

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

**Analyse von Biomarkern
- einzeln oder als Zweierkombinationen - in der präoperativen
Diagnostik von Patientinnen mit Ovarialtumoren**

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

vorgelegt von

Maj Kristin Freydanck
aus Bad Hersfeld

München 2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Michael Fiegl
Prof. Dr. med. Adelbert Roscher

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Christoph Scholz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen
Prüfung: 10.10.2013

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ovarialkarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	1
1.1.3 Histologische Klassifikation	2
1.1.4 Tumorausbreitung und Fernmetastasierung	4
1.1.5 Stadieneinteilung	5
1.1.6 Früherkennung	5
1.1.7 Prognosefaktoren	6
1.1.8 Therapie	7
1.1.9 Nachsorge	7
1.2 Tumormarker	8
1.3 Biomarker	9
1.3.1 Muzin-Glykoproteine CA 125 und CA 72-4	9
1.3.1.1 Cancer Antigen 125.....	9
1.3.1.2 Cancer Antigen 72-4.....	11
1.3.2 Human Epididymis Specific Protein 4 (HE4)	12
1.3.3 Die Galektine-1 und -3.....	13
1.3.3.1 Galektin-1	14
1.3.3.2 Galektin-3	16
1.4 Fragestellung.....	19
2. Patientinnen, Material und Methoden	21
2.1 Patientinnen.....	21
2.1.1 Kollektiv I	21
2.1.2 Kollektiv II	25

2.2	Verwendete Geräte, Chemikalien, Lösungsansätze und Antikörper	30
2.2.1	ELISA	30
2.2.2	Immunhistochemie	30
2.3	Festphasen-ELISA-Sandwich-Verfahren (schematisch)	32
2.3.1	Bestimmung von CA 125.....	34
2.3.2	Bestimmung von CA 72-4.....	34
2.3.3	Bestimmung von HE4.....	34
2.3.4	Bestimmung von Galektin-1	35
2.3.5	Bestimmung von Galektin-3	36
2.4	Immunhistochemie	38
2.4.1	In situ-Immunlokalisation von Galektin-1 und Galektin-3	38
2.4.2	Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte.....	42
2.5	Statistische Analyse	43
3.	Ergebnisse.....	45
3.1	Bestimmung von CA 125, CA 72-4, HE4, Galektin-1 und Galektin-3 im Serum	45
3.1.1	CA 125.....	45
3.1.2	CA 72-4	47
3.1.3	HE4.....	49
3.1.4	Mouse-Galektin-1	51
3.1.5	Galektin-3	53
3.1.6	Übersicht über die Verteilung der Messergebnisse.....	55
3.1.7	Korrelationsanalyse	58
3.1.7.1	Korrelation unabhängig von der Dignität der Befunde.....	58
3.1.7.2	Korrelation in Abhängigkeit von der Dignität der Befunde	60
3.1.8	Zweierkombinationen verschiedener Biomarker	61
3.1.9	Weitere Untersuchungen.....	62

3.2 Untersuchung der Expression von Galektin-1 und Galektin-3 in histologischen Präparaten	63
3.2.1 Galektin-1	63
3.2.1.1 Expression im Tumor.....	63
3.2.1.2 Expression im Stroma	64
3.2.2 Galektin-3	68
3.2.2.1 Expression im Tumor.....	68
3.2.2.2 Expression im Stroma	69
3.2.3 Übersicht über die Verteilung der Ergebnisse	72
3.2.4 Korrelationsanalyse	73
3.2.4.1 Korrelation unabhängig von der Dignität der Befunde.....	73
3.2.4.2 Korrelation in Abhängigkeit von der Dignität der Befunde	74
4. Diskussion.....	76
4.1 Biomarker	76
4.1.1 Der Biomarker CA 125 und seine Bedeutung für Früherkennung und Diagnostik.....	76
4.1.2 Der Biomarker CA 72-4 und seine Bedeutung für die Früherkennung und Diagnostik im Vergleich zu CA 125	78
4.1.3 Der Biomarker HE4 und seine Bedeutung für Früherkennung und Diagnostik im Vergleich zu CA 125	81
4.1.4 Die Galektine 1 und 3 und ihre Bedeutung als Biomarker für die Diagnostik des Ovarialkarzinoms	83
4.1.4.1 Galektin-1	83
4.1.4.2 Galektin-3	84
4.1.5 Korrelation einzelner Marker	86
4.1.6 Kombination von Biomarkern und Anwendbarkeit in der Praxis.....	88
4.2. Interpretation der Expressionsmuster der Galektine 1 und 3 in malignen und benignen Tumoren des Ovars unter Berücksichtigung ihrer Rolle in Tumorimmunologie und Metastasierung	90
4.2.1 Expression von Galektin-1 in malignen und benignen Tumoren und dem umgebenden Stroma	90

