

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Pathologie und Neuropathologie
Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie
Und Pathologische Anatomie

**Charakterisierung von Stammzell-ähnlichen
Kompartimenten in serösen Ovarialneoplasien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Fischer, Anna Katharina

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. A. Staebler

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Yazdi

(ggfs. 3. Berichterstatter:)

Tag der Disputation: 05.06.2018

Widmung

Ich widme diese Dissertation einem großartigen Menschen, der sich trotz fehlendem Fachwissen ebenso für diese Arbeit begeistern konnte, wie ich.

Meinem Vater.

Zudem der Frau mit dem mir bekannten größten Charakter, die mit engelsgleicher Geduld, Zuspruch und stillem Vertrauen dieses Projekt begleitet hat.

Meiner Mutter.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
1.1 Epidemiologie.....	4
1.2 Stammzell-Modell.....	5
1.3 Einteilung von Ovarialneoplasien	6
1.4 Borderline Tumoren.....	7
1.5 Entstehungstheorien von high grade serösen Karzinomen	9
1.6 Molekulare Marker.....	10
1.6.1 Allgemeines.....	10
1.6.2 SOX2.....	11
1.6.3 ALDH1.....	12
1.6.4 Ki67	13
1.6.5 Marker: NANOG, Oct-4, Notch-1, CD117, c-myc und Cyclin D1	14
1.7 Ziele dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Kollektiv.....	18
2.2 Erstellung des Tissue Microarrays	19
2.3 Immunhistochemie	20
2.3.1 Immunhistochemie allgemein.....	20
2.3.2 Immunhistochemie für SOX2, ALDH1, Ki67 und andere Marker.....	21
2.3.3 Auswertung der Immunhistochemie	26
2.3.4 Statistische Auswertung	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1 SOX2-Expression in serösen Ovarialtumoren	29
3.2 ALDH1-Expression in serösen Ovarialtumoren	31

3.3 SOX2- und ALDH1-positive Zellen charakterisieren unterschiedliche Zellpopulationen	38
3.4 Expression von ALDH1 und Einfluss auf die Proliferationsrate	44
3.4.1 Korrelation von ALDH1 und Ki67	44
3.4.2 ALDH1 und Ki67 in verschiedenen Zellfraktionen: Stark proliferierende Tumore enthalten ein „langsames“ ALDH1-positives Kompartiment.....	46
3.4.3 ALDH1/Ki67-Koexpression: kein signifikanter Einfluss auf Gesamtüberleben und Rezidiv-freies Überleben	48
4. Diskussion	50
4.1 ALDH1 und SOX2	50
4.2 ALDH1 und Ki67.....	54
4.3 Vergleich der Marker	56
5. Zusammenfassung	58
6. Tabellenverzeichnis	60
7. Abbildungsverzeichnis	61
8. Literaturverzeichnis.....	62
9. Anhang	70
9.1 FIGO-Klassifikation	70
10. Erklärung zum Eigenanteil.....	72
11. Danksagung	73
12. Lebenslauf	74

Abkürzungsverzeichnis

ALDH1	Aldehyd-Dehydrogenase 1
AGO	Arbeitsgemeinschaft Onkologische Gynäkologie e.V.
APST	Atypisch proliferierender seröser Tumor
BOT	Engl.: Borderline Tumor
DNA	Engl.: Desoxyribonucleic acid
EGFR	Engl.: Epidermal growth factor receptor
FGF4	Engl.: Fibroblast growth factor 4
FIGO	Franz.: Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
HGSC	Engl.: High-grade serous carcinoma
HIER	Engl.: Heat induced epitope retrieval
HMG	Engl.: High mobility group
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IPS	Induzierte pluripotente Stammzelle
LAB	Engl.: Labeled avidin biotin
LGSC	Engl.: Low grade serous carcinoma
MPSC	Engl.: Micropapillary serous carcinoma
Notch	Engl.: Notch Pathway
OS	Engl.: Overall survival
RFS	Engl.: Relapse free survival
Shh	Engl.: Sonic hedgehog pathway
SOX2	Engl.: Sex determining region Y – box 2
SRX	Engl.: Sex determining region Y
TMA	Engl.: Tissue micro array
TP53	Tumorsuppressorgen 53
WHO	Engl.: World Health Organization
Wnt	Engl.: Wnt pathway

1 Einleitung

1.1. Epidemiologie

Ovarialkarzinome stellen auch heutzutage noch die gynäkologischen Krebserkrankungen mit der höchsten Morbidität und Mortalität dar. Daher bedarf es stetig neuer Therapieansätze, um an den Schwachstellen der Neoplasien angreifen zu können.

Die Ovarialkarzinome machen insgesamt rund 85% aller malignen humanen Ovarialtumoren aus [1] und stehen mit einer 5-Jahresüberlebenschance von unter 50% an Platz sieben der tödlich verlaufenden Krebserkrankungen bei Frauen weltweit [2].

Es wird angenommen, dass nur ein kleiner Teil der Tumorzellen Stammzeleigenschaften aufweist und eben dieser Pool für das Tumorwachstum, metastatische Progression sowie für das Auftreten von Rezidiven verantwortlich ist [3].

Der Grund, weshalb Ovarialkarzinome an siebter Stelle der mit höchster Morbidität verlaufenden Krebserkrankungen aufgeführt werden, liegt zum einen an der schwierigen Diagnosestellung. Ovarialneoplasien werden in frühen Stadien aufgrund von unspezifischen und meist falsch interpretierten Symptomen oft übersehen und somit erst in späten, höhergradigen Stadien auffällig oder per Zufall entdeckt. Hinzu kommt eine frühe Tumormetastasierung auch kleiner Primärtumoren, insbesondere bei high-grade serösen Karzinomen [4,5].

In diesen Stadien ist eine komplette en-bloc Resektion meist nicht mehr möglich, da intraabdominell andere Organe bereits miteinbezogen oder von Tumor befallen sind, wie z.B. das Peritoneum oder Darmabschnitte, was die vollständige chirurgische Exzision deutlich erschwert oder gar unmöglich macht [6]. Daher bleibt einer der wichtigsten Prognosefaktoren für das Überleben post Ovarialkarzinom die Größe des residualen Tumors nach Resektion. Nach den derzeitigen Leitlinien besteht die Therapie bei Eierstockkrebs aus einer kompletten chirurgischen Sanierung der Tumorherde sowie einer anschließenden Chemotherapie mit Paclitaxel und Platinhaltigen Reagenzien [7].

Risikofaktoren für seröse Ovarialtumoren sind verfrühte Menarche und späte Menopause, wohingegen als protektive Faktoren erhöhte Parität und die Einnahme oraler Kontrazeptiva gilt [2,8,9].

1.2 Stammzell-Modell

Heutzutage kommt auch der Stammzelltheorie immer mehr Bedeutung für die Pathogenese der Ovarialneoplasien zu. Es wird postuliert, dass nur eine kleine Gruppe von Krebszellen für das kontinuierliche Tumorwachstum verantwortlich ist, die Tumorstammzellen [10-14]. Per Definition sind Stammzellen zu Selbsterneuerung, Regeneration und Differenzierung in das volle Spektrum vorhandener Zellen im Stande, was beispielsweise zur Formation eines kompletten und funktionstüchtigen Organismus führen kann [15,16]. Häufig werden Stammzellen in sog. Stammzellnischen vorgefunden, welche durch ihr Mikromilieu die kombinierten Eigenschaften der finalen Stammzell-Multipotenz gewährleisten und ermöglichen [17]. Tumorstammzellen konnten aus diversen Tumorgeweben identifiziert und isoliert werden, wie z.B. des hämatopoietischen Systems oder soliden Tumoren der Mamma, des Ovars, der Lunge, der Prostata, des Kolons, des Gehirns, oder der Kopf-Hals-Region [18-20].

Über die Jahre konnten viele Faktoren, welche die Stammzellnischen aufrechterhalten und zu deren Erhaltung dienen durch genetische und molekulare Analysen identifiziert werden, wie Komponenten des Notch-, Wnt- und Sonic Hedgehog (Shh) Signalwegs. Ferner Pluripotenz-assoziierte Faktoren wie SOX2 oder das entgiftende Enzym des Stoffwechsels ALDH1 [4,16,21,22].

1.3 Einteilung von malignen Ovarialneoplasien

Insgesamt stellen Ovarialneoplasien eine heterogene Gruppe an Tumoren des Genitaltraktes dar, weil sie aus diversen Ursprungszellen hervorgehen. Daher wird von Seiten der WHO eine Unterteilung nach Herkunft vorgenommen:

- a) epitheliale Neoplasien
- b) Keimzelltumoren
- c) Keimstrangstromatumoren
- d) metastatische Sekundärtumoren [23]

Bei den epithelialen Tumoren erfolgt eine Einteilung nach vier wesentlichen histologischen Differenzierungstypen in serös, endometrioid, klarzellig und muzinös. Innerhalb dieser Gruppen werden nach Dignität benigne, borderline und maligne Tumoren unterschieden. Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit den serösen Borderline Tumoren (BOT) im Vergleich mit low-grade und high-grade serösen Ovarialkarzinomen.

Borderline Tumoren entstehen aus benignen Vorläuferläsionen, welche sich dann über die Stufe der BOT zu invasiven Karzinomen entwickeln können, wie z.B. zu low-grade serösen, endometrioiden, klarzelligen oder muzinösen low-grade Tumoren [24]. BOTs weisen Zell- und Gewebeotypen auf, jedoch keinerlei invasives Wachstum.

BOTs zeigen keine Mutation von Tumorsuppressorgen p53 (TP53), sind genetisch relativ stabil und besitzen ein ihnen eigenes für sie charakteristisches Set an Mutationen in Onkogenen wie KRAS oder BRAF.

Auch für die low-grade serösen Ovarialkarzinome, welche sich aus den serösen BOT entwickeln können, ist eine p53-Mutation recht selten [2,25,26] im Gegensatz zu den high-grade serösen Karzinomen.

Ferner wurde über die letzten Jahre eine Einteilung der serösen Ovarialtumoren in Typ I und Typ II Tumoren favorisiert. Typ I Neoplasien entwickeln sich aus Borderline Tumoren zu Karzinomen, mit Differenzierung in low-grade serös, endometrioid, klarzellig und muzinös. Zu den Typ II Tumoren zählen vor allem aggressive, schnell wachsende Tumoren wie die high-grade serösen Karzinome und maligne Müllersche

Mischtumore, auch Karzinosarkome genannt [24,27-29]. Derzeit liegen Studienergebnisse vor welche zeigen, dass sich high-grade seröse Ovarialkarzinome aus Vorläuferläsionen in der Tube entwickeln, den serösen tubaren intraepithelialen Karzinomen (STIC), welche einen Verlust von ALDH und Mutationen in p53 aufweisen [30,31]. Die high-grade serösen Ovarialkarzinome gehören zu den am häufigsten auftretenden Eierstockkrebsarten und sind charakterisiert durch hohe Raten an p53-Mutationen von über 80% in high-grade serösen Tumoren, eine Vielzahl von genetischen Aberrationen, sowie aggressives Wachstum und die Neigung zu Metastasierung [25,26]. Hinsichtlich des Expressionsmusters von Stammzellmarkern wurde bislang noch keine Untersuchung zur Einteilung und Klassifizierung zwischen Typ I und II Tumoren vorgenommen. Gerade hinsichtlich eines „Profiling“ von Stammzellmarkern in serösen Borderline Tumoren oder auch atypischen proliferativen serösen Tumoren (SBOT/APST) und low-grade serösen Karzinomen (LGSC) im Vergleich zu high-grade serösen Karzinomen (HGSC) sind bislang keine Daten vorhanden.

1.4 Borderline Tumoren und nicht invasive low-grade seröse Karzinome

Die „Borderline“ Kategorie der epithelialen Ovarialtumoren wurde in den frühen 1970er Jahren eingeführt, um eine Gruppe von Tumoren zu beschreiben, welche keinerlei invasives Wachstum zeigen, jedoch zytologische Atypien erkennen lassen und in einer Minderheit der Patientinnen eine Progression in ein Karzinom aufweisen. In den letzten drei Dekaden wurde den Borderline Tumoren (BOTs) mehr Beachtung geschenkt und sie wurden als eigene Entität akzeptiert. Aktuelle Studien zeigen eine weitere Aufteilung dieser Tumoren in prognostisch unterschiedliche Gruppen. Am einen Ende des Spektrums stehen die atypischen proliferativen serösen Tumoren (APST). Diese sind charakterisiert durch eine papilläre Architektur mit einem hierarchisch verästelten Muster. Tumoren am anderen Ende des Spektrums sind weiterhin nicht-invasiv, aber ähneln den low-grade serösen Karzinomen, zeigen einen komplexen nicht-hierarchisch-strukturierten Aufbau mit feinen Mikropapillen die sog. mikropapilläre Variante eines serösen Borderline Tumors oder auch das nicht-invasive (mikropapilläre) low-grade seröse Karzinom (MPSC). Diese beiden Gruppen von Tumoren, APST und MPSC, bilden zusammen die Gruppe der serösen

Borderline Tumoren und somit mehrere Zwischenstufen bei der Entwicklung vom benignen Zystadenom zum low-grade serösen Karzinom [2].

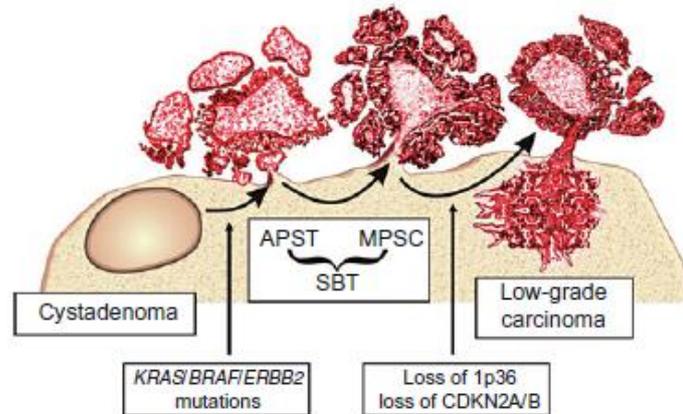


Abb.1: Schema der Pathogenese von low-grade (mikropapillären) serösen Karzinomen. (Blaustein S.725)

Grundsätzlich zeigen Patientinnen mit APSTs ein sehr gutes Überleben von ca. 96-100% [8,9,32,33], auch wenn Mikroinvasionen oder mikroinvasive Karzinome bei den Patientinnen gefunden wurden.

Bezogen auf den Ursprung der Neoplasien gibt es verschiedene Theorien, welche noch nicht gänzlich geklärt sind. So wird z.B. vermutet, dass Zellen mit tubarem Ursprung bei ovariellen Oberflächenläsionen wie beispielsweise dem Eisprung in die Ovarien verschleppt werden. Ferner wird angenommen, dass im Zusammenhang mit der während der reproduktiven Phase immer wieder auftretenden Traumatisierung des ovariellen Oberflächenepithels im Zuge von Eisprüngen dieses zur vermehrten Proliferation stimuliert wird und so ein Milieu zur potentiellen malignen Transformation von Epithelzellen entsteht [2]. Diese Theorie wird unterstützt durch Studienergebnisse, welche zeigen, dass eine Verhinderung des Eisprungs durch orale Kontrazeptiva protektiv wirkt.

Weniger favorisiert wird die Theorie der erhöhten Gonadotropinspiegel im peripheren Blut. Hierbei wird angenommen, dass die Gonadotropine den Östrogenspiegel beeinflussen und so zu einer primären Regulationsstörung der Ovarien führen. Auf der anderen Seite könnten auch wiederholte Entzündungen hervorgerufen durch z.B. Oberflächenepitheldefekte nach Ovulation, Salpingitiden ausgelöst durch retrograde Menstruation oder die Einführung von Fremdmaterial intravaginal oder bis intrauterin zur Krebsentstehung beitragen [34,35]. Zuspruch zur Theorie des proinflammatorischen Mikromilieus bei der Endometriose findet hier durch die sog.

Type I Tumoren statt. High-grade seröse Karzinome sind in 53% der Fälle mit chronischer Salpingitis assoziiert [37]. Man findet bei einem Teil der Patientinnen nicht invasive Vorstufen in der Tube, die sogenannten serösen tubaren intraepithelialen Karzinome (STIC).

Zudem kommen Borderline Tumoren der Ovarien auch wieder als Metastasen ebenso in der Tube vor [38].

Trotz großer Fortschritte in der Entwicklung von chirurgischer und systemischer Therapie des Ovarialkarzinoms stirbt immer noch die Mehrheit der Patientinnen an den Folgen ebendieser Krankheit, nämlich nahezu 75% [39].

Primäre Resistenzen gegen die Chemotherapie sowie Rezidive der Krebserkrankung sind die Hauptursachen. Es wird angenommen, dass Tumorstammzellen und die Reexpression von Stammzellfaktoren in beiden zuvor erwähnten Prozessen eine Rolle spielen.

1.5 Entstehungstheorien von high-grade serösen Karzinomen

Aufgrund der Heterogenität der Tumore, welche an verschiedenen Orten im Genitaltrakt entstehen können (genauer Ovar, Tube, Peritoneum, Endometrium), ergeben sich verschiedene Theorien zur Entstehung eben dieser.

Ansatzpunkte sind z.B. die Entstehung aus:

- a) Ovarialmesothel, welches eine Inklusionszyste bildet und Zelltypen hervorbringt [40]
- b) Residuale Zellen, aus der Entwicklung des sekundären Müller'schen Epithels [40]
- c) Tubengewebe, Fimbrien-besetzter Teil der Tube, welcher Zellen ins Ovar streut [41-44]

Aufgrund der durch Hormone regulierten ständigen Traumatisierung des ovariellen Oberflächenepithels durch den Eisprung, so angenommen, wird ein Milieu erzeugt, welches Proliferation stimuliert und somit zu maligner Transformation angeregt [2].

Bezogen auf die Inklusionszysten, die im Ovar entstehen, wird angenommen, dass sich Zellen aus der Fimbrienregion der Tube in den durch z.B. den Eisprung traumatisierten Eierstock einstreuen und dort ebendiese Zysten ausbilden. Daraus werden potentielle Krebszellen entwickelt, womit wieder der Ursprung aus Oberflächenepithel der Tube möglich wäre [45-48].

Die letzte Hypothese wird von diversen neuen Studien für sehr wahrscheinlich gehalten und in jüngster Zeit wird dieser Ansatz weiterverfolgt und zu bestätigen versucht [43,44,49,50].

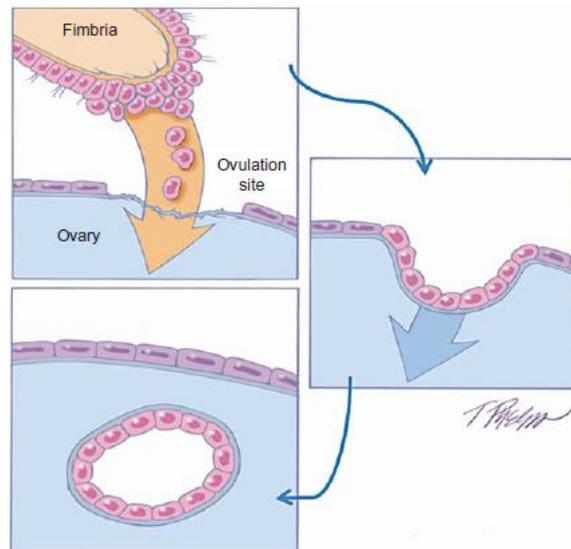


Abb.2: Schema des angenommenen Mechanismus der Herkunft der ovariellen Oberflächeninklusionen von Fimbrienepithel. Epitheliale Zellen vom Fimbrientrichter implantiert am ovariellen Oberflächenepithel an rupturierten Stellen wo es zur Ovulation gekommen ist. Diese Epithelzellen können einwandern, und kortikale Inklusionszysten formen. (Blaustein S.687)

1.6 Molekulare Marker

1.6.1 Allgemeines

Ein weiterer Punkt in der Entstehung der Ovarialkarzinome sind die genetischen Veränderungen, welche sich entweder in Zugewinn oder Abgang von Erbinformation widerspiegeln. Chromosomenanalysen ergaben vor allem hinzugewonnenes Genmaterial auf den Chromosomen 3q, 8q, 19q und 20q [49,50]. Diese Genloci kodieren unter anderem Faktoren, welche zur Ausprägung des embryonalen Stammzellphänotyps beitragen [18]. Diese Faktoren sind beispielsweise SOX2, ein Transkriptionsfaktor auf Chromosomenabschnitt 3q26, c-myc auf 8q oder auch

Notch3 auf 19q. Gerade was die Unterscheidung zwischen low-grade und high-grade serösen Ovarialkarzinomen angeht, konnte gezeigt werden, dass bei den hochgradig malignen serösen Ovarialtumoren SOX2 deutlich amplifiziert vorliegt [50]. Auch bei anderen Karzinomen konnte eine Genamplifikation an dieser Stelle nachgewiesen werden, wie z.B. beim pulmonalen Plattenepithel- oder Adenokarzinom [51,52], in soliden Tumoren der Magendarmschleimhaut [53] sowie in Brustkrebs [54].

Bezogen auf die low-grade serösen Ovarialkarzinome wurde bereits herausgefunden, dass es vermehrt zu einer allelischen Deletion von 1q36 und 9p21 kommt, was auch bei serösen BOTs untersucht aber noch nicht bestätigt werden konnte. Besonders 1q36 kodiert für eine Region, welche diverse Tumorsuppressorgene enthält, beinhaltend miR-34a, welche eine p53-regulierte micro-RNA hervorbringt, die den p53-Effekt auf Wachstumshemmung und Apoptose imitiert. 9p21 hingegen enthält den CDKN2A Lokus, welcher p16, p15 und p14 kodiert [55,56].

