H. D., YORDAN, E., MAJOR, F. J., BUCHSBAUM, H. J. & PARK, R. C. 1991. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol,* 9**,** 1138-50.

OPPENHEIMER-MARKS, N., DAVIS, L. S., BOGUE, D. T., RAMBERG, J. & LIPSKY, P. E. 1991. Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol,* 147**,** 2913-21.

OZA, A. M., COOK, A. D., PFISTERER, J., EMBLETON, A., LEDERMANN, J. A., PUJADE-LAURAINE, E., KRISTENSEN, G., CAREY, M. S., BEALE, P., CERVANTES, A., PARK-SIMON, T. W., RUSTIN, G., JOLY, F., MIRZA, M. R., PLANTE, M., QUINN, M., POVEDA, A., JAYSON, G. C., STARK, D., SWART, A. M., FARRELLY, L., KAPLAN, R., PARMAR, M. K., PERREN, T. J. & INVESTIGATORS, I. T. 2015. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol,* 16**,** 928-36.

PARAMASIVAM, S., TRIPCONY, L., CRANDON, A., QUINN, M., HAMMOND, I., MARSDEN, D., PROIETTO, A., DAVY, M., CARTER, J., NICKLIN, J., PERRIN, L. & OBERMAIR, A. 2005. Prognostic importance of preoperative CA-125 in International Federation of Gynecology and

Obstetrics stage I epithelial ovarian cancer: an Australian multicenter study. *J Clin Oncol,* 23**,** 5938-42.

PARAZZINI, F., LA VECCHIA, C., NEGRI, E. & GENTILE, A. 1989. Menstrual factors and the risk of epithelial ovarian cancer. *J Clin Epidemiol,* 42**,** 443-8.

PETRU, E. 2014. Praxisbuch Gynäkologische Onkologie: mit 113 Tabellen, Berlin u.a., Springer.

PRAT, J. & ONCOLOGY, F. C. O. G. 2014. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet,* 124**,** 1-5.

RAHUEL, C., LE VAN KIM, C., MATTEI, M. G., CARTRON, J. P. & COLIN, Y. 1996. A unique gene encodes spliceoforms of the B-cell adhesion molecule cell surface glycoprotein of epithelial cancer and of the Lutheran blood group glycoprotein. *Blood,* 88**,** 1865-72.

REIGSTAD, M. M., LARSEN, I. K., MYKLEBUST, T. A., ROBSAHM, T. E., OLDEREID, N. B., OMLAND, A. K., VANGEN, S., BRINTON, L. A. & STORENG, R. 2015. Cancer risk among parous women following assisted reproductive technology. *Human reproduction (Oxford, England),* 30**,** 1952-63.

RETTIG, W. J., DRACOPOLI, N. C., GOETZGER, T. A., SPENGLER, B. A., BIEDLER, J. L., OETTGEN, H. F. & OLD, L. J. 1984. Somatic cell genetic analysis of human cell surface antigens: chromosomal assignments and regulation of expression in rodent-human hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 81**,** 6437-41.

RISCH, H. A. & HOWE, G. R. 1995. Pelvic inflammatory disease and the risk of epithelial ovarian cancer. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 4**,** 447-51.

RISCH, H. A., MARRETT, L. D. & HOWE, G. R. 1994. Parity, contraception, infertility, and the risk of epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol,* 140**,** 585-97.

ROBERT-KOCH-INSTITUT & GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V., BERLIN (eds.) 2013. *Krebs in Deutschland 2009/2010,* Berlin.

RODRIGUEZ, G. C., NAGARSHETH, N. P., LEE, K. L., BENTLEY, R. C., WALMER, D. K., CLINE, M., WHITAKER, R. S., ISNER, P., BERCHUCK, A., DODGE, R. K. & HUGHES, C. L. 2002. Progestin-induced apoptosis in the Macaque ovarian epithelium: differential regulation of transforming growth factor-beta. *J Natl Cancer Inst,* 94**,** 50-60.

ROSENBLATT, K. A., THOMAS, D. B. & NOONAN, E. A. 1992. High-dose and low-dose combined oral contraceptives: protection against epithelial ovarian cancer and the length of the protective effect. The WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Eur J Cancer,* 28A**,** 1872-6.