4.2.2 Expression von Galektin-3 in malignen und benignen Tumoren und dem umgebenden Stroma	92
4.2.3 Korrelation der Expression von Galektin-1 und -3	93
4.3 Klinische Relevanz und Ausblick	95
5. Zusammenfassung	97
6. Literaturverzeichnis	99
7. Verwendete Abkürzungen	108
8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	110
8.1 Abbildungen	110
8.2 Tabellen	112
9. Danksagung	115
10. Vorabpublikationen	117

1. Einleitung

1.1 Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das epitheliale Ovarialkarzinom steht in Deutschland nach dem Mamma-, Kolon-, Bronchial- und Endometriumkarzinom mit einem Anteil von 4,8 % an fünfter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen bei Frauen. In Deutschland erkranken jährlich etwa 9600 Frauen an einem malignen Ovarialtumor (Burges and Schmalfeldt, 2011). Die Erkrankungsraten sind in den letzten 20 Jahren in etwa konstant geblieben, die Fünfjahresüberlebensrate ist seit 1988 von 35 % auf 41 % gestiegen. Die höchste Inzidenz des epithelialen Ovarialkarzinom findet sich in der 7. Lebensdekade (Engel et al., 2007).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist auch heute noch nicht vollständig geklärt. Zu 90 % sind somatische Mutationen, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Aktivierung von Onkogenen oder zu veränderter Expression von Wachstumsfaktoren führen, die Ursache der malignen Entartung. In 10 % der Fälle liegt eine Keimbahnmutation der Tumorsuppressorgene BRCA1 oder BRCA2 und somit ein so genanntes familiäres Ovarialkarzinom vor (Runnebaum, 2009). Frauen mit Mutationen im BRCA1-Gen haben ein Risiko von 40 % bis zum 70. Lebensjahr an einem Ovarial- und ein Risiko von 65 % an einem Mammakarzinom zu erkranken. Bei Frauen mit BRCA2-Mutationen beträgt das Ovarialkarzinomrisiko 11 % und das Mammakarzinomrisiko 45 %. Auch bei Frauen in deren Familie hereditäre, nicht polypöse Kolonkarzinome („Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer“ HNPCC) vorkommen, ist das Risiko an einem malignen Ovarialtumor zu erkranken auf 10-12 % erhöht (Kuschel et al., 2007). Neben einer positiven Familienanamnese wurden noch weitere Faktoren identifiziert, die mit einem erhöhten Karzinomrisiko verbunden sind. Davon ausgehend, dass die erhöhte Proliferation des ovariellen Oberflächenepithels nach einer Follikelruptur Gelegenheit zur Entstehung von Mutationen bietet, führt eine erhöhte Zahl von Ovulationen, etwa bei früher Menarche, später Menopause oder Nulliparität, zu einer Risikosteigerung

(Runnebaum, 2009, Hennessy et al., 2009). Die Einnahme von Ovulationshemmern sowie Schwangerschaft und Stillen sollen dagegen protektiv wirken (Hennessy et al., 2009). Es wird diskutiert, ob auch erhöhte Konzentrationen des luteinisierenden Hormons (LH), des follikelstimulierenden Hormons (FSH) oder von Androgenen das Risiko erhöhen (Schorge et al., 2010, Hennessy et al., 2009). Dafür spricht, dass Patientinnen mit einem Polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS) ein erhöhtes Karzinomrisiko zu haben scheinen.

Weißer Hautfarbe oder Wohnort in Nordamerika, Nordeuropa oder Israel sowie höheres Alter sind ebenso Risikofaktoren, wie eine über mehr als 10 Jahre durchgeführte Hormonersatztherapie.

Ein niedrigeres Ovarialkarzinomrisiko haben Frauen mit Zustand nach Hysterektomie oder Tubenligatur.

Möglicherweise senkt der Gebrauch von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) das Karzinomrisiko entsprechend der Hypothese, dass entzündliche Reize die Suszeptibilität für Mutationen erhöhen (Schorge et al., 2010).