Bei den high-grade serösen Ovarialkarzinomen konnte bereits durch eine Vielzahl von Genanalysen ein mutiertes p53-Gen festgestellt werden. Lateio und Kollegen fanden eine p53-Überexpression und Mutation des TP53, welche zumeist eine Punktmutation darstellt [2], in über 50% der Fälle von frühen Entstehungsformen der serösen Karzinome, was Grund zur Annahme gibt, dass es sich hierbei um einen früh stattfindenden Prozess bei der Entstehung der high-grade serösen Ovarialkarzinome handelt [57]. Andere Untersuchungen zeigten nach Analyse von TP53-Mutationen bei gleichzeitig bestehendem intraepithelalem Karzinom der Tube und bestehendem Ovarialtumor, dass hier die gleichen Aberrationen des p53-Gens vorliegen, was die Rolle eben dieses Gens in der Tumorentstehung noch bestärkt [58]. Andere Mutationen wie BRCA1/2, PTEN und PIK3CA wurden zwar beschrieben, zeigen jedoch eine wesentlich niedrigere Mutationsrate (<10%) [59-61].

1.6.2 SOX2

Bei SOX2 handelt es sich um ein Mitglied aus der Familie der SOX-Proteine. „SOX“ steht für „SRY Box“, eine Geschlechts-bestimmende Region auf dem Y-Chromosom (engl.: sex determining region on Y). Diese Region gehört zur Klasse der

Transkriptionsfaktoren, welche über eine HMG (engl.: high-mobility-group) Domäne verfügen, über die eine DNA-Bindung vermittelt wird [62]. Die Wirkungsweise von SOX-Proteinen besteht in der Bindung innerhalb der kleinen Furche der DNA, wodurch neben Interaktion mit anderen DNA-nah bindenden Faktoren auch Verformung und Verbiegung der DNA erreicht werden kann. Aufgrund dessen wird dieser Proteingruppe eine wichtige architektonische Rolle zugeschrieben, vor allem in Hinsicht auf die Bildung von biologisch wirksamen Multiproteinkomplexen [63,64]. SOX-Proteine sollen vor allen Dingen einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Organogenese und der Bestimmung von Zelltod, -erhaltung und -erneuerung haben [65]. Vor allem für die frühe Embryogenese sind SOX-Proteine von enormer Wichtigkeit, wie in vivo-Experimente an Mäusen zeigen [66].

SOX2 hilft humanen embryonalen Stammzellen ihr Differenzierungspotential beizubehalten, und ist neben NANOG und Oct3/4 fähig, adulte Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen (IPS) umzuwandeln. SOX2 und der Transkriptionsfaktor Oct3/4 beeinflussen die Regulation weiterer Proteine und Faktoren in der frühen Embryogenese, wie unter anderem FGF4 (fibroblast growth factor 4) und Osteopontin [65,67]. Das SOX2 Gen liegt in der chromosomalen Region 3q26, welche häufig bei Ovarialkarzinomen amplifiziert ist.

In den Keimzellen der frühen embryonalen Gonaden bis hin zur abgeschlossenen Entwicklung des Hoden und der Eierstöcke lässt sich SOX2 nicht finden [68]. In normalem Eierstockepithel, normalen Tubenepithel sowie in serösen oder muzinösen Läsionen konnte es jedoch detektiert werden [69,70].

1.6.3 ALDH1

ALDH1 als entgiftendes Enzym, welches die Oxidation von Aldehyd bewirkt, zeigt besonders hohe Aktivität in Zellpopulationen mit Stammzell- oder Progenitoreigenschaften, wie der Prostata, mesenchymalem Gewebe, hämatopoietischen, neuralen und mammären Zellen. Außerdem wurden erhöhte ALDH1-Werte in Zellen kolorektaler Karzinome gefunden [71,72], wo eben diese Zellen bei der Tumorentstehung eine erhebliche Rolle spielen sollen. Besonders in Hinblick auf Selbsterneuerung und Stressresistenz-Eigenschaften wird ALDH1 eine

besondere Bedeutung zugeschrieben [15,73]. Daher rührt die Vermutung, dass eine erhöhte Aktivität von ALDH1 als potentieller Marker für Tumor Stammzellen herangezogen werden kann [74,75] und möglicherweise Chemotherapieresistenz bewirkt [76]. Studien, die sich mit der Expression von ALDH1 in serösen Ovarialkarzinomen beschäftigten, fanden stark ALDH1-positive Tumoren in Mäusen, wobei jedoch die Anzahl der Tumor-initiiierenden Zellen in der Tumormasse relativ gering war [77]. Dies führt zu der Annahme, dass zusätzliche Faktoren in die Regulation und Expression von möglichen Progenitorzellen involviert sind. Eine weitere Hypothese wäre, dass eine Koexpression oder Koaktivierung von ALDH1 zusammen mit anderen Faktoren nötig ist, um die Aggressivität eines Tumors zu erhöhen.

Bareiss et al. (2012) fanden heraus, dass ALDH1-exprimierende Tumoren in Mäusen schneller proliferieren (*in vivo*) (persönliche Mitteilung, bisher nicht publizierte Daten). Die Frage, die sich uns stellte war nun, ob es auch die gleichen Zellen innerhalb eines Tumors sind, welche ALDH1-Positivität und erhöhte Proliferationsaktivität zeigen?

Bei Patientinnen mit Brustkrebs in 577 Fällen konnten hohe Ausprägungen von ALDH1 mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden. Die ALDH1-positiven Zellen stellen eine Zellfraktion dar, welche zu Selbsterneuerung und Tumorstadium fähig ist und die Heterogenität des Primärtumors wiedergeben können [78].

Im Hinblick auf Ovarialkarzinome gibt es zu Überlebensdaten verschiedene Ergebnisse, welche allesamt kontrovers diskutiert werden, sodass bislang noch nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob ALDH1-Expression mit einer besseren oder schlechteren Überlebensprognose assoziiert ist [73,79-81].

1.6.4 Ki67

Das Ki67-Antigen wird normalerweise in allen aktiven Phasen des Zellzyklus nukleär exprimiert (G1, S, G2 und M-Phase) [82,83] ist jedoch abwesend während der G0-Phase sprich der sog. „Ruhephase“, und soll auch während der DNA-

Reparaturprozesse nicht nachweisbar sein. Insgesamt handelt es sich hierbei um einen Marker zur indirekten Bestimmung der Proliferationsaktivität eines Gewebes.

1.6.5 Marker: NANOG, Oct-4, Notch1, CD117, c-myc und CyclinD1

NANOG gehört zur "homeobox"Gruppe, welche DNA-bindende Proteine sind, die hauptsächlich in undifferenzierten embryonalen Stammzellen hoch exprimiert vorkommen [84-86].

Oct4 ist einer der Transkriptionsfaktoren welcher, wie bereits erwähnt, in undifferenzierten embryonalen Stamm- und Keimzellen exprimiert wird und für die Beibehaltung eben dieser Pluripotenz essentiell ist [87-89], da eine down-Regulation von Oct4 einen Trigger zur Zelldifferenzierung darstellt.

Notch1 gehört zu einer Gruppe großer Transmembranrezeptoren (Notch-Rezeptoren), welche in Zell-zu-Zell-Interaktionen involviert sind und eine wichtige Rolle bei der Bestimmung von Zellschicksalen spielen. Modifikationen des Notch-betreffenden Entwicklungspfad es bei Zellen können Proliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflussen [90]. Notch wird durch Bindung an Membran-gebundene Liganden der Delta- und Serrate/Jagged-Familie aktiviert. Der aktivierte Notch-Rezeptor wird proteolytisch gespalten und die Notch-Intrazellulardomäne (NICD) wird freigesetzt. Diese bindet an das CSL-DNA-bindende Protein und den Mastermind/Lag-3 Co-Aktivator im Zellkern und aktiviert dadurch die Expression der Zielgene [91,92]. Die Unterdrückung der Notch-Expression wurde häufiger bei Karzinomen beobachtet [93]. In Säugern wurden bislang vier Typen der Notch-Rezeptoren beschrieben (Notch-1,2,3,4), wobei für aktiviertes Notch-1 eine Verbindung zu p53-abhängiger Transaktivierung gezogen werden konnte, bei der die Notch-1-Expression die Phosphorylierung des p53-Proteins hemmt [94].

CD 117 (oder auch CD79 α) gehört zu einer Immunglobulin-Superfamilie und ist über Disulfidbrücken transmembranär verankert. Das Heterodimer CD79 α ist über nicht-kovalente Bindungen an Oberflächen-Igs gebunden und bildet einen Teil des B-Zell-Rezeptor-Komplexes, welcher für die Antigen-Erkennung essentiell ist. Zudem übernimmt CD79 Funktionen bezüglich der Transmission von Signalen intrazellulär in

das Zytoplasma hinein, welche wiederum bei der Antigen-Bindung an Oberflächen-Immunglobuline wichtig sind. Der zytoplasmatische Anteil von CD79 enthält viele Kinasen. Signale zur Phosphorylierung laufen über diese Kinasen und resultieren in B-Zell-Aktivierung, -differenzierung und in manchen Fällen auch –Apoptose. In Vorläufer-B-Zellen werden CD79-Protein-Ketten bereits im Zytoplasma gebildet (CyCD79). Oberflächen-Expression des Proteins findet erst im Pro-B-Zell-Stadium statt und dauert bis hin zur B-Zell-Differenzierung. CD 117 wird vor allem in der folliculären Mantelzone exprimiert und weniger in B-Zellen der Keimzentren, was darauf hindeutet, dass eine Aktivierung der reifen B-Zellen zu einer Herunterregulierung der CD79-Proteine führt [95,96].

C-myc, welches neben N-myc oder L-myc zur Gruppe Onkogen-kodierten Proteine gehört, spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, -differenzierung und bei der Entstehung von Neoplasien. C-myc ist ein Transkriptionsfaktor und scheint in die Aktivierung der Transkription von Wachstums-fördernden Genen involviert zu sein. C-myc bindet während des Transkriptionsprozesses als heterodimerer Komplex an die DNA und liegt in vivo phosphoryliert aktiv vor [97-99].

Des Weiteren interagieren ebendiese Stammzelloktoren auch mit Proliferationsmarkern innerhalb der Zelle und regulieren möglicherweise den Zellzyklus in eine Richtung, welche die Tumorbilologie beeinflusst. Gerade hierzu wurden zusätzlich die Proliferationsmarker Ki67 und CyclinD1 mit untersucht und auf potentielle Korrelationen beobachtet.

CyclinD1 gehört zu einer Proteinfamilie, bei der die primäre Funktion darin besteht, die Aktivität der Cyclin-abhängigen Protein-Kinasen in der G-Phase des Zellzyklus zu regulieren. CyclinD1, welches auch als PRAD-1 oder bcl-1 bezeichnet wird, hat seine maximale Expression in der mittleren bis späten G1-Phase. Es befindet sich als Gen auf der Position 11q13 und liegt in einer Vielzahl von Neoplasien amplifiziert vor, wie z.B. einer Gruppe von Mamma-Karzinomen oder Harnblasentumoren, sowie bei ca. 70% der Mantelzell-Lymphome, weswegen eben dieses Lymphom als Positivkontrolle bei den Färbeprozessen mitlief [100,101].

1.7 Ziele dieser Arbeit

Aufgrund der immer noch schlechten 5-Jahres-Prognose nach Diagnose von Eierstockkrebs, ist es von enormer Wichtigkeit, weitere Angriffspunkte in der Biologie der Krebszellen zu finden. Tumorstammzellen und die Reexpression von Stammzellfaktoren spielen eine entscheidende Rolle, wenn Ovarialkarzinome chemotherapieresistent werden oder rezidivieren. Die Expression von Notch3, SOX-2 und anderen Stammzellfaktoren wurde bereits in vielen soliden Tumoren beschrieben, wie dem Adenokarzinom der Lunge, Plattenepithelkarzinomen und auch in Ovarialkarzinomen [51-54,102].

Wir wollen als eine der ersten Arbeitsgruppen die Expression von Stammzellfaktoren in Borderline Tumoren im Vergleich zu low-grade und high grade serösen Ovarialkarzinomen, mögliche Korrelationen und molekularbiologische Parameter untersuchen.

Zur Rolle von SOX2 in der Pathogenese der Ovarialtumoren ist bisher nur wenig bekannt. Vorausgehende Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten eine vermehrte Expression und Genamplifikation von SOX2 bei einem Teil der Ovarialkarzinome. Hinzu kommen in vivo Studien an Mäusen, die eine vermehrte Expression von ALDH1 in serösen Ovarialkarzinomen mit erhöhter Proliferationsaktivität zeigten. Auf molekularer Ebene ist nicht nur ein Faktor für Tumorentstehung und Tumortyp verantwortlich. Eine Vielzahl von Stammzellfaktoren, die auch in Zusammenhang mit anderen Tumoren beschrieben wurden, gibt Grund zur Annahme, dass eben diese Transkriptions- und Proliferationsfaktoren möglicherweise interagieren, korrelieren und so ein charakteristisches Ausprägungsmuster für die unterschiedlichen Tumoren aufzeigen.

Wir wollten untersuchen, ob sich Ovarialtumoren anhand ihres Expressionsprofils unterscheiden und ob die zu identifizierenden Subpopulationen der Stammzellmarker mit klinischen Parametern oder der Prognose der Patientin korrelieren. Dazu verfolgten wir in dieser Arbeit im Wesentlichen drei Ansätze:

1. Eine vergleichende Analyse von SOX-2, Nanog, Oct-4 und ALDH1 wurde anhand einer großen Reihe von high-grade serösen Ovarialkarzinomen im Vergleich zu low-grade Karzinomen und Borderline Tumoren durchgeführt.

2. Korrelationen in Bezug auf die Tumorbiologie, Proliferationsrate sowie auch das klinische Outcome wurden für einzelne Marker analysiert.
3. Doppelfärbungen von Stammzellmarkern und Proliferationsmarkern sollten zeigen, ob individuelle Expressionsmuster und die Koexpression von Stammzellmarkern spezielle pathogenetische und klinisch relevante Subpopulationen von Tumorzellen charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1 Kollektiv

Es wurden zunächst zwei Datenbanken erstellt, eine bezogen auf low-grade und high-grade Ovarialkarzinome und eine, die vornehmlich Patientinnen mit Borderline Tumoren (BOT) enthält. Die erstgenannte führt 230 Patientinnen, bei denen die Diagnose eines Ovarialkarzinoms gestellt wurde und die daraufhin an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen behandelt wurden. Der Zeitraum der Behandlung erstreckt sich hier über die Jahre von 2000 bis 2008. Alle betroffenen Frauen unterzogen sich einer chirurgischen Behandlung und erhielten eine adjuvante Platin-enthaltende Chemotherapie, basierend auf den aktuell deutschen Leitlinien (www.ago-online.de). Die Verlaufsdaten der Patientinnen wurden in Folge von der Patientenregistrierung des Tübinger Krebszentrums erfasst. Dieses Kollektiv entspricht dem, welches Fr. D. Pham bis 2011 erstellt hatte, um die Expression des SOX2 Markers zu untersuchen, wobei hieraus in unserer Studie je nach Färbedurchgang bis maximal 161 seröse Ovarialkarzinom-Fälle gewertet werden konnten.

Bei dem Kollektiv der Borderline-Tumoren handelt es sich um 37 Patientinnen, wovon zum Teil nur 33 Patientenproben technisch verwertbar waren, deren Therapie und Behandlung nach Diagnosestellung im Zeitraum von 2000 bis 2008 ebenfalls an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen durchgeführt wurde.

Zur Datenbank addiert wurden zudem sieben Fälle von low-grade Karzinomen (davon 6 auswertbar) und 12 zusätzliche Paraffingewebeproben von Tumoren mit parallel asserviertem Frischgewebe in der Tumorbank aus den Jahren 2008 bis 2009 (2 low-grade und zehn high-grade seröse Karzinome, alle auswertbar).

Das finale Kollektiv fasste somit insgesamt je nach Färbevorgang verwertbare Proben von maximal 206 Patientinnen (161 HGSC, 8 LGSC, 37 APST) (Abb.3).

Alle histologischen Schnitte stammen aus dem Archiv des pathologischen Instituts der Universität Tübingen und wurden von einer Pathologin mit spezieller Ausbildung im Bereich der Gynäkopathologie (A.S.) erneut geprüft. Für jede Patientin wurden histologischer Typ und Grad des jeweiligen Tumors erfasst.

2.2 Erstellung der Tissue Microarrays

4µm dicke Schnitte wurden aus den Formalin-fixierten, in Paraffin gebetteten Gewebeblöcken der Ovarialtumoren gewonnen und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Diese wurden auf Areale mit mehr als 60% Tumor untersucht. Aus dem korrespondierenden Gewebeareal des zugehörigen Paraffinblocks wurden 0,6mm durchmessende Stanzen gewonnen. Diese wurden mit einem semiautomatischen tissue microarray Instrument (Beecher Instruments Sun Prairie, WI, USA) in einen Paraffinblock mit bis zu 360 vorgefertigten Stanzlöchern eingeführt. Somit ist es möglich bis zu 360 Proben parallel in einem Paraffinblock zu untersuchen (Abb.4).



Abb.3: Auswahl der zu stanzenen Tumorblöcke.

Jeder Fall wird mit sechs Stanzen repräsentiert; bei bilateralen Ovarialtumoren je drei aus dem rechten Ovar und drei aus dem linken. Bestand der Tumor nur unilateral, so mussten alle sechs Stanzen aus separaten Stellen des Tumors einer Seite gewonnen werden. Anschließend wurde aus den TMAs wieder 4µm dicke Schnitte produziert und auf superfrost-Objekträger aufgezogen.

Als Kontrollen wurden zusätzlich Stanzen aus normalen Tuben- und Ovarialgeweben entnommen und ebenfalls mit oben genannter Technik in den TMA eingefügt, sodass eine interne Kontrolle auf allen TMAs mitlaufen konnte. Als Platzhalterstanzen, für den Fall, dass aus einem Paraffinblock keine qualitativ guten Stanzen gewonnen werden konnten, verwendete die medizinisch technische Assistentin Nierengewebe als Platzhalter.

Bei jeder immunhistochemischen Färbung lief immer noch ein Gewebeganzschnitt einer Positivkontrolle mit.

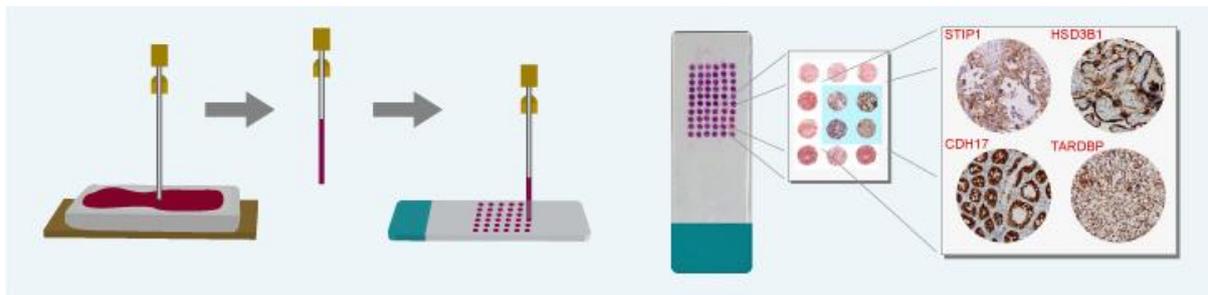


Abb.4: Entstehung eines TMA mit anschließender immunhistochemischer Färbung. (www.abnova.com)

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Immunhistochemie allgemein

Bei der immunhistochemischen Färbung gilt das Prinzip der Antikörper-Antigen-Reaktion, bei der der spezifische Antikörper aus dem Reagenz an das darzustellende Protein bindet. In dieser Arbeit wurde die labeled avidin-biotin(LAB)-Technik angewandt.

Zunächst bindet ein spezifischer hochaffiner Primärantikörper an das gesuchte Protein. Gefolgt wird diese Reaktion von der Kopplung eines biotinylierten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper. Nun wird Avidin hinzugegeben, welches durch Beimischung von Peroxidase markiert wurde, und bindet an das Biotin am Sekundärantikörper. Im weiteren Verlauf wird ein H₂O₂-Chromogen-Komplex hinzugegeben, welcher nach Spaltung durch die Peroxidase im Reaktionsgemisch H₂O und Sauerstoff freisetzt. Durch die Oxidation wird das Chromogen aktiviert und lagert sich als brauner Farbstoff am gesamten Komplex ab. Hierdurch wird das gesuchte Antigen sichtbar [103].

Bei dem Chromogen, welches hier verwendet wurde, handelt es sich um Diaminobenzidin (DAB).

Zur Durchführung der Färbungen wurde mit dem vollautomatischen Immunfärbungssystem Ventana Discovery gearbeitet, welche auch die Reagenzien herstellte (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA).

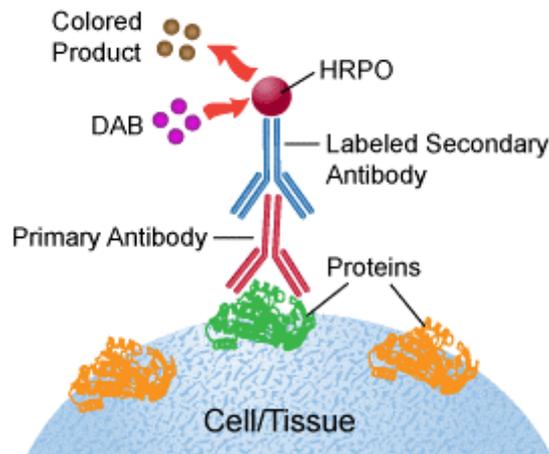


Abb.5: Molekulare Funktionsweise der immunhistochemischen Färbung. (Zitat der Abbildung)

2.3.2 Immunhistochemie für SOX-2, Ki67, ALDH1 und andere Marker

Die immunhistochemische Aufarbeitung erfolgte mittels des von Ventana Discovery entwickelten automatisierten Immunostaining System, welches Ventana Reagenzien verwendet (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA). Zuerst wurden die Schnitte auf superfrost Objektträgern mit anorganischem Puffer entparaffinisiert. Die Vorbehandlung für die Ki67-Färbung bestand in einem EDTA-basiertem Puffer mit pH 8,4 und Hitze-induzierter Epitop-Gewinnung (heat induced epitope retrieval = HIER), noch bevor der primäre Antikörper aufgetragen wurde (monoklonales Maus-anti-human Ki67-Antigen, Klon MIB-1, M7240, DakoCytomation Dänemark, Verdünnung 1:200 Antikörper-Diluent von Zytomed Systems). Die Inkubationszeit betrug 32 Minuten. Für Ki67 schloss sich die Behandlung mit einem biotinylierten Detection-kit an, beinhaltend eine Behandlung Diaminobenzidin und Meerrettich-Peroxidase (HRP) gefolgt (DAB Map Kit Ventana). Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxilin und „Blueing“Reagenz gegengefärbt (Roche 760-2021), gewaschen und dehydratisiert mittels aufsteigender Alkoholserie (40%, 70%, 96%). Schließlich wurden die Schnitte mit Cytoseal gedeckt.