ROSETTE, C., ROTH, R. B., OETH, P., BRAUN, A., KAMMERER, S., EKBLOM, J. & DENISSENKO, M. F. 2005. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis,* 26**,** 943-50.

ROTHLEIN, R., DUSTIN, M. L., MARLIN, S. D. & SPRINGER, T. A. 1986. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol,* 137**,** 1270-4.

SALVADOR, S., GILKS, B., KOBEL, M., HUNTSMAN, D., ROSEN, B. & MILLER, D. 2009. The fallopian tube: primary site of most pelvic high-grade serous carcinomas. *Int J Gynecol Cancer,* 19**,** 58-64.

SCHON, M., KLEIN, C. E., HOGENKAMP, V., KAUFMANN, R., WIENRICH, B. G. & SCHON, M. P. 2000. Basal-cell adhesion molecule (B-CAM) is induced in epithelial skin tumors and inflammatory epidermis, and is expressed at cell-cell and cell-substrate contact sites. *J Invest Dermatol,* 115**,** 1047-53.

SCHRODER, C., WITZEL, I., MULLER, V., KRENKEL, S., WIRTZ, R. M., JANICKE, F., SCHUMACHER, U. & MILDE-LANGOSCH, K. 2011. Prognostic value of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol,* 137**,** 1193-201.

SCHÜNKE, M., SCHULTE, E. & SCHUMACHER, U. 2005. Hals und innere Organe.: 78 Tabellen Prometheus - LernAtlas der Anatomie. 1. Aufl. ed.

SEIDMAN, J. D., SHERMAN, M. E., BELL, K. A., KATABUCHI, H., O'LEARY, T. J. & KURMAN, R. J. 2002. Salpingitis, salpingoliths, and serous tumors of the ovaries: is there a connection? *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists,* 21**,** 101-7.

SHIELD, K., ACKLAND, M. L., AHMED, N. & RICE, G. E. 2009. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol,* 113**,** 143-8.

SIEGENTHALER, W. & AMANN-VESTI, B. R. 2006. *Klinische Pathophysiologie: 239 Tabellen,* Stuttgart u.a., Thieme.

SIEH, W., SALVADOR, S., MCGUIRE, V., WEBER, R. P., TERRY, K. L., ROSSING, M. A., RISCH, H., WU, A. H., WEBB, P. M., MOYSICH, K., DOHERTY, J. A., FELBERG, A., MILLER, D., JORDAN, S. J., AUSTRALIAN CANCER, S., AUSTRALIAN OVARIAN CANCER STUDY, G., GOODMAN, M. T., LURIE, G., CHANG-CLAUDE, J., RUDOLPH, A., KJAER, S. K., JENSEN, A., HOGDALL, E., BANDERA, E. V., OLSON, S. H., KING, M. G., RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, L., KIEMENEY, L. A., MAREES, T., MASSUGER, L. F., VAN ALTENA, A. M., NESS, R. B., CRAMER, D. W., PIKE, M. C., PEARCE, C. L., BERCHUCK, A., SCHILDKRAUT, J. M., WHITTEMORE, A. S. & OVARIAN CANCER ASSOCIATION, C. 2013. Tubal ligation and risk of ovarian cancer subtypes: a pooled analysis of case-control studies. *Int J Epidemiol,* 42**,** 579-89.

SILVERBERG, S. G., BELL, D. A., KURMAN, R. J., SEIDMAN, J. D., PRAT, J., RONNETT, B. M., COPELAND, L., SILVA, E., GORSTEIN, F. & YOUNG, R. H. 2004. Borderline ovarian tumors: key points and workshop summary. *Human pathology,* 35**,** 910-7.

SIRISTATIDIS, C., SERGENTANIS, T. N., KANAVIDIS, P., TRIVELLA, M., SOTIRAKI, M., MAVROMATIS, I., PSALTOPOULOU, T., SKALKIDOU, A. & PETRIDOU, E. T. 2013. Controlled ovarian hyperstimulation for IVF: impact on ovarian, endometrial and cervical cancer--a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update,* 19**,** 105-23.

SPRINGER, T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature,* 346**,** 425-34.

STAUNTON, D. E., DUSTIN, M. L. & SPRINGER, T. A. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature,* 339**,** 61-4.