1.1.3 Histologische Klassifikation

Das Spektrum der ovariellen Neoplasien ist äußerst vielfältig. Gemäß einer Hypothese von Köbel und Kollegen aus dem Jahr 2008 handelt es sich bei den unterschiedlichen histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms um unterschiedliche Erkrankungen, die sich in ihrer Klinik, ihrem Ansprechen auf Chemotherapie und ihrer Detektierbarkeit durch Biomarker unterscheiden (Kobel et al., 2008).

Die bedeutendste Gruppe maligner Ovarialtumoren mit einem Anteil von 90 % sind die epithelialen Karzinome, deren wichtigste Vertreter an dieser Stelle näher charakterisiert werden sollen.

Der häufigste Subtyp, der ca. 50 % der epithelialen Ovarialtumore ausmacht, ist der seröse. Er leitet sich vom Epithel der Tubenmukosa ab und enthält typischerweise feingliedrigere papilläre Strukturen. Bei schlechterer Differenzierung kann aber auch ein solides Wachstumsmuster in den Vordergrund treten.

Die muzinösen ovariellen Neoplasien weisen unregelmäßig proliferierte muzinöse Drüsen auf. Die entdifferenzierten Formen zeigen siegelringzell- oder pseudomyxomartige Wachstumsmuster.

Die Histologie der endometroiden Karzinome entspricht der des Endometriumkarzinoms, das in 25 % der Fälle gleichzeitig mit einem endometroiden Ovarialkarzinom auftritt. Hochdifferenzierte endometroide Karzinome sind zudem häufiger mit einer ovariellen Endometriose assoziiert (Kommos, 2009, Balzer et al., 2000).

Ferner ist davon auszugehen, dass es sich bei 10 % der Ovarialkarzinome um extra-ovarielle, peritoneale Karzinome handelt. Sie imponieren initial als peritoneal-metastasierte Karzinome mit nur gering betroffenen Ovarien und entsprechen prognostisch einem primären Ovarialkarzinom des Stadiums III/IV (Hennessy et al., 2009, Kommos, 2009). Die untenstehende Tabelle 1.1 gibt nochmals einen Überblick über die histologische Klassifikation maligner Ovarialtumoren nach WHO (nach Balzer et al., 2000, Diebold et al., 2007).

Tab. 1.1 Übersicht über die histologische Klassifikation der Ovarialtumoren nach Balzer et al., 2000, Diebold et al., 2007.

Eptiheliale Ovarialtumoren (90 %)	<ul style="list-style-type: none"> • Seröse Adenokarzinome (50 %) • Muzinöse Adenokarzinome (10-15 %) • Endometroide Adenokarzinome (10-15 %) • Klarzellige Adenokarzinome (2 %) • Karzinome mit Übergangsepithel, auch Brennertumore (1 %) • Undifferenzierte Karzinome (5-10 %)
Keimstrangstroma-Tumoren (5-8 %)	<ul style="list-style-type: none"> • Granulosazelltumore • Sertoli-Stromazelltumore, auch Androblastome • Gynandroblastome • Unklassifizierbar
Keimzelltumoren (3-5 %)	<ul style="list-style-type: none"> • Dysgerminom • Dottersacktumoren • Chorionkarzinom • Teratom • Embryonales Karzinom

	<ul style="list-style-type: none"> • Polyembryon • Gemischte Formen
--	---

Man geht davon aus, dass zwei Typen epithelialer Ovarialtumoren existieren. So entwickeln sich Karzinome vom Typ I schrittweise aus Borderline-Tumoren zu serösen, muzinösen, endometrioiden oder klarzelligen Karzinomen mit hoher Differenzierung (G1), während die Malignome vom Typ II, in denen man häufig BRCA und p53-Mutationen nachweisen kann, schlecht- oder entdifferenzierte Karzinome (G2/G3) umfassen. (Hennessy et al., 2009).

Die Borderline-Tumoren selbst, die auch als Karzinome geringer maligner Potenz (LMP-Tumoren) bezeichnet werden (Balzer et al., 2000), sind mit einer guten Prognose vergesellschaftet. Sie zeigen eine atypische Epithelproliferation ohne invasiv-destruierendes Wachstum und sind in 90 % der Fälle serös oder muzinös (Kommos, 2009).