Die Vorbehandlung für Gewebe, welches mit ALDH1 und SOX-2 gefärbt werden sollte, ähnelt der für Ki67, jedoch folgte den ersten Schritten ein endogener Biotin-Block, bevor der Primärantikörper aufgetragen und jeweils für 32 Minuten inkubiert wurde (ALDH1a1 Hasen monoklonaler Antikörper, EP3319Y, Epitomics, 1:100 Verdünnung von Zytomed Systems) und (monoklonales Hasen-anti-human SOX2-

Antigen, SP76, Cell Marque, 1:100, Diluent von Zytomed Systems). Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit einem Biotin-freien Detection-kit, beinhaltend Diaminobenzidin und HRP (ultraView Universal DAB Detection kit, Roche). Und schließlich bestand die Nachbehandlung in einer Gegenfärbung mit Hämatoxilin und „Blueing“Reagenz, sowie der Wäsche und Dehydratisierung in einem aufsteigenden Alkoholbad (40%, 70%, 96%) und Schnitt-Deckung mit Cytoseal.

Die Doppelfärbung für ALDH1/Ki67 wurde wie folgt absolviert: Vorbehandlung bereits erwähnt, anschließend Auftragen des Primärantikörpers (MIB-1/ALDH1, Epitomics, Mib1 Verdünnung 1:100, Anti-ALDH1 Verdünnung 1:100, Zytomed Systems), Inkubationszeit von je 32 Minuten gefolgt von einem UV-Rot Verstärkersubstanz, welche ALDH1-positive Zellen rot markiert (ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection kit, Roche - Biotin-frei) und anschließender Aufarbeitung mittel Biotin-freiem Diaminobenzindin- und HRP-enthaltendem Detection-kit (ultraView Universal DAB Detection kit). Folgende Schritte wurden bereits mehrfach erwähnt und beinhalteten Gegenfärbung mit Hämatoxilin und Blueing Reagenz, Wäsche sowie Deckung der Schnitte mit Cytoseal.

Eine Auflistung aller angewandten Antikörper und Protokolle findet sich in Tabelle 1.

<u>Marker</u>	<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Instrument</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Verdünnungsreaktion</u>	<u>Puffer, pH</u>	<u>Detection Kit</u>	<u>Färbung</u>	<u>Kontrollgewebe</u>
SOX2	SOX2 monoclonal rabbit anti-human Antibody, SP76	Cell Marque, via medac	Benchmark XT, Ventana	1:100	Zytomed Systems	TBE-Puffer, Roche, pH 8,4	ultraView DAB Detection kit, Roche	Nukleär	Tube
Ki67	Monoclonal Mouse anti-human Ki67 Antigen, clone MIB-1	DakoCytomation Denmark A/S	Benchmark XT, Ventana	1:200	Zytomed Systems	TBE-Puffer, Roche, pH 8,4	iView DAB Detection kit, Roche	Nukleär	High-grade seröses Karzinom, Tonsille
ALDH1	Anti-ALDH1a1 rabbit mAntibody, Clone ID: EP1933Y	Epitomics Inc., CA, USA	Benchmark XT, Ventana	1:100	Zytomed Systems	TBE-Puffer, Roche, pH 8,4	UltraView DAB Detection kit (biotinfrei), Roche	Zytoplasmatisch	Tube
ALDH1/ Ki67	Siehe Einzelfärbung	Epitomics Inc., CA, USA	Benchmark XT, Ventana	1:100 / 1:100	Zytomed Systems	TBE-Puffer, Roche pH 8,4	UltraView DAB Detection kit (biotinfrei), Ventana, Roche; Ultra View Red Alkine Phosphatase kit, Ventana, Roche	Nukleär und zytoplasmatisch	High-grade seröses Karzinom,

SOX2/ ADLH1	Siehe Einzelfär- bung	Cell Marque, via Medac Epitomics Inc., CA, USA	Benchmark XT, Ventana	1:100 / 1:100	Zytomed Systems	TBE-Puffer, Roche, pH 8,4	UltraView Universal DAB Detection kit, Roche (biotinfrei); UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit, Roche, (biotinfrei)	Nukleär und zytoplasmatisch	Tube
Oct-4	Monoclonal Mouse anti- human Antibody, Clone ID: MRQ-10	Cell Marque, CA, USA	Benchmark XT, Ventana	1:200	Zytomed Systems	TBE-Puffer, Roche pH 8,4	iView DAB Detection kit, Roche	Nukleär	Seminom
Nanog	Monoclonal Goat Anti- human Nanog-BD Antibody	R&D Systems Inc., MN, USA	Discovery XT, Ventana	1:25 Primär- antikör- per, 1:200 Sekun- däranti- körper	Discovery Diluent	TBE-Puffer, Roche, pH 8,4	DAB MAB-kit, RUO, Roche	Nukleär	Seminom
Notch-1	Monoclonal Rabbit Antibody, Clone-ID: EP1238Y	Epitomics Inc.,	Benchmark XT, Ventana	1:50	Zytomed Systems	TBE-Puffer, Roche, pH 8,4	ultraView DAB Detection kit, Roche	Zytoplasmatisch	Mamakarzi- nom

c-myc	Rabbit monoclonal Antibody, Clone ID: Y69	Epitomics Inc., CA, USA	Benchmark XT, Ventana	1:200	Zytomed Systems	TBE-Puffer, Roche, pH 8,4	iView DAB Detection kit, Ventana, Roche	Nukleär	Burkitt-Lymphom
Cyclin D1	Monoclonal Rabbit anti-human Antibody, Clone: SP4	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, D	Benchmark XT, Ventana	1:40	Zytomed Systems	TBE-Puffer, Roche pH 8,4	iView DAB Detection kit, Ventana, Roche	Nukleär	Mantelzell-Lymphom
CD 117	Monoclonal Mouse anti-human CD79 α , Clone ID: JCB117	DakoCytomation, Denmark A/S	Benchmark XT, Ventana	1:200	Zytomed Systems	TBE-Puffer, Roche, pH 8,4	iView DAB Detection kit, Ventana, Roche	Membran	Tonsille

Tabelle 1: Verwendete Antikörper und zugehörige Informationen.

2.3.3 Auswertung der Immunhistochemie

Die IHC-Färbungen von ALDH1 und SOX2 wurden mittels eines semiquantitativen Scores ausgewertet. Für SOX-2 wurde die relative Zahl der positiv gefärbten Nuklei wie folgt gewertet: komplett negative Nuklei entsprechen 0% = Score 0, >0-10% = +1, 11-50% = +2, 51-80% = +3, >80% = +4. Für die ALDH1-Färbung wurde der gleiche Score verwendet, jedoch wurden die zytoplasmatisch positiven Zellen gewertet. Die Fälle der einzelnen Patientinnen wurden mit in die Gesamtwertung aufgenommen, wenn wenigstens eine Stanze als wertbar eingestuft wurde, oder mindestens 50 Tumorzellen zur Auszählung vorhanden waren.

Die Analysen wurden unabhängig von zwei Gutachterinnen durchgeführt (A.S., A.F.), wobei eine der beiden eine Pathologin mit Schwerpunkt Gynäkopathologie ist.

Die IHC von Ki67 erfolgte anhand einer prozentualen Auszählung der pro Core gezählten positiven Nuklei in Arealen bestehend aus 100 Zellen (0-100%), und anschließender Errechnung des Mittelwertes für jeden Fall. Wenn verwertbar erfolgte somit die Berechnung des Mittelwerts über bis zu sechs Cores.

Betreffend die Doppelfärbung von ALDH1/Ki67, hier wurde eine zweiphasiges Modul angewendet: im ersten Schritt wurden alle Ki67-positiven Nuklei in ALDH1-positiven Zellen gezählt, hierfür mussten mindestens 50 Zellen ALDH1-positiv gefärbt worden sein. Im zweiten Schritt wurden prozentual alle Ki67-positiven Nuklei in ALDH1-negativen Zellen ausgezählt. Die Prozentzahlen der positiven Nuklei zwischen beiden Populationen wurden Fall für Fall verglichen (t-Test für verbundene Stichproben).

Eine exakte Auflistung aller Auswertungen und deren Systematik findet sich in Tabelle 2.

<u>Marker</u>	<u>Färbung nukleär</u>	<u>Färbung zytoplasmatisch</u>	<u>Färbung membranös</u>	<u>Auswertungssystem</u>	<u>Intensität</u>
SOX2 monoclonal	Ja	-	-	Score: 0% = 0, 1-10% = +1, 11-50% =+2, 51-80% =+3, >80% =4+	-
Ki67	Ja	-	-	Prozentual (pro 100 Tumorzellen), Durchschnittswerte pro Fall (Mittelwert über Anzahl verwertbarer Cores pro Patientin)	-
ALDH1	-	Ja	-	Score: 0%=0, 1-10% =1+, 11-50% =2+, 51-80% =3+, >80% =4+	-
ALDH1/Ki67	Ja	Ja	-	Prozentual (je 100 Tumorzellen)	-
Cyclin D1	Ja	-	-	Score: 0 - 4+	-
Oct-4	Ja	-	-	Prozentual (je 100 Tumorzellen)	-
Nanog-BD	Ja	-	-	Prozentual (je 100 Tumorzellen)	-
CD 117	-	-	Ja	Score: 0 - 4+	1+ = schwach, 2+ = mäßig, 3+ = stark
c-myc	Ja	-	-	Score: 0 - 4+	Intensität von 1 - 3
Notch-1	Ja	Ja	-	Score: 0 - 4+	Intensität von 1 - 3
SOX2 monoclonal/ALDH1	Ja	Ja	-	1)Prozentual für SOX-2 in ALDH1 positiven Zellen, Score 0 – 4+	Für SOX-2: keine Für ALDH1: wertbar ab einer Intensität ≥ 2+ (=mäßig)

Tabelle 2: Markerprofil und Auswertung der Immunhistochemie. Als positiv gezählt wurden jeweils Zellen mit einer mindestens mäßiggradigen Färbintensität (Intensitätsscore 2+ und 3+).

2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse wurden anhand der immunhistochemisch gewonnenen Ergebnisse Untergruppen gebildet und in Bezug gesetzt zu klinischen Parametern und dem Tumorgrad. Korrelationen wurden mittels χ^2 - und Fisher's Exact-Test ermittelt. Um den durchschnittlichen Proliferations-Index der unterschiedlichen Gruppen von Tumoren oder Zell-Populationen vergleichen zu können, wurde der t-Test für verbundene Stichproben verwendet. Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier-Methode produziert und mittels log-rank Test verglichen. Für alle Tests konnte eine statistische Signifikanz von $p < 0,05$ definiert werden. Die statistischen Auswertungen entstanden unter Einsatz der SPSS-Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Diese Studie wurde bewilligt durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen.

3 Ergebnisse

3.1 SOX2-Expression in serösen Ovarialtumoren

In unserer Studie untersuchten wir zunächst erneut die SOX2-Expression in APSTs, low-grade und high-grade serösen Karzinomen in einem Gewebemikroarray (Tissue Microarray, TMA). Hierbei wurden nur jene Fälle gewertet, welche eine moderate (2+) oder starke (3+) nukleäre Färbintensität aufwiesen. Die Tumoren wurden anhand des zuvor erwähnten Scoring-Systems eingeteilt von 0-3 (0 für negativ, 1+ für 1-10% positive Zellen, 2+ für >10-50% positive Zellen und 3+ für >50% positive Zellen, wobei zur besseren statistischen Auswertbarkeit score 3 und 4 unter score 3+ zusammengefasst wurden). Passend zu zuvor bereits veröffentlichten Daten (Pham et al.), fanden wir eine signifikante Korrelation von SOX2-Expression mit dem Tumorgrad. SOX2 fand sich in 8 von 37 APST (21,6%), zwei von 6 LGSC (33,3%) und 78 von 159 HGSC (49,1%). (Tabelle 3) Im Unterschied zu den Daten von Pham et al., wurde in der vorliegenden Studie vor allem die Gruppe der Borderline Tumoren/APST erweitert, um in diesem Bereich tragfähige Daten zu erarbeiten.

APSTs zeigten eine ausschließlich niedriggradige SOX2-Expression von unter 10% positiven Tumorzellen in nur 21,6% (n=8) der untersuchten APSTs. Die überwiegende Mehrheit war SOX2 negativ (78,4%, n=29).

Ähnlich verhielten sich die low-grade serösen Ovarialkarzinome, wovon ein Drittel (n=2) eine SOX2-Expression von unter 10% aufwies (33,3%) und zwei Drittel (n=4) SOX2 Negativität zeigten (66,7%).

Eine deutliche Expression in mehr als 10% der Tumorzellen konnte ausschließlich in HGSC gefunden werden (n=44). (Abb. 6)

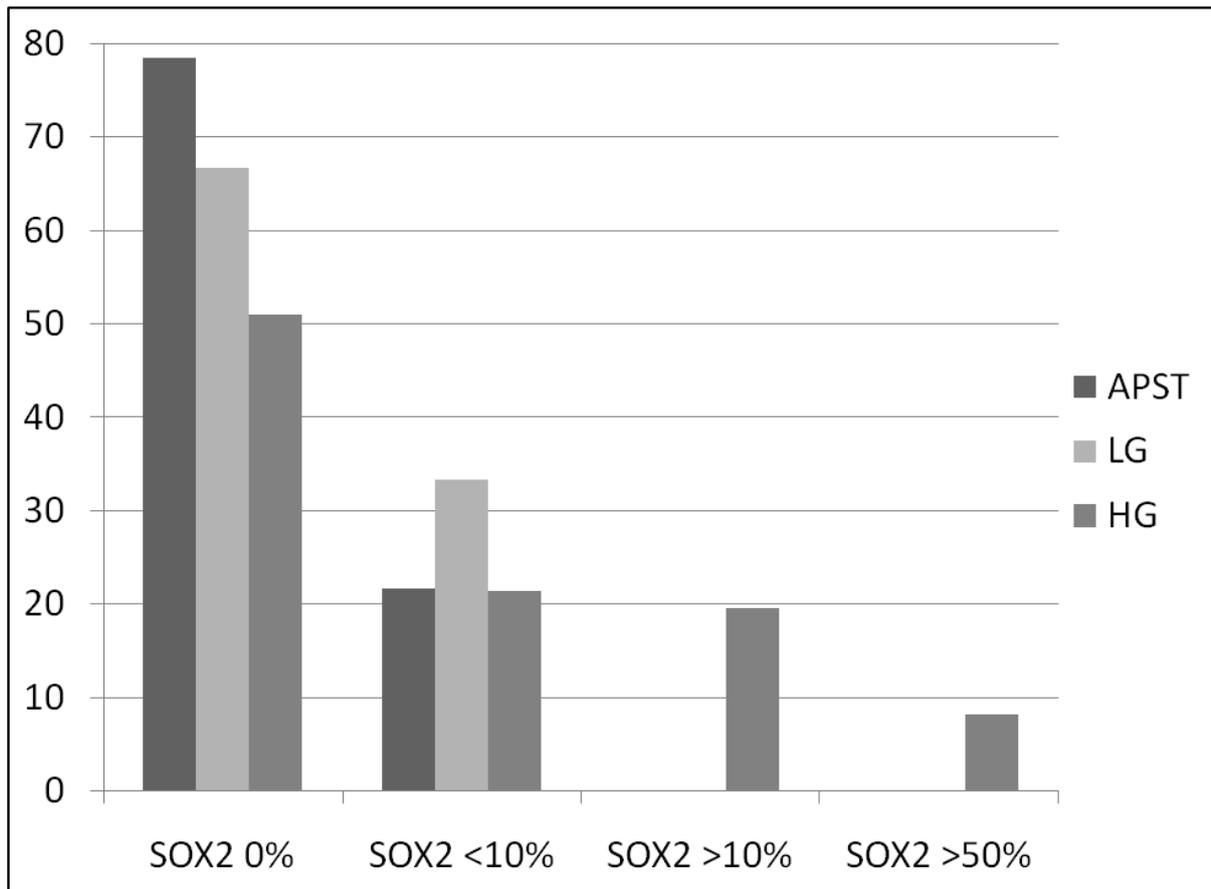


Abb.6: SOX2-Verteilung nach Entitäten mit Expressionsmustern von 0%,<10%,>10%-50%,>50%. P-Wert = 0,037.

	SOX2 0%	SOX2 <10%	SOX2 >10%	SOX2 >50%	TOTAL	n	%	p-Wert
APST	29	8	0	0	37	n		APST vs invasiv 0,003
	78,4%	21,6%	0%	0%	100	%		
LG	4	2	0	0	6	n		LG vs HG 0,009
	66,7%	33,3%	0%	0%	100	%		
HG	81	34	31	13	159	n		
	50,9%	21,4%	19,5%	8,2%	100	%		
TOTAL	114	44	31	13	202	n		
TOTAL	56,4%	22%	15,3%	6,3%	100%	%		

Tabelle 3: SOX2-Verteilung nach Entitäten mit Expressionsmustern von 0%,<10%,>10%-50%,>50%.

3.2 ALDH1-Expression in serösen Ovarialtumoren

Wir untersuchten zunächst die ALDH1-Expression in APSTs, LGSC und HGSC unserer Kohorte mit Hilfe des oben beschriebenen TMA. ALDH1 stellte sich immunhistochemisch in unserer Untersuchung als zytoplasmatische Färbung der Zellen ohne nukleäre Färbung dar.

Anhand eines Scoring Systems, von 0 bis 3 reichend (0% ALDH1-gefärbte Zellen = negative = Score 0; 1-<10% positive Zellen = 1+; 10-<50% positive Zellen = 2+; >50% positive Zellen = 3+), analysierten wir das Ausmaß der ALDH1-Färbung, wobei ausschließlich diejenigen Fälle als positiv gewertet wurden, in welchen die ALDH1-Färbung moderat oder stark zu erkennen war. (Abb.7A)

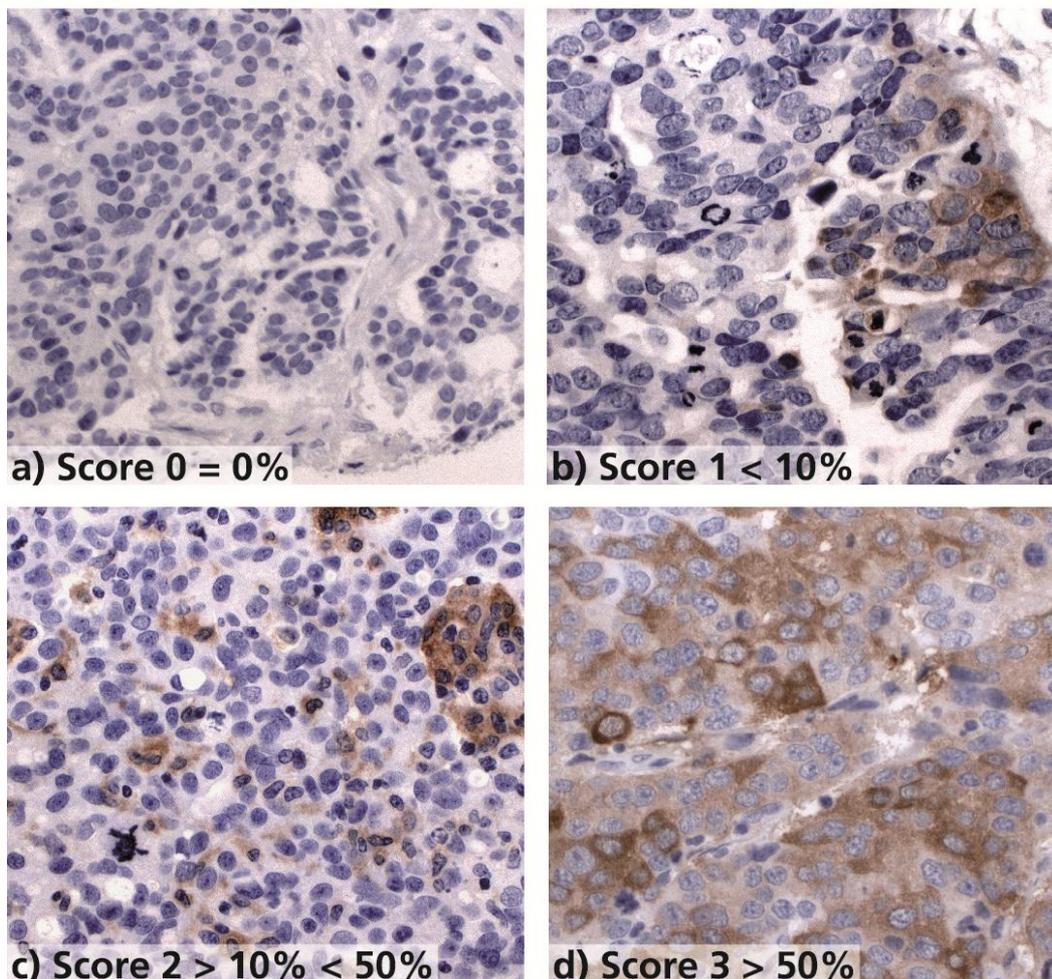


Abb.7A (a-d): ALDH1-Immunohistochemie: Verwendung eines Scoring Systems: 0% ALDH1-gefärbte Zellen = negative = Score 0; 1-<10% positive Zellen = 1+; 10-<50% positive Zellen = 2+; >50% positive Zellen = 3+. Fälle wurden als positiv gewertet sofern die Intensität der Färbung moderat (2+) oder stark(3+) erkennbar war.