STEWART, B. W. & INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER 2014. *World cancer report 2014,* Lyon, IARC Press.

TANAKA, H., YASHIRO, M., SUNAMI, T., SAKATE, Y., KOSAKA, K. & HIRAKAWA, K. 2004. ICAM-2 gene therapy for peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma. *Clin Cancer Res,* 10**,** 4885-92.

TAVASSOLI, F. A., DEVILEE, P., INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. & WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2003. *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs,* Lyon, IAPS Press.

THIGPEN, T., BRADY, M. F., OMURA, G. A., CREASMAN, W. T., MCGUIRE, W. P., HOSKINS, W. J. & WILLIAMS, S. 1993. Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer,* 71**,** 606-14.

THOMPSON, P. W., RANDI, A. M. & RIDLEY, A. J. 2002. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells. *J Immunol,* 169**,** 1007-13.

TRABERT, B., WENTZENSEN, N., YANG, H. P., SHERMAN, M. E., HOLLENBECK, A., DANFORTH, K. N., PARK, Y. & BRINTON, L. A. 2012. Ovarian cancer and menopausal hormone therapy in the NIH-AARP diet and health study. *British journal of cancer,* 107**,** 1181-7.

TRIMBOS, B., TIMMERS, P., PECORELLI, S., COENS, C., VEN, K., VAN DER BURG, M. & CASADO, A. 2010. Surgical staging and treatment of early ovarian cancer: long-term analysis from a randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute,* 102**,** 982-7.

TSAI, S. T., WANG, P. J., LIOU, N. J., LIN, P. S., CHEN, C. H. & CHANG, W. C. 2015. ICAM1 Is a Potential Cancer Stem Cell Marker of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One,* 10**,** e0142834.

UDANI, M., ZEN, Q., COTTMAN, M., LEONARD, N., JEFFERSON, S., DAYMONT, C., TRUSKEY, G. & TELEN, M. J. 1998. Basal cell adhesion molecule/lutheran protein. The receptor critical for sickle cell adhesion to laminin. *J Clin Invest,* 101**,** 2550-8.

USAMI, Y., ISHIDA, K., SATO, S., KISHINO, M., KIRYU, M., OGAWA, Y., OKURA, M., FUKUDA, Y. & TOYOSAWA, S. 2013. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion. *Int J Cancer,* 133**,** 568-78.

VAN DALEN, A., FAVIER, J., BURGES, A., HASHOLZNER, U., DE BRUIJN, H. W., DOBLER-GIRDZIUNAITE, D., DOMBI, V. H., FINK, D., GIAI, M., MCGING, P., HARLOZINSKA, A., KAINZ, C., MARKOWSKA, J., MOLINA, R., STURGEON, C., BOWMAN, A. & EINARSSON, R. 2000. Prognostic significance of CA 125 and TPS levels after 3 chemotherapy courses in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol,* 79**,** 444-50.

VAN DE STOLPE, A., CALDENHOVEN, E., RAAIJMAKERS, J. A., VAN DER SAAG, P. T. & KOENDERMAN, L. 1993. Glucocorticoid-mediated repression of intercellular adhesion molecule-1 expression in human monocytic and bronchial epithelial cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol,* 8**,** 340-7.

VAN DE STOLPE, A. & VAN DER SAAG, P. T. 1996. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med (Berl),* 74**,** 13-33.

VAN LEEUWEN, F. E., KLIP, H., MOOIJ, T. M., VAN DE SWALUW, A. M. G., LAMBALK, C. B., KORTMAN, M., LAVEN, J. S. E., JANSEN, C. A. M., HELMERHORST, F. M., COHLEN, B. J., WILLEMSEN, W. N. P., SMEENK, J. M. J., SIMONS, A. H. M., VAN DER VEEN, F., EVERS, J. L. H., VAN DOP, P. A., MACKLON, N. S. & BURGER, C. W. 2011. Risk of border-

line and invasive ovarian tumours after ovarian stimulation for in vitro fertilization in a large Dutch cohort. *Human reproduction (Oxford, England),* 26**,** 3456-65.