1.1.4 Tumorausbreitung und Fernmetastasierung

Das Ovarialkarzinom breitet sich früh und sehr häufig intraperitoneal aus. Dabei folgen abgeschilferte Tumorzellen der physiologischen Zirkulation der Peritonealflüssigkeit und implantieren sich in die Serosa der Peritonealhöhle. Frühe Implantate sind vor allem entlang der parakolischen Rinnen und im Diaphragmabereich zu finden. In der Folge kommt es auch zur Bildung von Absiedlungen am Dünndarmmesenterium und Omentum majus. An der Leberkapsel, im Omentum minus oder auf der Oberfläche von Magen oder Dickdarm findet man seltener und überwiegend spät Implantationsmetastasen. Tumorbedingte Verklebungen der Dünndarmserosa und des Mesenteriums können zu einem Dünndarmileus führen.

Die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten sind häufig befallen. Seltener sind supraclavikuläre und axilläre Lymphknotenmetastasen.

Hämatogene Metastasen sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung selten, treten aber zunehmend im weiteren Verlauf auf. Am häufigsten manifestieren sich Fernmetastasen beim Ovarialkarzinom als Pleurakarzinose (Balzer et al., 2000, Kreienberg, 2009).

1.1.5 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms folgt der FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique)-Klassifikation von 1985. Neben dieser wird auch die TNM-Klassifikation (Tumor-Node-Metastasis) der UICC (International Union against Cancer) von 2002 angewendet.

Für das histopathologische Grading des Ovarialkarzinoms sind viele Systeme entwickelt worden, Silverberg schlug 1998 ein Gradingssystem vor, das unabhängig vom histologischen Typ und unter Einbeziehung von Mitosenzahl, Kernpleomorphie und Architektur angewendet wird (Diebold et al., 2007, Mayr and Diebold, 2000).

1.1.6 Früherkennung

Die Symptome in den Frühstadien, wie Schmerzen im Abdomen, Blutungsstörungen und Völlegefühl sind nicht spezifisch und lassen erst spät an eine Neoplasie im kleinen Becken denken (Andersen et al., 2010).

Somit werden auch heute noch 75 % der Ovarialkarzinome erst in den FIGO-Stadien III oder IV diagnostiziert, wenn die Langzeitüberlebensraten unter 40 % liegen. Im Stadium I und II sind die Langzeitüberlebensraten mit über 80 % als weitaus günstiger anzusehen (Hennessy et al., 2009, Mahner et al., 2009a, Burges and Schmalfeldt, 2011).

Eine frühere Diagnosestellung könnte die Überlebensraten des Ovarialkarzinoms somit dramatisch ansteigen lassen. Die Anforderungen, die an einen Screeningtest bei einem Karzinom mit relativ niedriger Inzidenz, wie dem Ovarialkarzinom, gestellt werden, sind jedoch hoch. Um ein Screening bei asymptomatischen Frauen zu rechtfertigen, müsste der Test mindestens eine Sensitivität von 75 % und eine Spezifität von 99,7 % erzielen, um einen den geforderten positiv prädiktiven Wert (PPV) von 10 % zu erreichen (Rosen et al., 2005).

So hat etwa die transvaginale Sonographie in der Früherkennung des Ovarialkarzinoms nur begrenzten Nutzen, weil dieses Verfahren viele falsch positive Ergebnisse und damit viele unnötige Operationen verursacht (Andersen et al., 2010, Hennessy et al., 2009).

Die Verwendbarkeit von Biomarkern zum Screening wurde in einer großen Anzahl von Studien untersucht. Die Ergebnisse waren bis jetzt jedoch leider enttäuschend.

CA 125, der zuverlässigste bisher bekannte Marker für das Ovarialkarzinom, findet in der klinischen Routine breite Anwendung als Verlaufsmarker. Er ist jedoch nicht

sensitiv und spezifisch genug, um zum Screening benutzt zu werden (Hennessy et al., 2009). Gerade in frühen Stadien zeigt CA 125 nur in 50-66 % der Fälle erhöhte Werte (Meier, 1997), andererseits sind falsch positive Ergebnisse, vor allem in der Prämenopause, sehr häufig (Schelling et al., 2007).