Wir fanden keine erkennbare Expression für Nanog oder Oct-4 in den Geweben. Für c-myc, CD117, Notch1 oder Cyclin D1 konnten zwar auswertbare Ergebnisse erzielt werden, da die Färbungen in den meisten Fällen jedoch im Vergleich zu SOX2 und ALDH1 zu schwach waren und die Expressionsraten geringer, konzentrierten wir uns auf die bereits genannten Daten und die Doppelfärbungen. (Abb. 7B(a) und 7B(b))

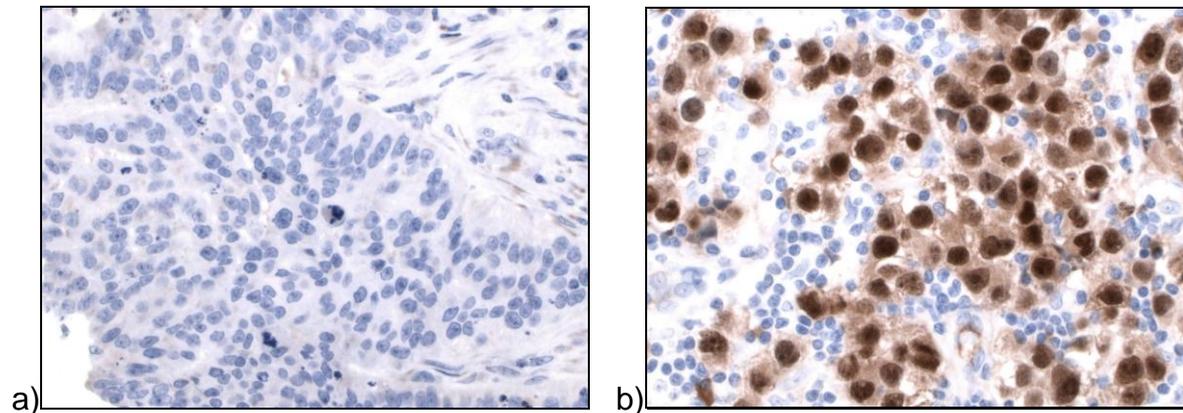


Abb.7B: a) Oct4-Färbung in serösem Ovarialkarzinom (negativ) und b) in der Kontrolle mit Dysgerminom (positiv).

In Zusammenschau aller untersuchten Fälle, zeigte sich eine zytoplasmatische ALDH1-Aktivität in nahezu der Hälfte (43,3%) aller untersuchten Tumoren. Weniger als 10% der Fälle wies eine deutlich über 50%-ige ALDH1-Positivität auf. (Abb.8)

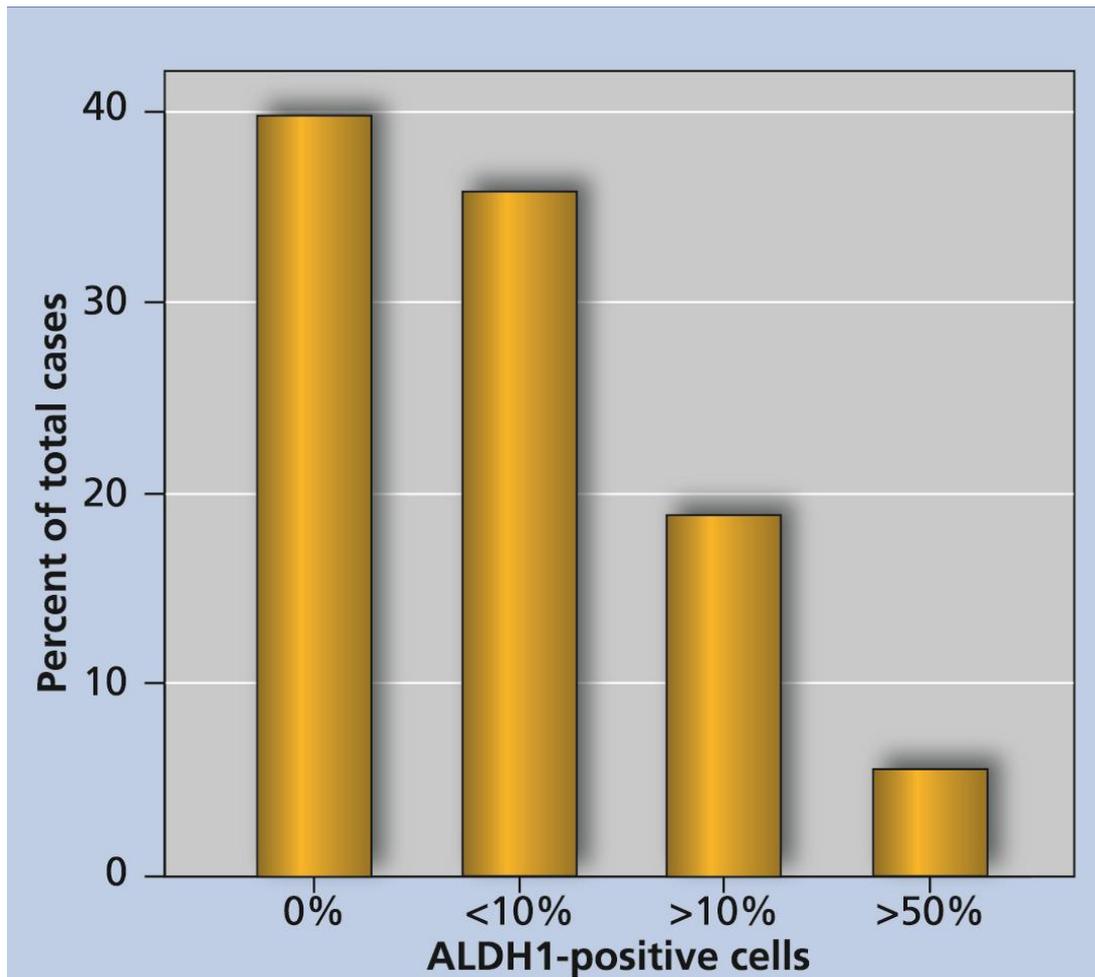


Abb.8: Prozentsatz von serösen Ovarialkarzinomen mit ALDH1-Expression. Die Mehrheit der Tumoren zeigt niedrige ALDH1-Positivität. Nur 10% der Karzinome illustrieren >10% bis zu 50% von ALDH1-positiven Zellen. Weniger als 10% zeigen >50% positive Zellen.

Hinsichtlich der Verteilung der ALDH1-Positivität aufgegliedert nach Entitäten der Tumoren zeigte sich zudem, dass keinerlei low-grade Karzinome eine ALDH1-Expression von >50% aufwies, sondern ausschließlich APST und HGSC. Des Weiteren ist ersichtlich, dass die überwiegende Mehrheit aller Entitäten ALDH1-negativ ist oder weniger als 10% der Zellen eines Tumors den Marker exprimiert. Hier besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Entitäten. (Abb.9)

In nahezu der Hälfte der Tumoren (43,4%) fanden wir eine ALDH1-Expression, wenn auch in den meisten Fällen nur in wenigen Zellen, was zur Theorie der wenigen Tumorstammzellen innerhalb einer Neoplasie konsistent ist. Genauer betrachtet fand sich eine Positivität in 18 der 37 verwertbaren und untersuchten APSTs (48,6%), zwei aus fünf LGSCs (40%) und 68 von 161 HGSCs (42,2%). (Tabelle 4)

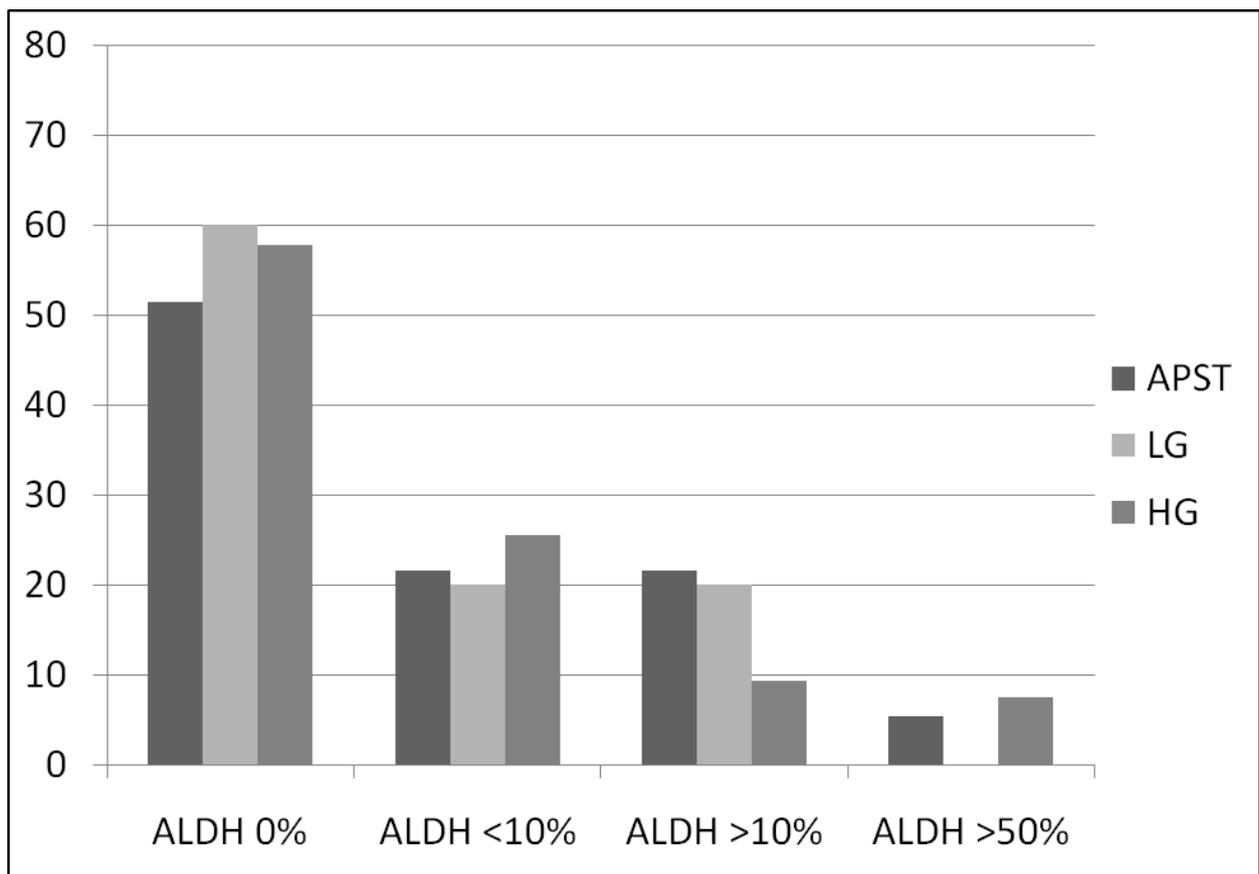


Abb.9: ALDH1-Verteilung nach Entitäten mit Expressionsmustern von 0%,<10%,>10%-50%,>50%.

	ALDH1 0%	ALDH1 <10%	ALDH1 >10%	ALDH1 >50%	TOTAL		p-Wert
APST	19	8	8	2	37	n	APST vs invasiv
	51,4%	21,6%	21,6%	5,4%	100	%	
LG	3	1	1	0	5	n	0,472
	60%	20%	20%	0%	100	%	LG vs HG
HG	93	41	15	12	161	n	0,768
	57,8%	25,5%	9,3%	7,5%	100	%	
TOTAL	115	50	24	14	203	n	
TOTAL	56,7%	24,6%	11,8%	6,9%	100%	%	

Tabelle 4: ALDH1-Verteilung nach Entitäten mit Expressionsmustern von 0%,<10%,>10%-50%,>50%.

In Beziehung auf Gesamt-Überleben der Patientinnen und auch des Rezidiv-freien Überlebens konnte kein Einfluss der ALDH1-Positivität ausgemacht werden. Weder stark ALDH1-exprimierende noch ALDH1-negative Tumoren bewirkten signifikante Unterschiede in Überlebenskurven.

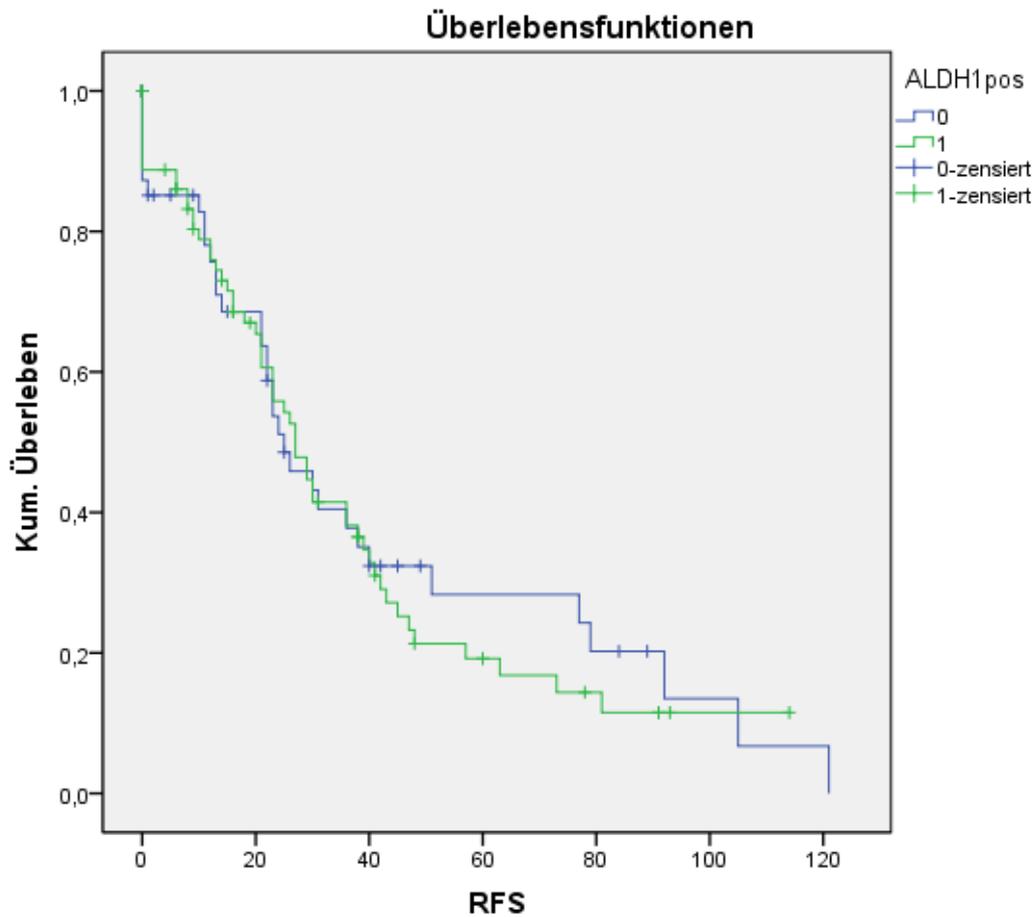


Abb. 10A: Effekt der ALDH1-Expression auf das Rezidiv-freie Überleben (relapse free survival). p-Wert = 0,503.

Nachweis von ALDH1-positiven Zellen in jedweder Zahl (Score 1-3) hatte keinen signifikanten Einfluss auf das mediane Rezidiv-freie Überleben. (Abb.10A)

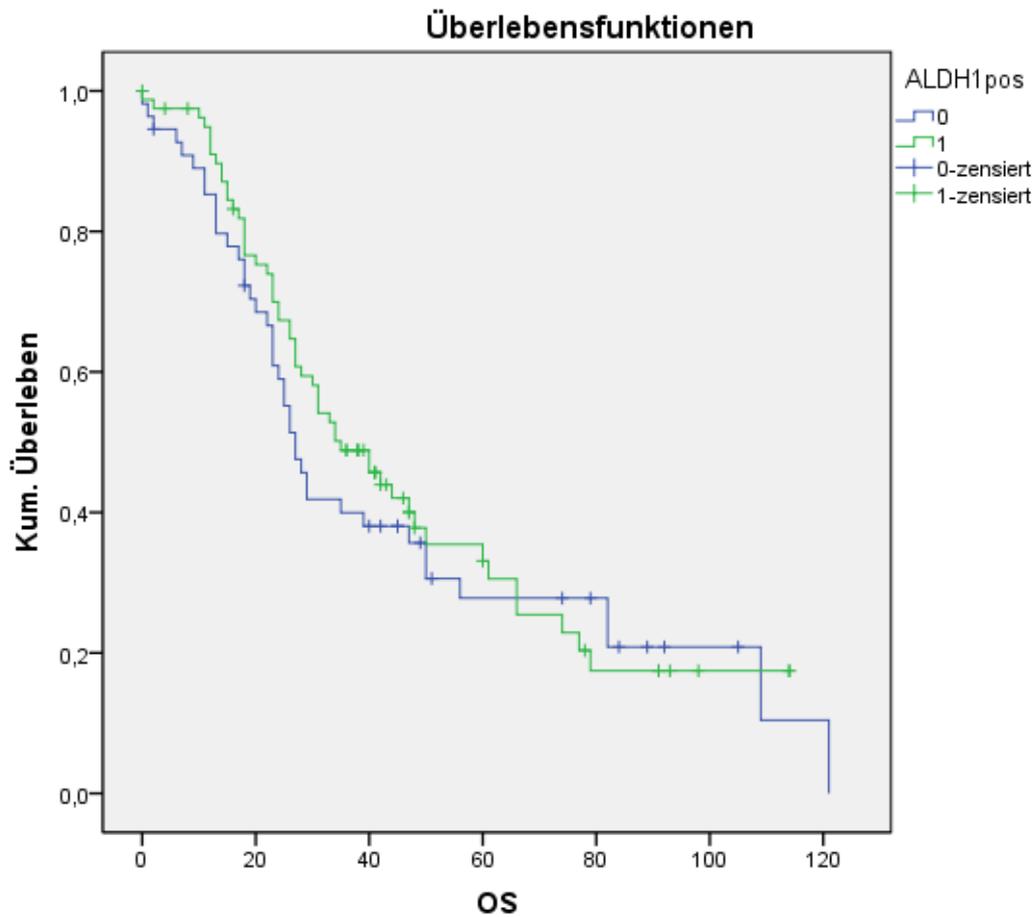


Abb. 10B: Gesamtüberlebenskurven (overall survival) bezogen auf die ALDH1 Expression. p-Wert = 0,506.

Bezogen auf das Gesamtüberleben der Patientinnen kann kein signifikanter Einfluss von ALDH1 auf das Überleben gefunden werden. (Abb. 10B)

3.3 SOX2- oder ALDH1-positive Zellen charakterisieren unterschiedliche Zellpopulationen

In einer dritten Untersuchungsreihe wurden mit Einsatz von immunhistochemischen Doppelfärbungen die Expressionsmuster von SOX2 und ALDH1 direkt verglichen [51,104]. Eine Doppelfärbung war aufgrund des zytoplasmatischen ALDH1- und des nukleären SOX2-Vorkommens gut durchzuführen.

Hierdurch sollte ersichtlich werden, ob es in serösen Ovarialtumoren die gleichen oder verschiedene Zellen sind, welche für die einzelnen oder sogar beide Stammzellmarker eine Positivität aufweisen.

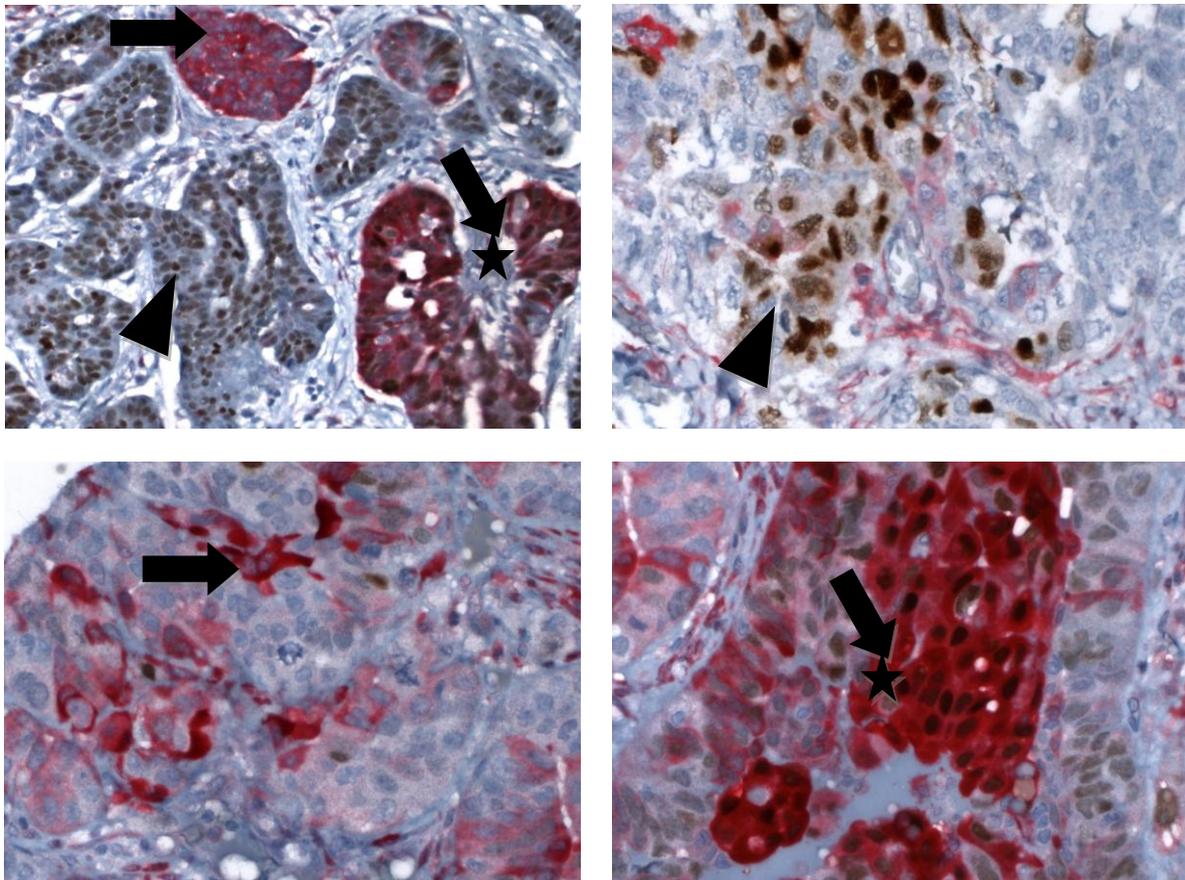


Abb.11A: ALDH1/SOX2 Doppelfärbung, Vergrößerung 400x: Verschiedene Zellfraktionen in unterschiedlichen Fällen: ALDH1-exprimierende (Pfeil) und SOX2-positive (Pfeilspitze) Konglomerate, einzeln und doppelt gefärbte Zellen (Pfeil mit Stern).