VERGOTE, I., TROPE, C. G., AMANT, F., KRISTENSEN, G. B., EHLEN, T., JOHNSON, N., VERHEIJEN, R. H., VAN DER BURG, M. E., LACAVE, A. J., PANICI, P. B., KENTER, G. G., CASADO, A., MENDIOLA, C., COENS, C., VERLEYE, L., STUART, G. C., PECORELLI, S., REED, N. S., EUROPEAN ORGANIZATION FOR, R., TREATMENT OF CANCER-GYNAECOLOGICAL CANCER, G. & GROUP, N. C. T. 2010. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med,* 363**,** 943-53.

VOUTSADAKIS, I. A. 2016. Hormone Receptors in Serous Ovarian Carcinoma: Prognosis, Pathogenesis, and Treatment Considerations. *Clin Med Insights Oncol,* 10**,** 17-25.

WATSON, P. & LYNCH, H. T. 1993. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer,* 71**,** 677-85.

WHITTEMORE, A. S., HARRIS, R. & ITNYRE, J. 1992. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *American journal of epidemiology,* 136**,** 1184-203.

WRIGHT, J. D., HOU, J. Y., BURKE, W. M., TERGAS, A. I., CHEN, L., HU, J. C., ANANTH, C. V., NEUGUT, A. I. & HERSHMAN, D. L. 2016. Utilization and Toxicity of Alternative Delivery Methods of Adjuvant Chemotherapy for Ovarian Cancer. *Obstet Gynecol*.

XIAO, X., CHENG, C. Y. & MRUK, D. D. 2013. Intercellular adhesion molecule-2 is involved in apical ectoplasmic specialization dynamics during spermatogenesis in the rat. *J Endocrinol,* 216**,** 73-86.

YU, K. H., BARRY, C. G., AUSTIN, D., BUSCH, C. M., SANGAR, V., RUSTGI, A. K. & BLAIR, I. A. 2009. Stable isotope dilution multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pancreatic cancer serum biomarker discovery. *J Proteome Res,* 8**,** 1565-76.

ZEN, Q., COTTMAN, M., TRUSKEY, G., FRASER, R. & TELEN, M. J. 1999. Critical factors in basal cell adhesion molecule/lutheran-mediated adhesion to laminin. *J Biol Chem,* 274**,** 728-34.

ZHANG, K. E., GE, S. J., LIN, X. Y., LV, B. B., CAO, Z. X., LI, J. M., XU, J. W. & WANG, Q. X. 2016. Intercellular adhesion molecule 1 is a sensitive and diagnostically useful immunohistochemical marker of papillary thyroid cancer (PTC) and of PTC-like nuclear alterations in Hashimoto's thyroiditis. *Oncol Lett,* 11**,** 1722-1730.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei den nachstehenden Personen bedanken, ohne deren Hilfe die Fertigstellung der Dissertation nicht möglich gewesen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Frau PD Dr. rer. nat. Leticia Oliveira-Ferrer, meiner Doktormutter, für die Bereitstellung des Forschungsthemas und die herzliche Betreuung meiner Arbeit. Ihre unermüdliche Bereitschaft, Fragen zu diskutieren und mir wissenschaftliche Hilfestellungen zu geben, haben einen großen Teil zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Ebenso danke ich Frau Dr. rer. nat. Karin Milde-Langosch für ihre großartige praktische Betreuung und für ihre unzähligen wertvollen Tipps und Hilfestellungen, die mir den Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten enorm erleichtert haben.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Barbara Schmalfeldt für die Bereitstellung der Räumlichkeiten des gynäkologischen Forschungslabors am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Kathrin Eylmann und Maila Rossberg für die tatkräftige Unterstützung im Labor. Bei der Einführung in neue Methoden standen sie mir geduldig zur Seite und durch ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft entstand eine äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. An meine Zeit im Labor denke ich sehr gerne zurück.

Meiner Familie danke ich für ihre immerwährende Unterstützung im Studium sowie in allen anderen Lebenslagen. Ohne euch hätte ich meine Ziele nicht erreichen können.

Tief verbunden und unendlich dankbar bin ich meinem Freund Michael für seinen Rückhalt und seinen unermüdlichen Glauben an mich.

9. Lebenslauf

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

10. Eidesstattliche Erklärung

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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....