Die einzige Gruppe, für die ein Screening deshalb momentan empfohlen wird, sind Frauen mit hereditärem Ovarialkarzinom, innerhalb derer das Ovarialkarzinom eine höhere Inzidenz hat. Diese Frauen sollen ab einem Alter von 35 Jahren alle sechs Monate eine vaginale Tastuntersuchung, einen transvaginalen Ultraschall und eine CA 125 Messung erhalten. Eine Reduktion der Mortalität durch diese Maßnahmen konnte allerdings noch nicht nachgewiesen werden (Schorge et al., 2010).

1.1.7 Prognosefaktoren

Das FIGO-Stadium ist der stärkste Prognosefaktor des Ovarialkarzinoms. So haben Patientinnen im Stadium FIGO I eine Fünfjahresüberlebensrate von mindestens 80%, während Patientinnen im Stadium III, in dem sich die Mehrheit der Frauen bei Erstdiagnose befindet, nur noch eine Wahrscheinlichkeit von 25-40 % haben, den gleichen Zeitraum zu überleben. Im Stadium IV sinkt der Wert sogar auf etwa 10 % (Mahner et al., 2009b, Balzer et al., 2000, Hennessy et al., 2009, Mahner et al., 2009a).

Der prognostische Wert des Tumorstadiums wird in hohem Maße von der Sorgfalt und Expertise des Operateurs beim intraoperativen Staging bestimmt.

Bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen ist der postoperative Tumorrest ein sehr wichtiger prognostischer Faktor. Ist dieser kleiner als 1 cm im Durchmesser, so vergrößert sich die Überlebenswahrscheinlichkeit.

Der Differenzierungsgrad des Tumors ist vor allem in Stadium I und II nach FIGO von prognostischer Bedeutung, in den fortgeschritteneren Stadien ist dies umstritten.

Das Alter bei Diagnosestellung und der Allgemeinzustand spielen ebenfalls eine Rolle für das Outcome der Patientin (Balzer et al., 2000, Mahner et al., 2009b).

Auch die unterschiedlichen histologischen Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Prognose. So sind die klarzelligen und die muzinösen Karzinome prognostisch ungünstiger als seröse oder endometroide (Borges and Schmalfeldt, 2011, Schmalfeldt et al., 2007).

1.1.8 Therapie

Die Therapiemöglichkeiten beim Ovarialkarzinom umfassen die chirurgische Tumorreduktion sowie die Chemo- und die Strahlentherapie, wobei letztere nur noch selten angewendet wird.

Die operative Therapie ist der Grundpfeiler in der Behandlung des Ovarialkarzinoms und umfasst die maximale Reduktion der Tumormasse sowie die Durchführung eines kompletten Stagings.

In spezialisierten onkologischen Zentren kann dabei häufiger eine R0- oder R1-Situation erreicht werden (Kreienberg, 2009, Hilpert et al., 2007, Hennessy et al., 2009, Vernooij et al., 2007).

Außer bei Patientinnen im Stadium FIGO Ia (G1) wird in der Regel immer eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Standardmäßig besteht diese heute aus einer Kombination aus Platin (Carboplatin oder Cisplatin) und Taxanen (Paclitaxel oder Docetaxel) (Hennessy et al., 2009).

Trotz Therapie erkranken ungefähr 50 % der Patientinnen in fortgeschrittenen Tumorstadien an einem Rezidiv (Hilpert et al., 2007).

1.1.9 Nachsorge

Nach Abschluss der Primärtherapie wird bei beschwerdefreien Patientinnen in den ersten drei Jahren ein Nachsorgetermin alle 3 Monate empfohlen. Im vierten und fünften Jahr wird das Intervall auf 6 Monate und danach auf 12 Monate ausgedehnt.

Bei jedem Termin sollten eine Anamnese, körperliche und gynäkologische Untersuchung und eine transvaginale Sonographie durchgeführt werden. Wegen der erhöhten Inzidenz von Mammakarzinomen bei Ovarialkarzinompatientinnen wird alle 12 Monate eine Mammographie empfohlen.

Weitere apparative Untersuchungen oder die Bestimmung von Tumormarkern sind nur bei klinischer Symptomatik sinnvoll (Hilpert et al., 2007).

1.2 Tumormarker

Tumormarker sind im Blut oder in anderen Körperflüssigkeiten zirkulierende Antigene, die entweder vom Tumor selbst produziert werden oder eine Reaktion anderer Zellen auf das maligne Wachstum darstellen (Stieber, 2010).

Alle bisher bekannten Biomarker können jedoch auch bei Gesunden in gewisser Konzentration nachgewiesen werden und sind somit nicht spezifisch (Kreienberg et al., 1999).