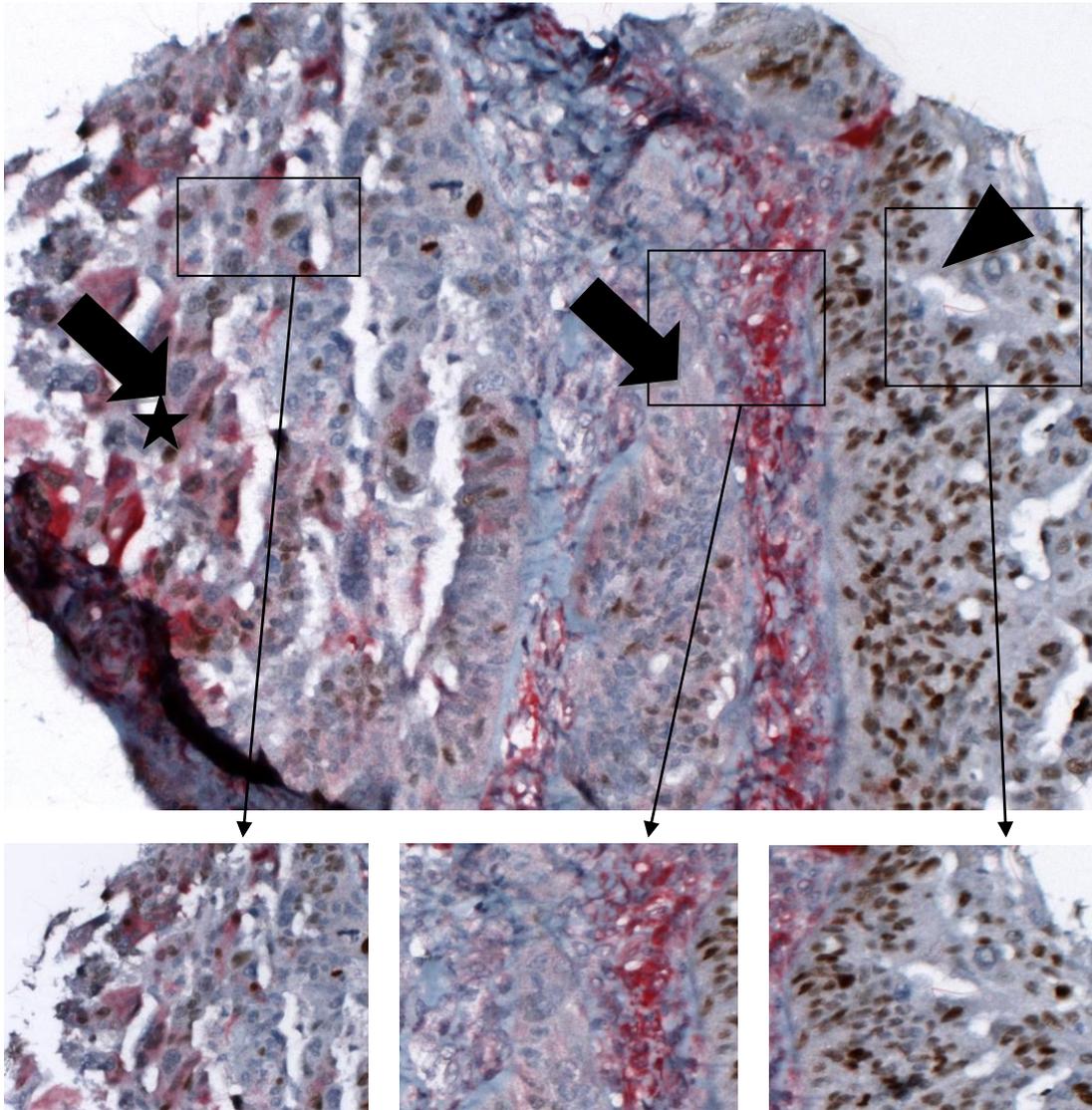


Abb.11B: ALDH1/SOX2 Doppelfärbung, Vergrößerung 400x: Verschiedene Zellfraktionen im gleichen Fall: ALDH1-exprimierende (Pfeil) und SOX2-positive (Pfeilspitze) Konglomerate, einzeln und doppelt gefärbte Zellen (Pfeil mit Stern).

Interessanterweise fanden sich in den meisten HGSCs verschiedene Zellfraktionen: eine positive für SOX2 (Pfeilspitze), die andere positiv für ALDH1 (Pfeil), sowie eine sehr kleine dritte Fraktion mit doppelt-positiven Zellen (Abb.11 A+B, Pfeil mit Stern), welche sich nur in high-grade Tumoren fand.

Eine Expression der Stammzellfaktoren SOX2 und/oder ALDH1 konnte in der Mehrzahl der hochgradigen serösen Ovarialkarzinome detektiert werden. Wie in den vorausgegangenen Studien mit den Monofärbungen, konnten wir eine Assoziation der verschiedenen Tumorcharakteristika mit einzelnen Faktoren finden, wie z.B. schlechte Differenzierung und längeres Überleben bei SOX2, oder erhöhte Gesamtproliferationsrate bei ALDH1-positiven Tumoren. (Tabelle 5)

Zu einer genaueren Übersicht, wurde die Zahl der positiven Fälle für die verschiedenen Tumorentitäten für die beiden Hauptmarker in der Doppelfärbung SOX2 und ALDH1 nochmals tabellarisch festgehalten (Tabelle 5).

<u>Tumor</u>	<u>Messung</u> SOX2 und ALDH1 <u>negativ</u> n / %	<u>ALDH1</u> <u>positiv</u> n / %	<u>SOX2 positiv</u> n / %	<u>ALDH1</u> <u>und/oder</u> <u>SOX2 positiv</u> n / %	<u>ALDH1 und</u> <u>SOX2 positiv</u> <u>(gleicher Fall)</u> n / %	<u>ALDH1 und</u> <u>SOX2 positiv</u> <u>(doppelt</u> <u>positive</u> <u>Zellen)</u> n / %	<u>ALDH1 und</u> <u>SOX2 positiv</u> <u>(>10%</u> <u>doppelt</u> <u>positive</u> <u>Zellen)</u> n / %
APST (n= 33)	21 / 63,6%	10 / 30,3%	5 / 15,2%	12 / 36,4 %	3 / 9,1%	2 / 6,1%	0 / 0%
Low-grade (n= 6)	3 / 50,0%	3 / 50,0%	2 / 33,3%	3 / 50,0%	2 / 33,3%	2 / 33,3%	0 / 0%
High-grade (n= 152)	17 / 11,2%	118 / 77,6%	69 / 45,4%	135 / 88,8%	53 / 34,9%	20 / 13,2%	7 / 4,6%
Gesamt (n=191)	41 / 21,5%	131 / 68,8%	76 / 39,8%	150 / 78,5%	58 / 30,4%	24 / 12,6%	7 / 3,7%
p-Wert	<0,001	<0,001	0,005	<0,001	0,014	0,159	0,394

Tabelle 5: Anzahl der positiven Fälle in der Doppelfärbung für ALDH1 und SOX2: APST, low-grade seröse Karzinome und high-grade seröse Karzinome im Vergleich.

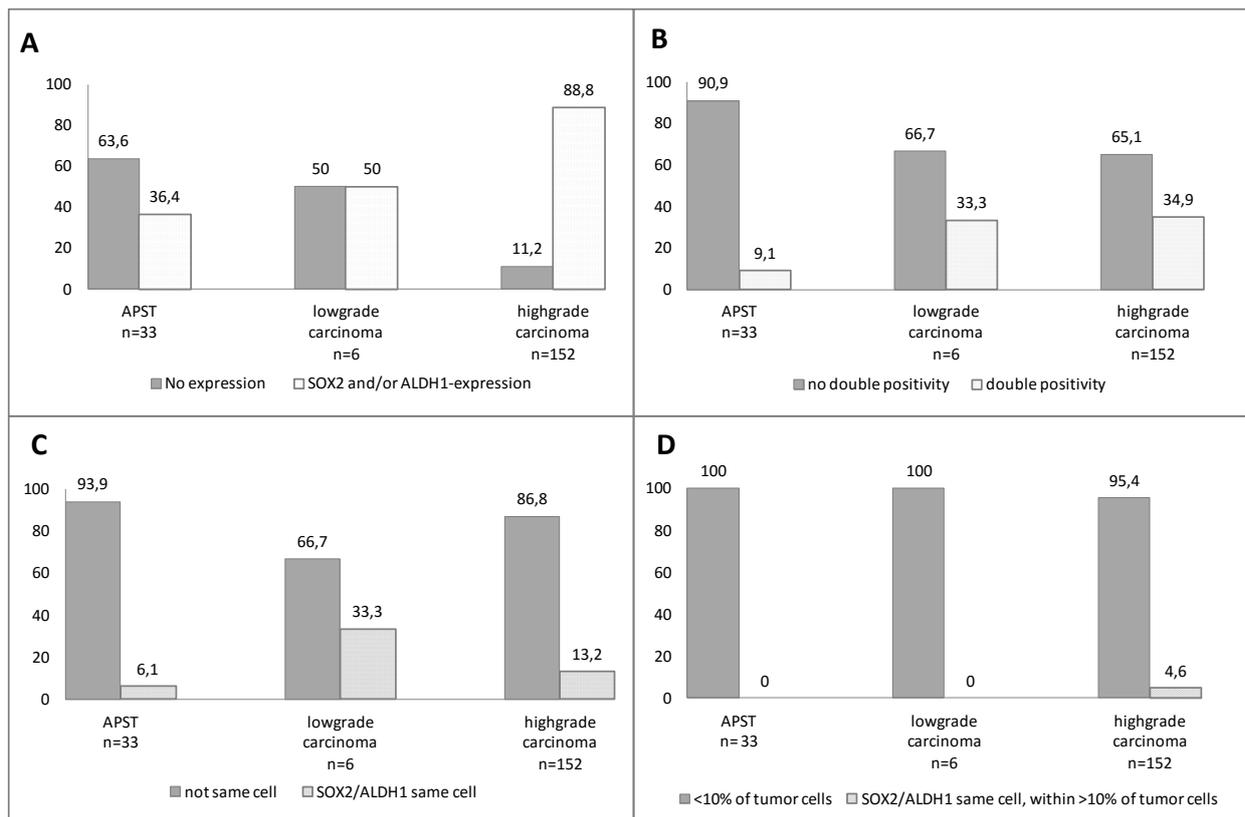


Abb.12, A-D:

A: SOX2- oder ALDH1-positive Zellen in Bezug auf den Tumorstadium (p-Wert <0,001).

B: SOX2- und ALDH1-Positivität innerhalb des gleichen Falles, jedoch nicht in der gleichen Zelle (p-Wert 0,014).

C: SOX2/ALDH1-Koexpression innerhalb der gleichen Zelle (p-Wert 0,159).

D: SOX2/ALDH1-Koexpression innerhalb der gleichen Zelle in >10% der Tumorzellen (p-Wert 0,394).

Bezogen auf die einfache Positivität der Zelle für mindestens einen der beiden Stammzellmarker, ohne gezielte Auftrennung für welchen, ließ sich festhalten, dass in Borderline Tumoren nur etwa 1/3 der untersuchten Fälle überhaupt Stammzellmarker exprimierten, mit 36,4% der Fälle. Die restlichen zwei Drittel zeigten sich komplett negativ.

Low-grade seröse Karzinome hielten sich was die Expression oder Negativität von ALDH1 oder SOX2 angeht die Waage mit jeweils 50%.

High-grade seröse Karzinome hingegen zeigten in der Mehrzahl der Fälle eine Positivität für Stammzellmarker (88,8%), wengleich hier noch nicht unterschieden wurde, ob die Fälle entweder für ALDH1 oder SOX2 positiv waren. Diese Ergebnisse zeigten statistische Signifikanz (p-Wert <0,001). (Abb.12A, Tabelle 5)

Hinsichtlich der Positivität für ALDH1 und SOX2 im gleichen Fall zeigte sich eine Koexpression in zwei der untersuchten low-grade Karzinome (33,3%) sowie in etwa einem Drittel der high-grade serösen Ovarialkarzinome (34,9%). Was die Borderline Tumoren angeht, findet sich hier eine ALDH1/SOX2-Koexpression im gleichen Fall in weniger als 10% der Fälle (p-Wert 0,014). (Abb.12B, Tabelle 5)

Weiterhin betrachteten wir das Vorkommen von SOX2/ALDH1-Koexpression in der gleichen Zelle. Nur 6,1% der APST wiesen eine Koexpression innerhalb der gleichen Zelle an einer beliebigen Stelle im Tumorgewebe auf. Low-grade seröse Karzinome zeigten eine Koexpression in etwa einem Drittel innerhalb der gleichen Zelle, wohingegen high-grade seröse Karzinome nur in 13,2% doppelt positiv waren (p-Wert 0,159). (Abb.12C, Tabelle 5)

Schließlich wurde weiter differenziert in Tumoren mit ALDH1/SOX2-Doppelpositivität in der gleichen Zelle in mehr als 10% der Tumorzellen des Tumorgewebes, um die mögliche Relevanz dieses speziellen Stammzellphänotyps zu untersuchen. Diese Gruppe erwies sich als überaus klein, denn nur 4,6% (entsprechend 7 Tumorfällen) der ausschließlich high-grade serösen Ovarialkarzinome erfüllten die für die Untersuchungsgruppe erforderlichen Kriterien, wenngleich das Ergebnis statistisch keine Signifikanz zeigte. Die Borderline-Tumoren wie auch die low-grade serösen Karzinome zeigten keinerlei Doppelpositivität in mehr als 10% der Zellen (im Median) (p-Wert 0,394). (Abb.12D, Tabelle 5)

Hier ergab sich für uns die Frage, ob es womöglich genau diese kleine Gruppe der HGSC sein könnte, welche den prognostisch ungünstigen Teil der serösen Ovarialneoplasien ausmacht. Es konnte jedoch kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben und das Rezidiv-freie Überleben der Patientinnen gefunden werden. (Abb.13)

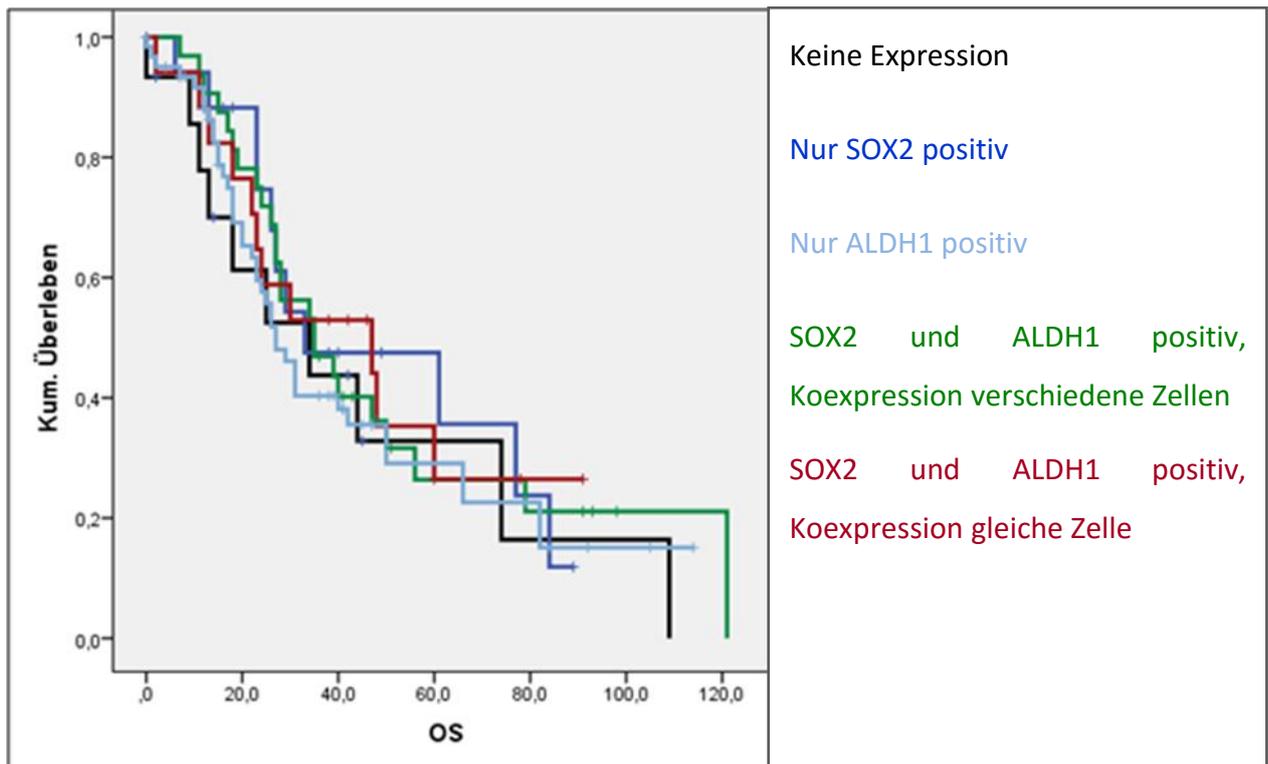


Abb.13: SOX2/ALDH1, kein Effekt auf das kumulative Überleben.

Zusammengefasst ist festzuhalten, dass sich in high-grade serösen Ovarialkarzinomen in fast allen Fällen eine Expression von verschiedenen Stammzellmarkern finden ließ, wenngleich nicht unbedingt im gleichen Fall oder gar in der gleichen Zelle. Im Vergleich von low- und high-grade serösen Karzinomen zu Borderline Tumoren zeigte sich, dass letztere grundsätzlich wenig Stammzellmarkerexpression aufwiesen. Bezogen auf Koexpression im gleichen Fall oder in der gleichen Zelle, richteten wir die Aufmerksamkeit v.a. auf die wenigen Fälle der ALDH1/SOX2-Koexpression in high-grade serösen Ovarialkarzinome und vermuteten hier eine Bedeutung für Prognose und Überleben. Die Überlebenskurven zeigten jedoch, dass sich kein signifikanter Effekt der Koexpression auf Gesamt- und Rezidiv-freies Überleben ergab.

3.4. Expression von ALDH1 und Einfluss auf die Proliferationsrate

3.4.1 Korrelation von ALDH1 und Ki67

Eine kooperierende Forschungsgruppe/ Bareiss et al. (2012) konnten in Maus-Experimenten zeigen, dass Ovarialtumoren, welche ALDH1 in hohen Maßen exprimierten, dazu tendierten, größere Tumore zu formen als jene, welche ALDH1-negativ waren oder nur wenig ALDH1 exprimierten.

Bezogen auf den zeitlichen Verlauf, scheint es, als proliferierten die Zellen der ALDH1-positiven Tumore schneller. Diese Daten zeigten, dass jene Tumore, welche stark ALDH1-positiv waren (mehr als 50% ALDH1-exprimierende Zellen) auch einen höheren Proliferations-Index (Ki67) präsentierten, der bei etwa 40% Ki67-positiven Zellen lag ($p=0,029$). (Abb.14)

Diese Ergebnisse scheinen den bislang geltenden Vorstellungen von Tumorstammzellen zu widersprechen, welche diese als ruhendes Kompartiment innerhalb eines Tumors charakterisieren. Zur weiteren Analyse wurde hierfür von uns eine ALDH1/Ki67-Doppelfärbung durchgeführt.

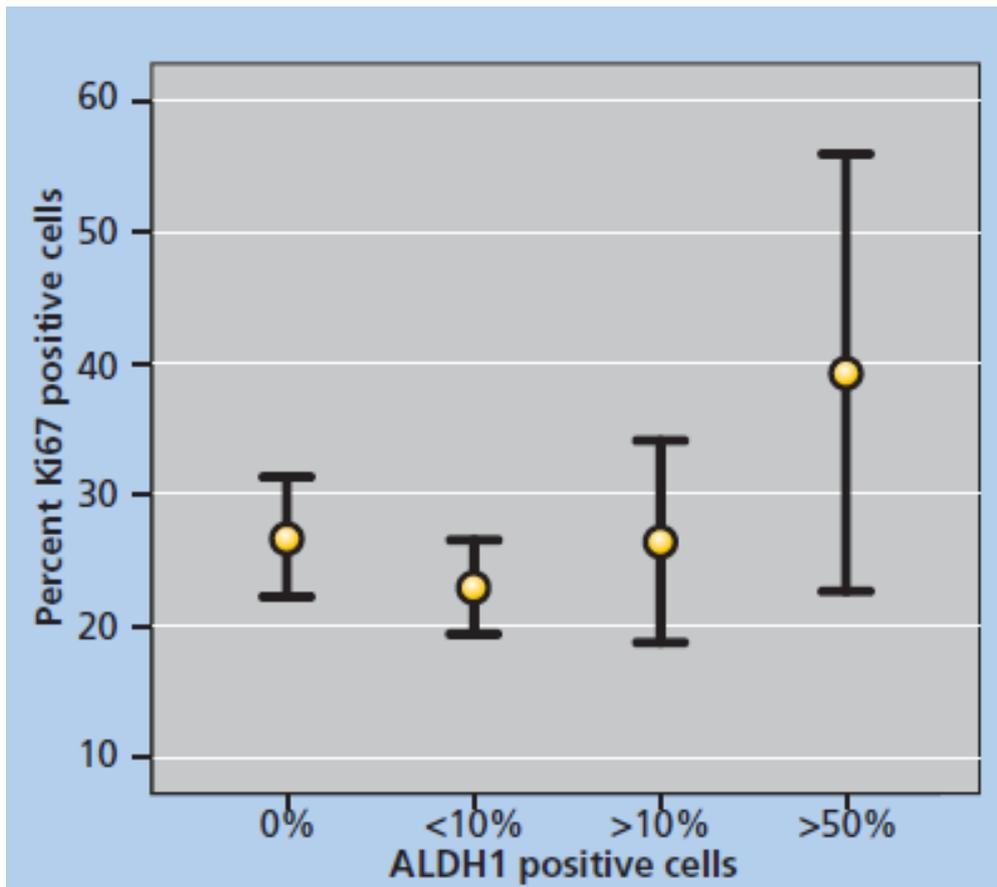


Abb.14: Korrelation zwischen durchschnittlichem Ki67-Index und ALDH1-Score in high-grade serösen Ovarialkarzinomen. Hier findet sich ein signifikanter Unterschied im durchschnittlichen Ki67-Index, zwischen Tumoren mit >50% ALDH1-positiven Zellen und <50% ALDH1-positiven Zellen. (39,2% vs. 26,11%, $p=0,029$, t-test).