Der diagnostische Wert eines Tumormarkers hängt von dessen Sensitivität und Spezifität ab, die durch einen beliebig festlegbaren Grenzwert bestimmt werden. Dabei spiegelt die Sensitivität die Wahrscheinlichkeit wider, dass der Marker bei Vorhandensein der Krankheit ein positives Ergebnis zeigt, während die Spezifität den Anteil der Nichterkrankten mit negativem Ergebnis quantifiziert.

Der verwendete Grenzwert entspricht meist der 95. oder 97,5. Perzentile des Serumspiegels gesunder Personen.

Ein idealer Tumormarker sollte mit histologischem Tumortyp und Tumorausbreitung korrelieren, Informationen zu Tumorlokalisierung geben und zum Screening sowie zur Früherkennung von Rezidiven und Metastasen geeignet sein. Ferner sollte man mit einem idealen Marker die Radikalität der Primärtherapie und die Therapie-Effektivität insgesamt beurteilen können. Ein Marker, der alle diese Kriterien erfüllt, wurde bisher nicht gefunden.

Markersubstanzen, die für die klinische Routine geeignet sind, sollten wenigstens eine Spezifität von 95 % und eine Sensitivität von 50 % besitzen. Das Testsystem mit dem ein Marker quantifiziert wird, sollte eine Interassay-Varianz von höchstens 10 % und eine Intraassay-Varianz von höchstens 5 % haben (Kreienberg et al., 1999).

Bei der Bestimmung von Tumormarkern sollte man ferner beachten, dass deren Konzentration auch von Störgrößen wie beispielsweise Nieren- und Leberinsuffizienz, benignen Erkrankungen, Menstruationszyklus oder Schwangerschaft beeinflusst werden kann. Außerdem sollte bei Verlaufsbestimmungen immer der gleiche Test vom selben Hersteller verwendet werden (Stieber, 2010).

Der in der klinischen Routine für die Rezidiverkennung und Therapiekontrolle des Ovarialkarzinoms etablierte Marker ist CA 125. Für diesen Bereich liefert er eine 95 %ige Spezifität und 92 %ige Sensitivität (Meier, 1997).

Zurzeit wird intensiv an Biomarkern geforscht, die allein oder in Kombination mit CA 125 sensitiv und spezifisch genug sind, um auch zum Screening in der Klinik eingesetzt zu werden.

Eine weitere Möglichkeit der Anwendung wäre die präoperative Abschätzung der Dignität unklarer Ovarialtumoren. Dadurch könnte nicht nur die Zahl unnötiger Operationen gesenkt werden, sondern es würden möglicherweise auch mehr Frauen mit hohem Karzinomrisiko für die Behandlung in etablierte Zentren überwiesen, wo sie einen deutlich besseren Outcome haben (Moore et al., 2009, Vernooij et al., 2007).

1.3 Biomarker

1.3.1 Muzin-Glykoproteine CA 125 und CA 72-4

Muzine sind eine Familie von Glykoproteinen, die man auf Epithelien der Brustdrüse, der Niere, des Verdauungstraktes, der Speicheldrüsen, sowie des weiblichen und männlichen Genitaltraktes findet. Hier wirken sie unter anderem als Barriere, die Zellen vor äußeren Einflüssen wie Mikroorganismen und Toxinen oder vor Proteolyse schützt.

Alle Muzine bestehen aus einem zentralen Protein und vielen Polysacchariden, die meist über O-glykosidische Bindungen mit dem Protein verknüpft sind und die zu mindestens 50 % zur Gesamtmasse des Muzins beitragen. Man unterscheidet allerdings zwischen sekretorischen und membrangebundenen Muzinen, die sich in Aufbau und Funktion über die Grundstruktur hinaus unterscheiden (Gendler and Spicer, 1995).

Bei malignen Erkrankungen findet man häufig eine erhöhte Synthese oder Sekretion von Muzinen. Ferner ist eine Veränderung ihrer Glykolisierung wahrscheinlich ausschlaggebend, um den Unterschied zwischen Karzinom und normalem Gewebe zu definieren (Devine and McKenzie, 1992).

1.3.1.1 Cancer Antigen 125

Das Cancer Antigen 125 (CA 125) ist ein Epitop des membrangebundenen Muzins MUC 16 (Goodell et al., 2009). Ein monoklonaler Antikörper gegen CA 125 wurde

bereits 1979 gefunden und diese Entdeckung dann 1981 publiziert. Das Gen MUC 16 wurde erstmals 2001 geklont (Bast et al., 2005).

MUC 16 besteht aus einer N-terminalen Region mit neun Tandem Repeats, die reich an Serin, Threonin und Prolin sind und einer C-terminalen Domäne, die sich aus einem extrazellulären, einem transmembranen und einem zytoplasmatischem Anteil zusammensetzt. MUC 16 ist zudem sehr stark glykolisiert. Es hat ein Molekulargewicht zwischen 2500 und 5000 kD (Scholler and Urban, 2007).

Ovarialtumoren exprimieren Mucin 16 an ihrer Zelloberfläche. Von dort wird ein Teil proteolytisch abgespalten, dieser findet sich dann in Peritonealflüssigkeit und Blut der Patientinnen als CA 125 wieder (Gubbels et al., 2010).

Man kann CA 125 auch in Zölomepitheldervaten, in fetalem und adultem Tracheal- und Bronchialepithel (Kreienberg et al., 1999), sowie in Eileiter, Endometrium und Endozervix nachweisen (Gadducci et al., 2004). Außerdem findet man es in der Dezidua (Patankar et al., 2005).

Über die Funktion von CA 125 im Körper weiß man bisher nur wenig. Es wird angenommen, dass es als Suppressor der gegen Ovarialkarzinome gerichteten Immunantwort fungiert, indem es die durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vermittelte Zytolyse von Tumorzellen hemmt (Gubbels et al., 2010, Patankar et al., 2005, Belisle et al., 2007).

Auch die NK-Zellen der Dezidua sollen von CA 125 in ihrer Funktion gehemmt werden, so dass es vermutlich auch zu einer Suppression des mütterlichen Immunsystems während der Schwangerschaft beiträgt (Patankar et al., 2005, Belisle et al., 2007).

Gebundenes MUC 16 unterstützt außerdem die Bindung der Ovarialkarzinomzellen an das Mesothelin der mesothelialen Zellen der Peritonealhöhle und damit die peritoneale Metastasierung (Goodell et al., 2009, Bafna et al., Belisle et al., 2007).

Bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen wird CA 125 als Biomarker benutzt, um das Ansprechen ihrer Therapie zu überprüfen oder eine weitere Progression frühzeitig zu erkennen (Bast et al., 2005). Hierfür in der Regel ein Grenzwert von 35 U/ml zugrunde gelegt (Stieber, 2010).

Auch wenn CA 125 der zuverlässigste bisher etablierte Biomarker für das Ovarialkarzinom ist, an dem sich jeder neu einzuführende Marker messen lassen muss, so finden sich dennoch nur bei 80 % der Patientinnen erhöhte Werte im Blut.

In den frühen Stadien sogar nur bei 50-60 % (Moore et al., 2010b, Rosen et al., 2005).

Ferner können eine Reihe benigner gynäkologischer Erkrankungen, ebenso wie nicht-gynäkologische Erkrankungen, zu erhöhten Serumwerten von CA 125 führen (Gallup and Talledo, 1997, Moore et al., 2010a).

Dieser Problematik, die zu Einschränkungen der Sensitivität und Spezifität führt, haben sich eine Reihe von Forschungsgruppen - darunter unsere eigene – angenommen. Die Möglichkeiten und Grenzen von CA 125, sowie Wege zur Verbesserung seiner klinischen Anwendbarkeit, sollen im Folgenden erörtert werden.

1.3.1.2 Cancer Antigen 72-4

Das Cancer Antigen 72-4 wird auch als TAG 72 (tumor-assoziiertes Antigen 72) bezeichnet. Es handelt sich um ein Muzin Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von mehr als 1000 kD (Negishi et al., 1993), das durch zwei monoklonale Antikörper definiert wird (Kreienberg et al., 1999). Beide Antikörper, B72.3, zu dessen Gewinnung ursprünglich die Lebermetastase eines Mammakarzinoms diente (Gadducci et al., 2004) und CC49, der mit Hilfe einer Kolonkarzinomzelllinie isoliert wurde (Negishi et al., 1993), sind Bestandteil des Radioimmunassays zur Detektion von CA 72-4 im Serum (Guadagni et al., 1992).