3.4.2 ALDH1 und Ki67 in verschiedenen Zellfraktionen: Stark proliferierende Tumore enthalten ein „langsames“ ALDH1-positives Kompartiment

Wir führten zusätzlich eine immunhistochemische Doppelfärbung für ALDH1 und Ki67 an unserem bereits erwähnten TMA durch, wobei sich zwei verschiedene Zellfraktionen zeigten.

Die eine Fraktion bestand aus der ALDH1-positiven, zytoplasmatisch rot gefärbten Fraktion, in welcher nur wenig oder gar keine braune nukleäre Färbung mit Antikörpern gegen Ki67 zu detektieren war (durchschnittlich 4,4%), was anhand unseres Färbeprotokolls für eine niedrige Proliferationsrate sprach. Auf der anderen Seite fanden sich Zellkonglomerate, welche ausschließlich Ki67-positiv waren und nahezu keine zytoplasmatische rote Färbung für ALDH1 aufwiesen (Ki67-Index 23,6%). (Abb.15)

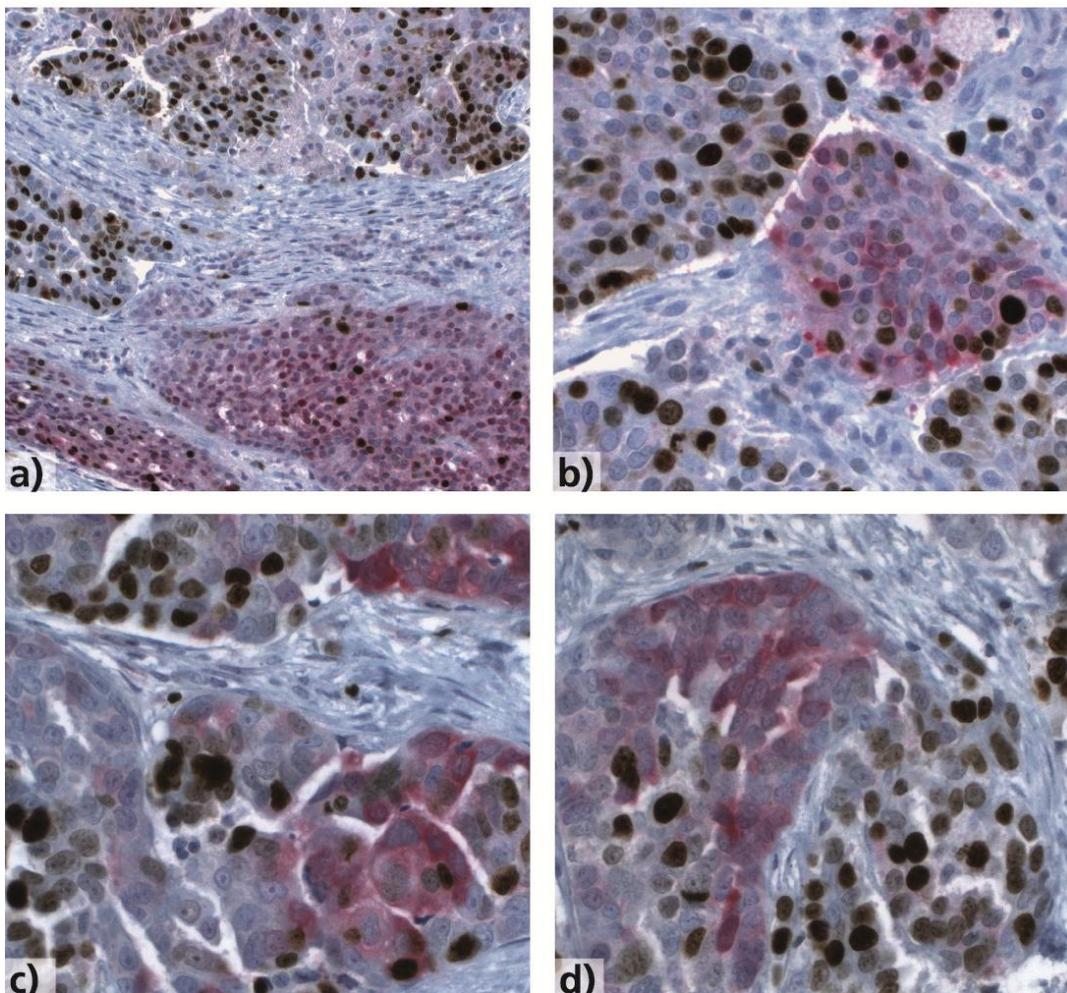


Abb.15 a-d: ALDH1/Ki67 Doppelfärbung zeigt ALDH1-positive Zellfraktionen mit keiner oder nur geringer Proliferationsaktivität, wohingegen Ki67-exprimierende Zellen größtenteils ALDH1-negativ sind.

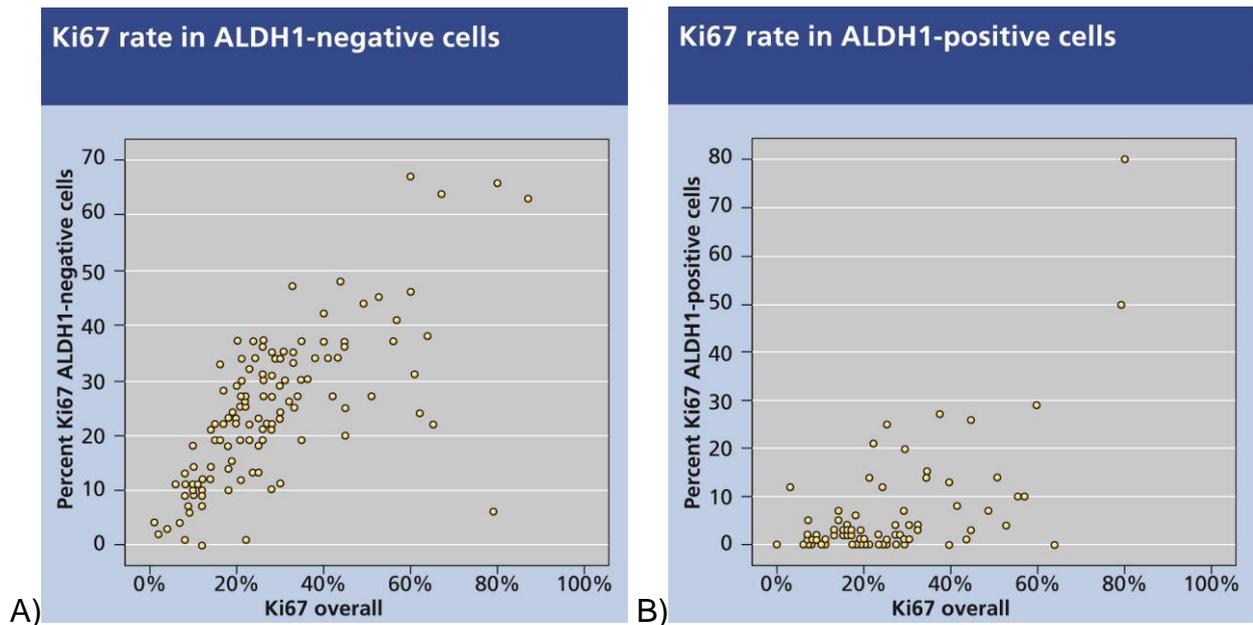


Abb.16: Signifikanter Unterschied in Hinblick auf den Ki67-Index zwischen ALDH1-exprimierender Fraktion und der ALDH1-negativen Zellfraktion.

A: Die Tumoren sind nach steigender Ki67-Rate sortiert aufgeführt, wobei in dieser Graphik ersichtlich wird, dass sich die Mehrheit der proliferierenden Zellen im ALDH1-negativen Kompartiment finden lässt.

B: Signifikant geringere Ki67-Rate in ALDH1-positiven Zellen ($p < 0,001$, T-Test verbundener Stichproben)

Bezogen auf die Ki67-Positivität in Ovarialtumoren konnte eine relevante Korrelation mit der ALDH1-Expressionsrate festgestellt werden und zwar in der Form, dass stark ALDH1-exprimierende Tumoren auch höhere Ki67-Raten vorwiesen und dass geringe Ki67-Werte auch vornehmlich bei ALDH1-negativen oder kaum ALDH1 exprimierenden Tumoren zu finden waren.

Die Mehrheit der stark proliferierenden Tumoren zeigte keine oder nur wenig Expression von Ki67 in gleichzeitig ALDH1-positiven Zellen (Median Ki67-Index 4,4%). Folglich konnte der Großteil der Ki67-positiven Zellen in ALDH1-negativen oder nur gering ALDH1-positiven Tumorzellen ausgemacht werden. Hier fanden sich im Median ein Proliferationsindex der ALDH1-negativen Fraktion von 23,6%, welcher stark mit der Gesamt-Ki67-Rate korrelierte. (Abb. 16A+B)

Der durchschnittliche Unterschied in der Rate von Ki67 positiven Zellen zwischen beiden Kompartimenten, dem ALDH1-positiven ruhenden und dem ALDH1-negativen, stark proliferativ aktiven, betrug 19,1% (95% Konfidenzintervall 16,6 bis 21,7%, p -Wert $< 0,001$, t-Test).

Dies zeigte, dass es sich bei den ALDH1-positiven Zellpopulationen um eher ruhende Zellen handelte, welche wenig proliferierten. Diese Zellpopulation war insbesondere in an sich stark proliferierenden Tumoren nachzuweisen.

Dennoch zeigten vereinzelte Tumoren eine hohe Ki67-Rate sogar in ALDH1-positiven Zellarealen. Hier stellt sich die Frage, ob gerade diese Tumoren eine aggressivere Untergruppe darstellen.

3.4.3 ALDH1/Ki67-Koexpression: kein signifikanter Einfluss auf Gesamtüberleben und Rezidiv-freies Überleben

Im Vergleich der verschiedenen Gruppen von ALDH1- und Ki67-positiven Fällen war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Gesamt-Überlebens und des Rezidiv-freien Überlebens der Patientinnen zu erkennen. Es gab keinen Effekt auf das Überleben zwischen der ALDH1-positiven und der hoch oder wenig proliferierenden Zellfraktion. (Abb.17A+B)

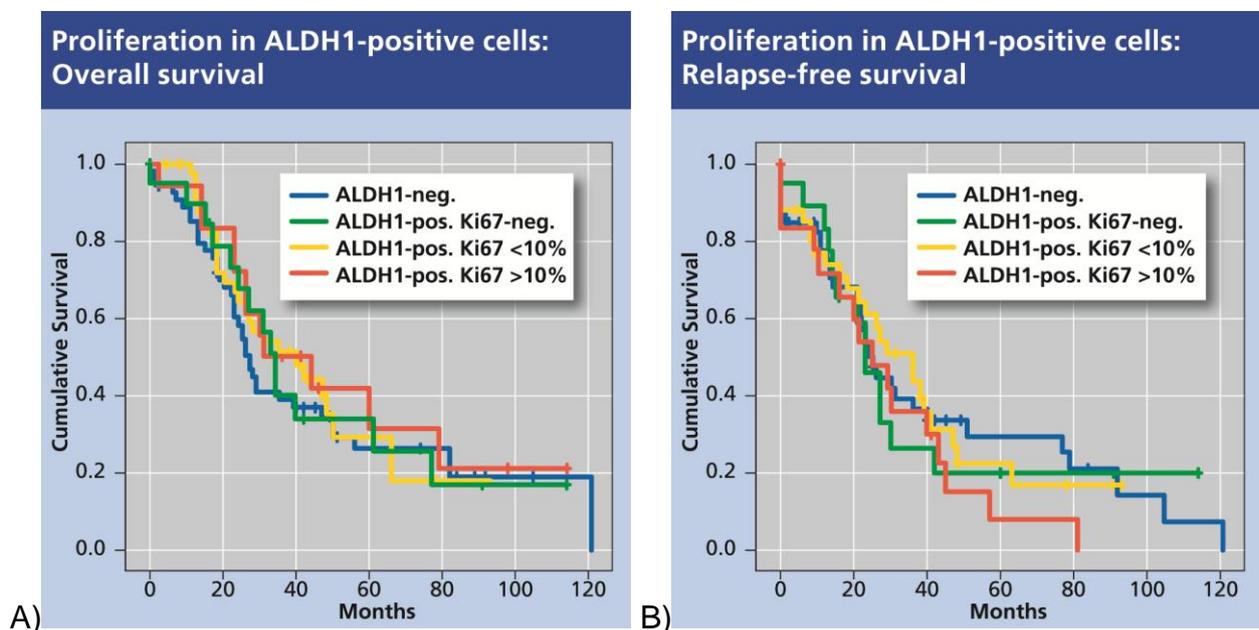


Abb.17: ALDH1/Ki67-Koexpression: Kein signifikanter Einfluss auf das A) Gesamt- ($p=0,882$) wie auch das B) Rezidiv-freie Überleben ($p=0,738$).

Obwohl verschiedene Zellfraktionen innerhalb unserer Kohorte von serösen Ovarialkarzinomen gefunden wurden, gab es keinen signifikanten Einfluss der ALDH1-Positivität und des Prozentsatzes an Ki67-Koexpression auf die Überlebensdaten unserer Kollektiv-Patientinnen. Diese Daten wurden auch nicht durch den Status der Resektion oder optimales Tumor-Debulking beeinflusst.

4 Diskussion

4.1 ALDH1 und SOX2

In unserer Studie nutzten wir einen Gewebemikroarray (Tissue Microarray, TMA), welcher es uns ermöglichte, repräsentative Areale von zahlreichen Tumoren vergleichend zu untersuchen. Analysiert wurden seröse Borderline Tumoren/APST, low-grade und high-grade seröse Ovarialkarzinome. Anhand von Immunhistochemie betrachteten wir die Expression der Stammzellmarker ALDH1 und SOX2.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass wenigstens eine fokale Expression von ALDH1, wenn auch nur in wenigen Zellen, in fast der Hälfte der serösen Ovarialneoplasien nachzuweisen war. ALDH1-Positivität fanden wir in sämtlichen Entitäten mit ähnlicher Expressionsfrequenz, sowohl in low-grade als auch high-grade Karzinomen. Jedoch wiesen weniger als 10% der untersuchten Gewebeproben mehr als 50% ALDH1 positive Zellen auf. (Abb.9) Dies führte uns zu dem Schluss, dass in den meisten Tumoren ALDH1 nur in wenigen stammzellähnlichen Zellen exprimiert wird.

Der embryonale Stammzellmarker SOX2 war häufig in high-grade serösen Karzinomen exprimiert, verbunden mit verbessertem Krankheits-/Rezidiv-freiem Überleben. Unsere Ergebnisse zeigten eine klare Expression von SOX2 von mehr als 10% bzw. 50 % ausschließlich in high grade serösen Ovarialkarzinomen. (Abb. 6)

In vorausgegangenen Studien (Pham et al) beschäftigten wir uns bereits mit der nukleären Expression des Transkriptionsfaktors SOX2 in serösen Ovarialtumoren. Deswegen erfolgte anschließend mittels ALDH1/SOX2-Doppelfärbung als eine der ersten Studien ein direkter Vergleich beider Marker mit Analyse von Koexpression und möglicher Korrelation um mögliche Zellpopulationen zu charakterisieren.

Unsere Experimente zur Koexpression von ALDH1 und SOX2 zeigten, dass die beiden Stammzellmarker unabhängig voneinander in verschiedenen Tumoren nachzuweisen waren. Nur eine Minderheit der Neoplasien zeigt beide Stammzellmarker, welche dann bei den meisten Tumoren auch in unterschiedlichen Zelltypen und verschiedenen Zellfraktionen exprimiert wurden. (Abb. 12)

Frühere Studien beschäftigten sich bereits mit ALDH1-Expression in serösen Ovarialkarzinomen, deren Relevanz für die Tumorbilogie und die Prognose für Patientinnen [15,71,79]. Abhängig vom Cutoff für ALDH1-hoch- oder -niedrig-exprimierende Tumoren (10% oder 1% ALDH1-exprimierende Zellen) beschrieben andere Studien eine ALDH1-Positivität in high-grade serösen Ovarialkarzinomen von zwischen 40% [105] und 74% [106] positive Fälle. In unserer Studie lagen wir mit den HGSC genau im Mittel dieser Ergebnisse mit 42,2% bei einem Cutoff von 1% positiven Zellen.

Wir berichten als eine der ersten Arbeitsgruppen über ALDH1-Expressionsdaten bei serösen Borderline Tumoren und low-grade serösen Karzinomen mit einer ALDH1-Expression von je 48,6% bzw. 40%, was statistisch nicht wesentlich von dem der high-grade serösen Karzinome divergiert. Zur Rolle der ALDH1 bei der Tumorentstehung liegen aus anderen Systemen bereits Studienergebnisse vor [75]. Der Verlust von ALDH1 in Tumorzellen auf deren Weg zur malignen Transformation kann ein entscheidender Punkt innerhalb der Zellbiologie sein, der eine einst gesunde Zelle durch verminderte Entgiftungsfunktion in gestörte Zellprozesse steuert und somit zur Entartung führt. Tritt dies in teilungsfähigen Zellen auf, kann es zu raschem und expansivem Tumorwachstum kommen [74]. Normales ovariellies Oberflächenepithel und Tubengewebe exprimiert ALDH1 in höheren Raten, da aufgrund des regelmäßigen Eisprungs ständige Reize gesetzt werden, das Mikromilieu gestört wird und Reparaturmechanismen greifen müssen. Im Gegensatz hierzu zeigen seröse Ovarialkarzinome und deren Vorläuferläsionen wie beispielsweise die serösen tubaren intraepithelialen Karzinome (STIC) eine reduzierte oder fehlende Expression von ALDH1 [107].

Hinsichtlich des Färbeverhaltens der serösen Ovarialneoplasien war auffällig, dass bei den high-grade serösen Tumoren nahezu 90% der Fälle für zumindest einen der beiden Marker positiv waren, sprich entweder ALDH1 oder SOX2. Dies führt uns zu der Annahme, dass die aggressiven und hoch proliferativ aktiven high-grade serösen Tumoren nahezu allesamt irgendeine Art von Stammzellfaktor exprimierten und wahrscheinlich benötigen. Im Vergleich dazu zeigten low-grade Karzinome und Borderline Tumoren in 50% und in 63,6% keine Expression für jedweden Marker. Auch

die APST oder low-grade Tumoren mit nachweisbarer Expression von ALDH1 oder SOX2 zeigten eine Positivität in deutlich geringerer Anzahl als in HGSC. (Abb.12A)

Vergleicht man die Daten zur Koexpression von ALDH1/SOX2, so zeigten sich nur je rund ein Drittel der low-grade sowie der high-grade Karzinome für beide Marker positiv. Borderline Tumore erwiesen sich in weniger als 10% der Fälle doppelt-positiv. (Abb. 12B)

Dies führte uns zu der Vermutung, dass eine Koexpression von beiden Stammzellmarkern grundsätzlich für tendenziell hochmaligne Tumorgeschehen charakteristischer ist, als für Tumore mit niedrig malignem Potential (BOT/APST).

Richtet man den Fokus auf die Anzahl der Fälle, welche sich ALDH1/SOX2-positiv zeigten und die Koexpression auch in der gleichen Zelle vorkam, so wurden Borderline Tumoren mit nur 6,1% der Fälle bedeutsam, low-grade seröse Karzinome zu ca. 33% und high-grade Karzinome in weniger als 15% der Fälle. Hier beschäftigte uns, ob die doppelt-positiven high-grade Karzinome für die für Prognose und Überleben der Patientinnen von Belang sind. Unsere Daten zeigten, dass diese Annahme nicht bestätigt wird, da kein signifikanter Einfluss der Markerexpression auf Gesamt- und Rezidiv-freies Überleben festgestellt werden konnte (Abb.13), unabhängig von Expressionsmustern.

Alle diese Parameter wurden auf das Überleben der Patientinnen und den prognostischen Effekt der einzelnen Marker evaluiert. Gerade was ALDH1 angeht gibt es in der Literatur bislang kontroverse Diskussionen darüber, ob ALDH1 Expression in Ovarialtumoren nun prognostisch günstig oder ungünstig für die Patientinnen ist [73,79-81].

Liebscher et al. untersuchten EGFR und ALDH1 Expression in high-grade serösen Ovarialkarzinomen und kamen zu dem Ergebnis, dass ALDH1-Expression ein prognostisch ungünstiger Faktor hinsichtlich des Gesamtüberlebens war. Chen et al. und auch Kuroda et al. berichten über vermehrte Chemotherapieresistenz und eine damit verbundene schlechtere Prognose.

Im Gegensatz dazu veröffentlichte Chang et al. 2009 Daten zu günstiger Prognose in ALDH1-exprimierenden serösen Ovarialkarzinomen.

Was den Stammzellofaktor SOX2 allein angeht verhält es sich ähnlich. So wird hier in Studien über einen prognostischen Benefit berichtet, beispielsweise in einer Studie in der die Patientinnen mit Platin-basierter Chemotherapie behandelt wurden [102]. Andere Studien wiederum kamen zu dem Ergebnis, dass SOX2-Expression mit high-grade serösen Ovarialkarzinomen assoziiert ist und zu kürzerer Überlebensdauer führt [79]. Für SOX2 konnte in unseren eigenen Studien bereits gezeigt werden, dass dieser Faktor mit höheren Tumorgraden assoziiert ist und in Korrelation mit diesem Marker ein längeres Rezidiv-freies Überleben demonstriert werden kann (medianes Überleben 27 Monate vs. 21 Monate, $p=0,041$) sowie dass SOX2 einen positiven jedoch nicht signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben hat (39 vs. 25 Monate, $p=0,062$) [102].

Eine aktuelle Studie von Hellner et al. (2016) konnte anhand von Mutationsanalysen eine gehäufte Mutation im SOX2-Repressorgen von benignen Tubenepithelien bei Patientinnen mit high grade serösen Ovarialkarzinomen nachweisen, was zu einer Induktion der SOX2 Expression und somit Expansion der SOX2 Positivität führte. Normale Tubenepithelien von Patientinnen ohne Ovarialkarzinom hingegen waren in der Regel SOX2 negativ. Im Vergleich hierzu konnte bei prophylaktischen Salpinxektomiepräparaten bei Patientinnen mit BRCA1 oder BRCA2 Mutation ebenfalls SOX2 Expression im Tubenepithel nachgewiesen werden. Die SOX2 Expression im Tubenepithel war nicht signifikant beeinflusst vom Tumorstadium, neoadjuvanter Chemotherapie oder vorausgegangener Operation und Tumorexzision [108].

Was die anderen Marker wie Nanog, Oct-4 oder Notch1 angeht, so wollten wir in dieser Studie vor allem die Korrelation mit ALDH1 und SOX2 untersuchen. Da unsere analysierten Gewebe jedoch nur geringe Expressionsraten aufwiesen, konzentrierten wir uns auf die Ergebnisse der ALDH1/SOX2-Doppelfärbungen.

4.2 ALDH1 und Ki67

Frühere Studien zeigten, dass Tumore, welche sich stark ALDH1-positiv darstellten, in Maus-Modellen in vivo schneller und größer wuchsen als Tumore, die ALDH1-negativ waren [81]. Dies führte uns zu der Vermutung, dass es eine bestimmte ALDH1-positive Zellfraktion innerhalb der Tumormasse geben könnte, welche Stammzelleigenschaften besitzt, die die Proliferationsrate beeinflussen und so zu schnellerem Wachstum und Differenzierung des Tumors führen. Bareiss et al. (2012) fanden in ihrer Studie heraus, dass es in high-grade serösen Ovarialkarzinomen eine Korrelation zwischen ALDH1-Positivität und deren Ki67-Indices gibt. Gerade high-grade Karzinome mit ALDH1-positiven Zellen von mehr als 50% zeigten erhöhte Ki67-Raten (Median 40% oder mehr). (Abb.14)

Hier stellt sich die Frage, ob es auf zellulärer Ebene eine Korrelation zwischen ALDH1- und Ki67-Expression innerhalb eines Tumors gibt, und ob ALDH1 und Ki67 womöglich innerhalb der gleichen Zellfraktion gleichzeitig aktiviert sind; ALDH1, als Enzym der Entgiftung, Schutzfaktor der intrazellulären DNA und Garant der ungestörten Proteinsynthese [29,73-76] abhängig oder korrelierend, zusammen mit Ki67, Indexgeber für Proliferation und Teilung. Auf der anderen Seite wäre auch die Korrelation von Ki67 und ALDH1-negativen Zellen mit gesteigerter Proliferationsaktivität durch den Ausfall regulierter Pathways möglich.

Anhand der immunhistochemischen Doppelfärbung wollten wir herausfinden, ob es sich um die gleichen Zellen handelt, welche sowohl ALDH1- als auch Ki67-positiv sind, oder ob es sich um zwei oder mehr zu charakterisierende Zellfraktionen handelt, welche durch Stammzellexpressionsmuster und Proliferationsindices klassifiziert werden könnten.

Wir kamen zu dem Ergebnis, dass es einen signifikanten Unterschied im Expressionsmuster von Ki67 in ALDH1-positiven und -negativen Zellen gab. Wir fanden ALDH1-positive Zellen, welche sich nur geringfügig oder gar nicht Ki67-positiv und somit proliferativ inaktiv zeigten. Auf der anderen Seite wiederum erschien eine zweite Zellfraktion deutlich vermehrt Ki67-exprimierend und gleichzeitig ALDH1-negativ.

Dies demonstrierte uns, dass zwar die Expression von ALDH1 einer signifikanten Korrelation mit dem Ki67-Index folgte, denn Tumore mit hoher ALDH1-Expression

zeigten auch hohe Proliferationsraten. Die Stammzell- und Proliferationseigenschaften wurden jedoch nicht innerhalb der gleichen Zellfraktion gefunden. Somit wurde ALDH1 vornehmlich in ruhenden Zellen exprimiert und hochproliferativ aktive Zellen wiesen kein ALDH1 auf. An dem hier gefundenen ruhenden, ALDH1-positiven Kompartiment lässt sich möglicherweise erklären, warum einige Studien einen positiven prognostischen Einfluss von ALDH1 gefunden haben [71].

Bowen et al. (2009) [109] fand heraus, dass auf ovariellen Oberflächenepithel, welches noch nicht terminal differenziert aber arretiert in einem beruhigten Stadium der Zellteilung war, sich charakteristische Eigenschaften von adulten Stammzellpopulationen nachweisen ließen [24]. Unsere Ergebnisse wurden in der Hinsicht bestätigt, als dass sich offensichtlich verschiedene Zellfraktionen in ovariellen Tumorgewebe beschreiben lassen, welche unterschiedliche Populationen repräsentieren.

Unsere Doppelfärbungsuntersuchungen gehören zu den ersten *in situ* Analysen von Ki67 und ALDH1 in serösen Ovarialtumoren und lassen den Verdacht aufkommen, dass es verschiedene Zellfraktionen innerhalb eines Tumors gibt, welche spezielle Rollen in der Kontrolle der Zellregulation, Proliferation und metabolischen Stabilität im Zellzyklus übernehmen. Unsere Daten führen uns zu der Annahme, dass ALDH1-positive Zellkonglomerate die ruhende Zellfraktion innerhalb eines hoch aggressiven und hoch proliferativen Tumors repräsentieren. Auf der anderen Seite scheint es, als haben proliferativ aktive Zellen ihre ALDH1-Aktivität verloren, was zu einer Störung im regulierten Zellzyklusprozess führt [21]. Schließlich fanden wir wenige Tumoren mit einer signifikanten Zahl an ALDH1-positiven proliferierenden Zellen. Dennoch konnten wir eben dieser Zellpopulation keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamt- bzw. Rezidiv-freie Überleben nachweisen. (Abb.17 A+B)

4.3 Vergleich der Marker

In dieser Studie fand sich keine Korrelation zwischen SOX2 und ALDH1 oder SOX2 und Ki67. Interessanterweise ergab sich aber eine Korrelation zwischen Ki67 und ALDH1, welche zeigte, dass ALDH1 eine Rolle in der Zellproliferation aufwies, unabhängig vom Stammzellphänotyp. Anhand der Doppelfärbung ALDH1/Ki67 konnte gezeigt werden, dass in hoch-proliferativen Tumoren eine Ki67-Färbung vor allem in ALDH1-negativen Zellen gefunden wurde.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die Expression von Stammzellfaktoren in high-grade serösen Ovarialkarzinomen nicht einen bestimmten Phänotyp von Stammzellen repräsentiert, sondern dass es mehrere Arten der stammzellähnlichen Zellpopulationen geben muss. Zudem liegt die Annahme nahe, dass die verschiedenen Faktoren divergent in Assoziation mit klinischen und auch biologischen Parametern stehen müssen und unterschiedlich auf den Tumor und somit die Patientin wirken.

Fokussierend auf das allgemeine Überleben fanden wir in dieser Studie keine signifikante Assoziation von den untersuchten Markern mit Gesamtüberleben oder Rezidiv-freiem Überleben. Auch eine Koexpression der beiden Marker zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben.

Der embryonale Stammzellfaktor SOX2 war häufig in high-grade serösen Karzinomen exprimiert, verbunden mit verbessertem Krankheits-/Rezidiv-freiem Überleben, was möglicherweise an einer Untergruppe der Tumoren liegen könnte, welche besonders sensitiv auf Platin-haltige Chemotherapeutika reagiert.

Im Zusammenhang mit ALDH1 wurden von anderen Arbeitsgruppen weitere Biomarker wie CD133 und der Epitheliale Growth Factor Rezeptor (EGFR) untersucht. CD133 gilt als weiterer Stammzell-like Marker, der mit Eigenschaften der Tumor-Progenitorzellen assoziiert ist und auf eine hohe Selbsterneuerungs-Kapazität der Zellen sowie die Fähigkeit zur aberranten Differenzierung hinweist [110-114]. In aggressiven Ovarial- und Prostatakarzinomen wurden bereits CD133-Expression zusammen mit erhöhten ALDH1-Levels, schlechterer Prognose und vermehrten Chemotherapieresistenzen beschrieben.

Im Vergleich hierzu erwies sich EGFR als mögliches Ziel für Chemotherapie mit beispielsweise Akt Inhibitor III, Gefitinib oder Cyclopamine. In Mammakarzinomen wurden EGFR-Signalelemente in Östrogen-negativen Tumoren gefunden, was darauf hindeutet, dass EGFR in Hormon-unabhängigen Tumoren zur Kanzerogenese beiträgt [115]. EGFR-positive, ALDH1-negative Ovariakarzinome könnten demnach vulnerabler sein als ALDH1-positive aufgrund des Verlusts der Fähigkeit zur Detoxifikation. Dies und die Korrelation zu CD133 bleibt trotz bisheriger Studien weiterhin zu untersuchen [112] und könnte als Ausblick für zukünftige Projekte an unserem Gesamtkollektiv durchgeführt werden.

Unsere Ergebnisse bezüglich der Expression von verschiedenen Stammzellfaktoren in serösen Ovariakarzinomen haben gezeigt, dass diese keinen einzigartigen Stammzell-Phänotyp präsentieren. Vielmehr wurden divergente Assoziationen mit biologischen und klinischen Parametern in den Vordergrund gerückt.

Dennoch stellt das Stammzell-Modell weiterhin einen vielversprechenden Ansatz im Verständnis von Krebserkrankungen dar und sollte gerade in Bezug auf die Entwicklung von neuen Therapeutika verfolgt werden [16]. Ein weiterer Ansatzpunkt könnten potentielle Driver-Mutationen von Stammzellfaktoren in Tubenepithelien sein, die möglicherweise zu Ovariakarzinomen führen, ohne in den Tuben selbst Karzinome oder intraepitheliale Läsionen auszubilden [108].

Die Eradikation von Stammzellen durch gezieltes Angreifen von Target-Proteinen und Enzymen und schließlich die finale Zerstörung der Krebszellen ist auf weite Sicht ein erstrebenswertes Ziel. Dabei sollte jedoch die in dieser Arbeit beschriebene Heterogenität der Stammzellpopulationen mit Expression von unterschiedlichen Stammzellfaktoren berücksichtigt werden.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung: Aktuelle Studien haben gezeigt, dass Tumorstammzellen und die Reexpression von Stammzellfaktoren eine entscheidende Rolle spielen, wenn Ovarialkarzinome chemotherapieresistent werden oder rezidivieren. Um mögliche Marker für diese Prozesse zu ermitteln, führten wir eine immunhistochemische Analyse von Stammzellmarkern an serösen Borderline Tumoren, low-grade und high-grade Karzinomen durch. Doppelfärbungen sollten zeigen, ob individuelle Expressionsmuster und die Koexpression von Stammzellmarkern spezielle pathogenetisch und klinisch relevante Subpopulationen von Tumorzellen charakterisieren.

Material und Methoden: 206 seröse Ovarialtumoren (161 high-grade, 8 low-grade Tumoren, 37 Borderline Tumoren) wurden mittels Immunhistochemie anhand eines Tissue Microarray untersucht. Analysiert wurden diverse Stammzellmarker wie SOX2, ALDH1, c-myc, CD117, Notch1, Oct4 und Nanog, sowie der Proliferationsmarker Ki67. Eine immunhistochemische Doppelfärbung prüfte die prozentuale Expression von Ki67 in ALDH1-positivem und -negativem Gewebe Fall für Fall. Der Einfluss auf Gesamt- und Rezidiv-freies Überleben wurde untersucht. Des Weiteren analysierten wir die Koexpression von SOX2 und ALDH1 in Subpopulationen von einzelnen Tumoren und deren Einfluss auf Gesamt- und Rezidiv-freies Überleben.

Ergebnis: Die Immunhistochemie für ALDH1 zeigte, dass die Mehrheit der Tumoren wenigstens eine fokale Expression von ALDH1 aufweist. Weitere untersuchte Stammzellmarker wurden jeweils in weniger als 10% der Fälle nachgewiesen und in dieser Studie keiner detaillierten Analyse unterworfen. Doppelfärbungsexperimente für ALDH1 und SOX2 zeigten die Expression der Marker in verschiedenen Populationen auf. Fast alle high-grade serösen Karzinome (>90%) zeigten Expression von mindestens einem Stammzellmarker im Vergleich zu nur 36,4 % der BOT und 50% der low-grade serösen Karzinome. Koexpression von SOX2/ALDH1 in mehr als 10% der Tumorzellen in der gleichen Zelle fand sich ausschließlich in high-grade serösen Karzinomen, jedoch nicht in Borderline Tumoren oder low-grade Karzinomen. Des Weiteren beobachteten wir, dass Tumoren mit einer höheren Proliferationsrate mehr ALDH1 positive Zellen aufwiesen, weshalb wir eine Bedeutung von ALDH1 für die Zellproliferation vermuteten. In einer Ki67/ALDH1-Doppelfärbung fanden wir jedoch,

dass ALDH1 vornehmlich in der ruhenden Zellfraktion vorhanden ist, was gut mit einer Funktion als Stammzellpopulation vereinbar ist.

Schlussfolgerung: Die Expression der Stammzellfaktoren wie ALDH1 oder SOX2 scheint vor allem bei high-grade serösen Karzinomen eine essentielle Rolle zu spielen, während sich in einer Mehrheit der BOT und der Hälfte der low-grade Karzinome keiner der beiden Marker nachweisen lässt. Bei high-grade serösen Karzinomen zeigen beide Marker eine unterschiedliche Assoziation mit Tumoreigenschaften wie z.B. schlechte Differenzierung oder Überleben (SOX2) und ruhenden Zellpopulationen in proliferierenden Tumoren (ALDH1). Zudem fanden wir sowohl individuelle als auch Ko-Expressionsmuster von beiden Markern, was die Existenz von Stammzell-ähnlichen Zellfraktionen mit schwankenden Markerprofilen in einzelnen Tumoren vermuten lässt. Anhand dieser Ergebnisse schlussfolgern wir, dass Stammzellfaktoren in serösen Ovarialtumoren keinen einzigartigen Stammzellphänotyp repräsentieren, sondern vielmehr ein breites Spektrum aus Stammzell-angereicherten Kompartimenten, welche bei der Auswahl therapeutischer Ansatzpunkte zu berücksichtigen wären.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper	23-25
Tabelle 2: Antikörperauswertung. Scores und Schemata	27
Tabelle 3: SOX2-Verteilung nach Entitäten	30
Tabelle 4 ALDH1-Verteilung nach Entitäten	35
Tabelle 5: Doppelfärbung ALDH1/SOX2 aufgegliedert nach Mono- und Doppel- positivität	40

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kurman RJ, Hedrick Ellenson L, Ronnett BM, <i>Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract</i> , 6th Edition (2011), Springer: S.725.	8
Abbildung 2: Kurman RJ, Hedrick Ellenson L, Ronnett BM, <i>Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract</i> , 6th Edition (2011), Springer: S.687	10
Abbildung 3: Auswahl der zu stanzenden Tumorblöcke	19
Abbildung 4: Entstehung eines TMA mit anschließender immunhistochemischer Färbung (www.abnova.com).....	20
Abbildung 5: Molekulare Funktionsweise der immunhistochemischen Färbung.....	21
Abbildung 6: SOX2-Expression in serösen Ovarialkarzinomen	30
Abbildung 7A: ALDH1 Immunhistochemie. Auswertung anhand von Scores.....	31
Abbildung 7 B(i) +(ii): Oct4-Färbung in serösem Ovarialkarzinom und in der Kontrolle	32
Abbildung 8: ALDH1-Expression in serösen Ovarialkarzinomen	33
Abbildung 9: ALDH1-Expressionsmuster nach Entitäten.....	34
Abbildung 10 A-B: Einfluss von ALDH1 auf RFS und OS	36-37
Abbildung 11 A+B: ALDH1/SOX2-Doppelfärbung.....	38-39
Abbildung 12 A-D: ALDH1/SOX2-Koexpression	41
Abbildung 13: Doppelfärbung ALDH1/SOX2. Kein Effekt auf das Überleben.....	43
Abbildung 14: Korrelation zwischen durchschnittlichem Ki67-Index und ALDH1-Score in high-grade serösen Ovarialkarzinomen	45
Abbildung 15: ALDH1/Ki67 Doppelfärbung zeigt ALDH1-positive Zellfraktionen mit keiner oder nur geringer Proliferationsaktivität	46
Abbildung 16 A+B: Signifikanter Unterschied in Hinblick auf den Ki67-Index zwischen ALDH1-exprimierender Fraktion und der ALDH1-negativen Zellfraktion	47
Abbildung 17 A+B: ALDH1/Ki67-Koexpression. Kein signifikanter Unterschied auf das A) Gesamt- und B) Rezidiv-freie Überleben	48

8 Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics**. *CA Cancer J Clin* 2011 Mar-Apr. **61**(2): 69-90.
2. R. J. Kurman, L. Hedrick Ellenson, B. M. Ronnett (eds.), **Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract (6th ed), Chapter 14: Surface Epithelial Tumors of the Ovary**, DOI 10.1007/978-1-4419-0489-8_14, © Springer Science+Business Media LLC 2011.
3. Siu MK, Wong ES, Kong DS, Chan HY, Jiang L, Wong OG, Lam EW, Chan KK, NGAN HY, LE XF, Cheung AN: **Stem cell transcription factor NANOG controls cell migration and invasion via dysregulation of E-cadherin and FoxJ1 and contributes to adverse clinical outcome in ovarian cancers**. *Oncogene* 2012 Sept. 25;32(30):3500-9. doi:10.1038/onc.2012.363.
4. McAuliffe SM, Morgan SL, Ayant GA, Tran LT: **Targeting Notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy**. *PNAS* 2012 Oct 23, **109**(43):E2939-48. doi: 10.1073/pnas.1206400109.
5. Cannistra SA: **Cancer of the ovary**. *N Engl J Med*. 2004 Dec 9, **351**(24):2519-29.
6. Van der Burg ME: **Advanced ovarian cancer**. *Curr Treat Options Oncol* 2001. **2**(2):109-118.
7. Van der Burg ME and Vergote I; Gynecological Cancer Group of the EORTC: **The role of interval debulking surgery in ovarian cancer**. *Curr Oncol Rep* 2003. **5**(6):473-481.
8. Kurian AW, Balise RR, McGuire V, Whittermore AS: **Histologic types of epithelial ovarian cancer: have they different risk factors?** *Gynecol Oncol* 2005, **96**: 520-530.
9. Collaborative Group on Epidemiological Studies on Ovarian Cancer: **Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23.257 women with ovarian cancer and 87.303 controls**. *Lancet* 2008, **371**: 303-314.
10. Seidman DJ, Soslow RA, Vang R, Berman JJ, Stoler MH, Sherman ME, Oliva E, Kajdacsy-Balla A, Berman DM, Copeland LJ: **Borderline ovarian tumors: diverse contemporary viewpoints on terminology and diagnostic criteria with illustrative images**. *Human Pathol* 2004, **35**: 918-933.
11. Liu T, Cheng W, Lai D: **Characterization of primary ovarian cancer cells in different culture systems**. *Oncol Reports* 2010, **23**:1277-1284.
12. Boman BM, Wicha MS: **Cancer stem cells: a step toward the cure**. *Clin Oncol*. 2008 Jun 10, **26**(17):2795-9. doi: 10.1200/JCO.2008.17.7436.
13. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF: **Cancer stem cells: models and concepts**. *Annu Rev Med*. Review 2007, **58**:267-84.
14. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR: **Efficient tumor formation by single human melanoma cells**. *Nature* 2008 Dec 4, **456**(7222):593-8. doi: 10.1038/nature07567.
15. Abelson S, Shamai Y, Berger L: **Intramural heterogeneity in the self-renewal and tumorigenic differentiation of ovarian cancer**. *Stem Cells* 2012 Jan 20, **30**:415-424.

16. Wang Z, Li Y, Banerjee S: **Exploitation of the Notch Signaling Pathway as a novel target for Cancer Therapy.** *Anticancer Res.* 2008, **28**:3621-3630.
17. Flesken-Nikitin A, Hwang CI, Cheng CY: **Ovarian surface epithelium at the junction area contains a cancer-prone stem cell niche.** *Nature* 2013 March 24, **495**:241-247.
18. Cariati M, Purushotham AD: **Stem cells and breast cancer.** *Histopathology* 2008 Jan, **52**(1):99-107.
19. Rossi DJ, Jamieson CH, Weissmann IL: **Stem cells and the pathways to aging and cancer.** *Cell* 2008, **132**(4):681-696.
20. Tang C, Ang BT, Pervaiz S: **Cancer stem cell: target for anticancer therapy.** *FASEB J* 2007 Dec, **21**(14):3777-3785.
21. Hu Y, Fu L: **Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients.** *Am J Cancer Res* Review Article 2012, **2**(3):340-356.
22. Steg AD, Bevis KS, Landen CN: **Stem cell pathways contribute to clinical chemoresistance in ovarian cancer.** *Clin Cancer Res* 2012 Feb 1, **18**(3):869-881.
23. Kurman RJ, Vang R, Junge J, Hannibal CG, Kjaer SK, Shih IeM: **Papillary tubal hyperplasia. The putative precursor of ovarian atypical proliferative (Borderline) Serous tumors, noninvasive implants and endosalpingiosis.** *Am J Surg Pathol* 2011 Nov. **35**(11):1605-1614.
24. Seidman JD, Kurman RJ: **Ovarian serous borderline tumors: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators.** *Human Pathol* 2000, **31**:539-357.
25. Ness RB, Modugno F: **Endometriosis as a model for inflammation-hormone interactions in ovarian and breast cancers.** *Eur J Cancer* 2006, **42**: 691-703.
26. Salvador S, Gilks B, Kobel M, Huntsman D, Rosen B, miller D: **The fallopian tube: primary site of most pelvic high grade serous carcinomas.** *Int J Gynecol Cancer* 2009, **19**: 58-64.
27. Furuya M, Suyama T, Usui H, Kasuya Y, Nishiyama M, Tanaka N, Ishiwata I, Nagai Y, Shozu M, Kimura S: **Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis.** *Hum Pathol* 2007, **38**: 1676-1687.
28. Seidman JD, Sherman ME, Bell KA, Katabuchi H, O'Leary TJ, Kurman RJ: **Salpingitis, salpingoliths and serous tumors of the ovaries: is there a connection?** *Int J Gynecol Pathol* 2002, **21**: 101-107.
29. R. J. Kurman, L. Hedrick Ellenson, B. M. Ronnett (eds.), **Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract** (6th ed.) Chapter 11: Diseases of the Fallopian Tube and Paratubal Region, DOI 10.1007/978-1-4419-0489-8_14, © Springer Science+Business Media LLC 2011.
30. Chobanian N and Dietrich 3rd CS: **Ovarian cancer.** *Surg Clin North Am* 2008. **88**(2):285-299.
31. RJ Kurman, ML Carcangiu, CS Herrington, RH Young: **IARC WHO Classification of Tumours. WHO Classification of Tumors of the Female Reproductive Organs.** Lyon: IARC Press, 2014.
32. Orford KW, Scadden DT: **Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation.** *Nat Rev Genet.* 2008 Feb, **9**(2):115-128.
33. Singer G, Oldt R 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih IeM: **Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma.** *J Natl Cancer Inst* 2003, **95**: 484-486.

34. Singer G, Stöhr R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, Cao DF, Wang TL, Kurman RJ, Shih leM: **Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation.** *Am J Surg Pathol* 2005, **29**: 218-224.
35. Kurman RJ, Shih le M: **Pathogenesis of ovarian cancer: Lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications.** *Int J Gynecol Pathol.* 2008, **27**:151-160.
36. Ahmed N: **Cancerous ovarian stem cells: Obscure targets for therapy but relevant to chemoresistance.** *J Cellular Biochemistry* 2013, **114**:21-34.
37. He QZ: **Isolation and characterization of cancer stem cells from high-grade serous ovarian carcinoma.** *Cell Physiol Biochem* 2014 Jan, **33**:173-184.
38. Crum CP: **Through the glass darkly: intraepithelial neoplasia, top-down differentiation and the road to ovarian cancer.** *J Pathol* 2013 March, **231**:402-412.
39. Kim J, Coffey DM, Creighton CJ: **High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model.** *PNAS* 2012 March 6, **109**(10):3921-3926.
40. Dubeau L et al.: **The cell of origin of ovarian epithelial tumours.** *Lancet Oncol* 2008. **9**(12):1191-1197.
41. Kuhn E, Meeker A, Wang TL, Sehdev AS, Kurman RJ, Shih leM: **Shortened telomeres in serous tubal intraepithelial carcinoma: an early event in ovarian high-grade serous carcinogenesis.** *Am J Surg Pathol* 2010. **34**(6):829-836.
42. Mehrad M, Ning G, Chen EY, Mehra KK, Crum CP: **A pathologist's road map to benign, precancerous, and malignant intraepithelial proliferations in the fallopian tube.** *Adv Anat Pathol* 2010. **17**(5):293-302.
43. Piek JM, Verheijen RH and van Diest PJ: **Tubal and ovarian pathways to pelvic epithelial cancer: a pathological perspective.** *Histopathol* 2009. **54**(4):494-495.
44. Crum CP et al.: **Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer.** *Clin Med Res* 2007. **5**(1):35-44.
45. Heller DS, Murphy P, Westhoff C: **Are germinal inclusion cysts marker of ovulation?** *Gynecol Oncol* 2005, **96**: 496-499.
46. Seidman JD, Wang B: **Evaluation of normal-sized ovaries associated with primary peritoneal serous carcinoma for possible precursors of ovarian serous carcinoma.** *Gynecol Oncol* 2007, **106**: 201-206.
47. Kurman RJ, Shih leM: **The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory.** *Am J Surg Pathol* 2010, **34**: 433-443.
48. Piek JMJ, Kenemans P, Verheijen RHM: **Interperitoneal serous adenocarcinoma: a critical appraisal of three hypotheses on its cause.** *Am J Obstet Gynecol* 2004, **191**: 718-732.
49. Park JT, Li M, Nakayama K, Mao TL, Davidson B, Zhang Z, Kurman RJ, Eberhart CG, Shih leM, Wang TL: **Notch3 gene amplification in ovarian cancer.** *Cancer Res* 2006. **66**(12):6312-6318.
50. Staebler A, KArberg B, Behm J, Kuhlmann P, Neubert U, Schmidt H, Korsching E, Bürger H, Lelle R, Kiesel L, Böcker W, Shih leM, Buchweitz O: **Chromosomal losses of regions on 5q and lack of high-level amplifications at 8q24 are**

- associated with favorable prognosis for ovarian serous carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2006. **45**(10):905-917.
51. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH: **SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas.** *Nat Genet* 2009 Nov, **41**(11): 1238-42.
 52. Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl AC, Scheble VJ, Maier S, Reischl M, Mikut R, Altorki NK, Moch H, Fend F, Staelber A, Bass AJ, Meyerson M, Rubin MA, Soltermann A, Lengerke C, Perner S: **SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer.** *Mod Pathol* 2011. **24**(7):944-953.
 53. Sanada Y, Yoshida K, Konishi K: **Expression of gastric mucin MUC5AC and gastric transcription factor SOX2 in ampulla of Vater adenocarcinoma: comparison between expression patterns and histologic subtypes.** *Oncology Reports* 2006 May, **15**(5):1157-61.
 54. Socorro M RP, Sarrio D, Moreno-Bueno G, Palacios J: **SOX-2: a possible driver of the basal like phenotype in sporadic breast cancer.** *Modern Pathol* 2007 March 2, **20**:474-481.
 55. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDouglass OA, Cho KR, Fearon ER: **p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor suppressor genes.** *Curr Biol* 2007, **17**: 1298-1307.
 56. Kuo KT, Buan B, Feng Y, Mao TL, Chen X, Jinawath N, Wang Y, Kurman RJ, Shih IeM, Wang TL: **Analysis of DNA copy number alterations in ovarian serous tumors identifies new molecular genetic changes in low-grade and high-grade carcinomas.** *Cancer Res* 2009, **69**: 4036-4042.
 57. Leitao MM, Soslow RA, Baergen RN, Olvera N, Arroyo C, Boyd J: **Mutation and expression of the TP53 gene in early stage epithelial ovarian carcinoma.** *Gynecol Oncol* 2004, **93**: 301-306.
 58. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, Callahan MJ, Garner EO, Gordon RW, Birch C, Berkowitz RS, Muto MG, Crum CP: **Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pericervical serous carcinoma: evidence for a causal relationship.** *Am J Surg Pathol* 2007, **31**: 161-169.
 59. Merajver SD, Pham TM, Caduff RF, Chen M, Poy EL, Cooney KA, Weber BL, Collins FS, Johnston C, Frank TS: **Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumours.** *Nature Genet* 1995, **9**: 439-443.
 60. Nakayama K, Nakayama N, Kurman RJ, Cope L, Pohl G, Samuels Y, Velculescu VE, Wang TL, Shih IeM: **Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms.** *Cancer Biol Ther* 2006, **5**: 779-785.
 61. Willner J, Wurz K, Allison KH, Galic V, Garcia RL, Goff BA, Swisher EM: **Alternate molecular genetic pathways in ovarian carcinomas of common histological types.** *Hum Pathol* 2007, **38**: 607-613.
 62. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN: **A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif.** *Nature* 1990. **346**(6281):240-244.
 63. Werner MH and Burley SK: **Architectural transcription factors: proteins that remodel DNA.** *Cell* 1997. **88**(6):733-736.

64. Wolffe AP: **Architectural transcription factors**. *Science* 1994. **264**(5162):1100-1101.
65. Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L: **Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3**. *Genes Dev* 1995. **9**(21):2635-2645.
66. Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badge R: **A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2**. *Development* 1996. **122**(2):509-520.
67. Takahashi K and Yamanaka S: **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors**. *Cell* 2006. **126**(4):663-676.
68. de Jong J, Stoop H, Gaillis AJ, van Gurp RJ, van de Geijn GJ, Boer Md, Hersmus R, Saunders PT, Anderson RA, Oosterhuis JW, Looijenga LH: **Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications**. *J Pathol* 2008. **215**(1):21-30.
69. Ye F, Li Y: **Expression of SOX2 in human ovarian epithelial carcinoma**. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011, **137**:131-1372011.
70. Fong H, Hohenstein K.A. and Donovan PJ: **Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells**. *Stem Cells* 2008. **26**(8):1931-1938.
71. Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KF, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Bützow R, Coukos G, Zhang L: **Distinct Expression Levels and Patterns of Stem Cell Marker, Aldehyde Dehydrogenase Isoform 1 (ALDH1), in Human Epithelial Cancers**. *PLoS One* 2010 Apr. **5**(4):e10277.
72. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Donru G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM: **Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (SC) and Tracks SC Overpopulation during Colon Tumorigenesis**. *Cancer Res* 2009 April. **69**(8):3382-9.
73. Kuroda T, Hirohashi Y, Torigoe T, Yadusa K, Takayashi A, Asanuma H, Morita R, Mariya T, Asano T, Mizuuchi M, Saito T, Sato N: **ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis**. *P-one* 2013 June 6, **8**(6):e65158.
74. Silva IA, Bai S, McLean K: **Aldehyde Dehydrogenase in Combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival**. *Cancer Res* 2011 April 15, DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-3175.
75. Li H, Bitler BG, Vathipadiekal V: **ALDH1 is a novel EZH2 target gene in epithelial ovarian cancer identified by genome-wide approaches**. *Cancer Prev Res* 2012, **5**:484-491.
76. Hu Y, Fu L: **Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients**. *Am J Cancer Res Review Article* 2012, **2**(3):340-356.
77. Wang YC, Yo YT, Lee HAT: **ALDH1-bright epithelial ovarian cancer cells are associated with CD44 expression, drug resistance, and poor clinical outcome**. *Am J Pathol* 2012 March, **180**(3):1159-69. doi :10.1016/j.ajpath.2011.11.015.

78. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G: **ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome.** *Cell Stem Cell* 2007, **1**(5):555-67. Doi:10.1016/j.stem.2007.08.014.
79. Chen X: **Cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, and drug resistance in high-grade ovarian serous carcinoma.** *Human Pathol* 2013 May 1, **44**:2373-2384.
80. Chang B, Liu G, Xue F: **ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers.** *Mod Pathol* 2009 Jun; **22**(6): 817-23.
81. Liebscher CA, Prinzler J: **Aldehyde Dehydrogenase 1/Epidermal Growth Factor Receptor coexpression is characteristic of a highly aggressive, poor-prognosis subgroup of high-grade serous ovarian carcinoma.** *Human Pathol* 2012, **44**:1465-1471.
82. Ji Y, Sheng L, Du X: **Clinicopathological variables predicting HER-2 gene status in immunohistochemistry-equivocal(2+) invasive breast cancer.** *J Thor Dis.* 2014, **6**(7):896-904.
83. Yagi T, Inoue N, Yanai A: **Prognostic significance of geminin expression levels in Ki67-high subset of estrogen receptor-positive and HER2-negative breast cancers.** *Breast Cancer* 2014 Aug 1; PMID:25082658 [e-pub ahead of print]. doi: 10.1007/s12282-014-0556-9.
84. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S: **The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.** *Cell* 2003 May. **113**(5):631-642.
85. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A: **Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.** *Cell* 2003. **113**(5):643-655.
86. Hart AH, Hartley L, Ibrahim M, Robb L: **Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human.** *Dev Dyn* 2004. **230**(1):187-198.
87. Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJ, van Roozendaal KE, van Zoelen EJ, Weber RF, Wolffenbuttel KP, van Dekken H, Honecker F, Bokemeyer C, Perlman EJ, Schneider DT, Kononen J, Sauter G, Oosterhuis JW: **POU5F1 (Oct3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors.** *Cancer Res* 2003. **63**(9):2244-2250.
88. Pesce M, Schöler HR: **Oct4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development.** *Stem Cells* 2001. **19**(4):271-278.
89. Pan G, Thomson JA et al.: **Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency.** *Cell Res* 2007. **17**(1):42-49.
90. Cormier S, Le Bras S, Souilhol C, Vandormael-Pournin S, Durand B, Babinet Ca, Baldacci P, Cohen-Tannoudji M: **The murine ortholog of notchless, a direct regulator of the notch pathway in Drosophila melanogaster, is essential for survival of inner cell mass cells.** *Mol Cell Biol* 2006. **26**(9):3541-3549.
91. Mumm JS and R Kopan: **Notch signaling: from the outside in.** *Dev Biol* 2000. **228**(2):151-165.
92. Schweisguth F: **Regulation of notch signaling activity.** *Curr Biol* 2004 Feb. **14**(3):R129-R138.

93. Joutel A, Tournier-Lasserre E: **Notch signaling pathway and human diseases.** *Semin Cell Dev Biol* 1998. **9**(6):619-25.
94. Kim SB, Chae GW, Lee J, Park J, Tak H, Chung JH, Park TG, Ahn JK, Joe CO: **Activated Notch1 interacts with p53 to inhibit its phosphorylation and transactivation.** *Cell Death Differ* 2007. **14**(5):982-91. Epub 2006 Dec.
95. Mason DY, Cordell JL, Brown MH, Borst J, Jones M, Pulford K, Jaffe E, Ralfkiaer E, Dallenbach F, Stein H: **CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples.** *Blood* 1995. **86**:1453-9.
96. Comans-Bitter WM, De Bruin-Versteeg S, Broe MK, De Groot R, De Vries E, Van Dongen JJM: **CD79 workshop: intracellular CD79 expression in precursor B cells tested with the CD79 panel of monoclonal antibodies.** In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. **Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th international workshop and conference;** 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: *Garland Publishing Inc.*;1997.p.182-4.
97. Nisen PD, Zimmerman KA, Cotter SV, Gilbert F, Alt FW: **Enhanced expression of the c-myc gene in Wilms' tumors.** *Cancer Res* 1986 Dec. **46**(12Pt 1):6217-22.
98. Nau MM, Brooks BJ, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch IR, McBride OW, Bertness V, Hollis GF, Minna JD: **L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer.** *Nature* 1985 Nov. **318**(6041):69-73.
99. Gupta S, Seth A, Davis RJ: **Transactivation of gene expression by myc is inhibited by mutation at the phosphorylated sites Thr-58 and Ser-62.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 April. **25**,**90**(8):3216-20.
100. Cheuk W, Wong KOY, Wong CS, Chan JK: **Consistent immunostaining for Cyclin D1 can be achieved in a routine basis using a newly available rabbit monoclonal antibody.** *Am J Surg Pathol* 2004. **28**(6):801-807.
101. De Leon ED, Alkan S, Huang JC, His ED: **Usefulness of an immunohistochemical panel in paraffin-embedded tissues for the differentiation of B-cell non-Hodgkin's lymphomas of small lymphocytes.** *Modern Pathology* 1998. **11**(11):1046-1051.
102. Pham DL, Scheble V, Bareiss P, Fischer A, Beschoner C, Adam A, Bachmann C, Neubauer H, Boesmueller H, Kanz L, Wallwiener D, Fend F, Lengerke C, Perner S, Fehm T, Staebler A: **SOX2 expression and prognostic significance in ovarian carcinoma.** *Int J Gynecol Oncol* 2013 Jul. **32**(4):358-367. doi:10.1097/PGP.0b013e31826a642b.
103. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S.: **The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques.** *J Histochem Cytochem* 1979. **27**(8):1131-9.
104. Yu J, Vodyanik MA: **Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.** *Science* 2007 Dec 21, **318**(5858):1917-20.
105. Deng S: **Distinct Expression Levels and Patterns of Stem Cell Marker, Aldehyde Dehydrogenase Isoform 1 (ALDH1), in Human Epithelial Cancers.** *P-one* 2010 April 21, **5**(4):e10277.
106. Landen CN, Jr., Goodman B, Katre AA, Steg AD, Nick AM, Stone RL, Miller LD, Mejia PV, Jennings NB, Gershenson DM, Bast RC, Jr., Coleman RL, Lopez-Berestein G, Sood AK: **Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in ovarian cancer.** *Mol Cancer Ther* 2010 Dec, **9**(12):3186-99.

107. Chui MH, Wang Y, Wu RC, Seidmann JD, Kurman RJ, Wang TL, Shih IM: **Loss of ALDH1A1 expression is an early event in the pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma.** *Mod Pathol* 2015 Mar, **28**(3):437-45.
108. Hellner K, Miranda F, Fotso Chedom D, Herrero-Gonzalez S, Hayden DM, Tearle R, Artibani M, KaramiNejadranjbar M, Williams R, Gaitskell K, Elorbany S, Yu R, Laios A, Buiga P, Ahmed K, Dhar S, Zhang RY, Campo L, Myers KA, Lozano M, Ruiz-Miró M, Gatus S, Mota A, Moreno-Bueno G, Matias-Guiu X, Benítez J, Witty L, McVean G, Leedham S, Tomlinson I, Drmanac R, Cazier JB, Klein R, Dunne K, Bast RC Jr, Kennedy SH, Hassan B, Lise S, Garcia MJ, Peters BA, Yau C, Sauka-spengler T, Ahmed AA: **Premalignant SOX2 overexpression in the fallopian tubes of ovarian cancer patients: Discovery and validation studies.** *EBioMed* 2016 Jul, **10**:137-149.
109. Bowen NJ: **Gene expression profiling supports the hypothesis that human ovarian surface epithelia are multipotent and capable of serving as ovarian cancer initiating cells.** *BMC Medical Genomics* 2009 Dec 29, **2**:71, doi:10.1186/1755-8794-2-71.
110. Mimeault M and Batra SK: **Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Feb; **23**(2): 234-254. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0785.
111. Baba T, Convey PA, Matsumura N: **Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells.** *Oncogene* 2009; **28**: 209-218.
112. Ricci F, Bernasconi S, Porcu L: **ALDH enzymatic activity and CD133 positivity and response to chemotherapy in ovarian cancer patients.** *Am J Cancer Res* 2013; **3**(2): 221-229.
113. Kryczek I, Liu S, Roh M: **Expression of ALDH and CD133 defines ovarian cancer stem cells.** *Int J Cancer* 2012 Jan 1; **130**(1): 29-39. doi: 10.1002/ijc.25967.
114. Zhang J, Guo X, Chang DY: **CD133 expression associated with poor prognosis in ovarian cancer.** *Mod Pathol* 2012; **25**: 456-464.
115. Creighton CJ: **A gene transcription signature associated with hormone independence in a subset of both breast and prostate cancers.** *BMC Genom* 2007; **8**: 199.

9 Anhang

9.1 FIGO Klassifikation

I		Tumor begrenzt auf Ovarien oder Tuben
	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars oder der Tube , negative Spülzytologie
	IB	Tumor auf beide Ovarien oder Tuben begrenzt; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche der beiden Ovarien oder Tuben, negative Spülzytologie
IC		Tumor auf ein oder beide Ovarien oder Tuben begrenzt
	IC1	Verletzung der Oberfläche intra-operativ
	IC2	Kapselruptur prä-operativ oder Tumorzellen an der Ovaroberfläche
	IC3	Maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülung
II		Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im kleinen Becken aus oder primäres Peritonealkarzinom
	IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate Uterus und/oder Tube(n)
	IIB	Ausbreitung auf andere intraperitoneale Beckengewebe
III		Tumor befällt ein oder beide Ovarien, mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
IIIA		Positive retroperitoneale Lymphknoten
	IIIA1(i)	Metastasen ≤ 10mm
	IIIA1(ii)	Metastasen > 10mm
	IIIA2	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens ± positive retroperitoneale Lymphknoten
	IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, ≤ 2cm ± positive retroperitoneale Lymphknoten, inklusive Ausbreitung bis auf Leber- und Milzkapsel
	IIIC	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, > 2 cm ± retroperitoneale Lymphknotenmetastasen, inklusive Ausbreitung bis auf Leber- und Milzkapsel

IV		Fernmetastasen (Peritonealmetastasen ausgenommen)
	IVA	Positiver Pleuraerguss
	IVB	Leber- und/oder Milzmetastasen (parenchymal), extraabdominelle Organmetastasen (inklusive inguinale Lymphknoten und Lymphknoten außerhalb der Abdominalhöhle)

10 Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, Anna Fischer, geboren 24.11.1987 in Frankenthal (Pfalz), dass sämtliche Datenerhebungen, Auswertungen sowie das Sichten des Paraffinmaterials und die Auswahl der Gewebe zur Erstellung von TMAs von mir persönlich und zum Teil in einem zweiten Durchlauf von meiner Betreuerin und Doktormutter Frau PD Dr. A. Staebler durchgeführt wurden, ohne Hilfe von Dritten.

Die Erstellung des ersten Kollektivs (high-grade und low-grade seröse Ovarialkarzinome) wurde von Frau Dr. D. Pham ausgeführt. Die Erstellung des Kollektivs der Borderline Tumoren von mir selbst.

Sämtliche Auswertungen und Analysen wurden mithilfe von Frau PD Dr. A. Staebler angefertigt.

Frau C. Beschorner fertigte die TMAs an und war für die Dokumentation deren Zusammenstellung verantwortlich.

Herr W. Vogel war für die technische Umsetzung im Bereich TMA-Schnitte zur immunhistochemischen Färbung verantwortlich.

Frau A. Adam etablierte und kalibrierte die immunhistochemischen Mono- und Doppelfärbungen.

11 Danksagung

Der größte Dank gebührt meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Dr. Annette Staebler, die Wochen, Tage und Stunden mit mir zubrachte, um sämtliche Auswertungen durchzugehen, kritisch zu prüfen und gegen Ende als penible Leserin einen langwierigen Prozess zu einem würdigen Abschluss zu bringen.

Ein besonderer Dank gilt Anne Adam und Wenzel Vogel, die mit Geduld und Sorgfalt jede immunhistochemische Färbung durchführten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Christine Beschorner für ihre präzise Erstellung und Bearbeitung des Tissue Microarrays.

Zudem bedarf es immer einer Einarbeitung, Erklärung der Routineabläufe und wo was zu finden ist. Daher bedanke ich mich sehr bei meiner Vorgängerin und Kollegin Frau Dr. Deborah Pham.

12 Lebenslauf

Siehe Anhang 1