CA 72-4 wird nur in wenigen gesunden Geweben wie etwa der Kolonschleimhaut oder dem sekretorisch-transformierten Endometrium exprimiert (Guadagni et al., 1995). In den Ovarien gesunder Frauen konnte das Muzin bisher nicht nachgewiesen werden (Ponnusamy et al., 2007).

Es wird allerdings von einer Reihe von Adenokarzinomen exprimiert (Negishi et al., 1993), bei deren Auftreten man es auch in erhöhter Konzentration im Serum der Patienten finden kann.

So ist CA 72-4 neben CA 19-9 und CEA ein etablierter Biomarker für das Magenkarzinom und diesen beiden dabei sogar in Sensitivität und Spezifität überlegen (Stieber, 2010). Man findet es aber auch in Seren von Patienten mit kolorektalen Karzinomen (Guadagni et al., 1995).

Hareyama et al. wiesen CA 72-4 beim Endometriumkarzinom in etwa einem Drittel der Patientinnenserum und in mehr als drei Viertel der Schnittpräparate nach und zeigten eine Korrelation zwischen erhöhten Serumwerten und dem Vorhandensein von Metastasen im Adnexegebiet (Hareyama et al., 1996).

Beim Ovarialkarzinom konnte CA 72-4 immunhistochemisch in der Mehrheit der Gewebeproben nachgewiesen werden (Ponnusamy et al., 2007, Negishi et al., 1993), dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen histologischen Karzinomtypen gezeigt werden (Ponnusamy et al., 2007). Auch in Seren von Patientinnen mit Ovarialkarzinom wurde TAG 72 vielfach nachgewiesen. Als Grenzwert wird häufig 3 U/ml angegeben (Kreienberg et al., 1999, Stieber, 2010). TAG 72 wurde häufig vor allem als ein für die Detektion muzinöser Ovarialkarzinome besonders geeigneter Marker bezeichnet (Hasholzner et al., 1996, Negishi et al., 1993). Deshalb wird in vielen Arbeiten diskutiert, ob eine Bestimmung ergänzend zu CA 125 sinnvoll sein könnte (Zeimet et al., 1995, Negishi et al., 1993, Gadducci et al., 2004), da dieses gerade beim muzinösen Ovarialkarzinomen häufig keine erhöhten Werte zeigt (Gadducci et al., 2004, Zeimet et al., 1995). Diese Diskussion soll in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen werden.

1.3.2 Human Epididymis Specific Protein 4 (HE4)

Das Human Epididymis Specific Protein 4 (HE4) wird auch als WFDC2 (Wap four disulfide core) bezeichnet, weil es vom WFDC2-Gen auf Chromosom 20 kodiert wird (Andersen et al., Hellstrom et al., 2010) und zwei Whey acidic protein- (Wap-) Proteindomänen mit je acht Cysteinresten enthält (Drapkin et al., 2005). Solche Domänen findet man in vielen, typischerweise kleinen, sekretorischen Proteinen, von denen einige Proteasehemmer sind, wie man es ebenfalls von HE4 vermutet (Bingle et al., 2002). Auch das Expressionsmuster von HE4 innerhalb der Zelle mit Lokalisation in Golgi-Apparat und rauem endoplasmatischem Retikulum spricht dafür, dass es sich um ein sekretorisches Protein handelt (Montagnana et al., 2009). Erstmals nachgewiesen wurde HE4 im Nebenhoden, wo man ihm eine Rolle bei der Spermienreifung zusprach (Kirchhoff et al., 1991). Später fand man es auch in der Trachea, in der Lunge und dem Epithel der Nasenschleimhaut sowie in Nieren und Speicheldrüsen (Bingle et al., 2002). Im weiblichen Genitaltrakt wird es von Endometrium, Endozervix und Eileiter exprimiert (Drapkin et al., 2005), findet sich aber kaum in den Ovarien gesunder Frauen (Moore et al., 2008).

Darüber hinaus wurde HE4 in einigen bösartigen Tumoren nachgewiesen. So fand man es in Karzinomen des Endometriums (Drapkin et al., 2005, Montagnana et al., 2009), sowie in serösen und endometroiden Ovarialkarzinomen, nicht jedoch in der Mehrheit der muzinösen Karzinome (Drapkin et al., 2005). Ovarialkarzinomzellen, die

HE4 exprimieren, können dieses als N-glykolisierte Form mit einem Molekulargewicht von 25 kD abgeben (Montagnana et al., 2009). Entsprechend findet man es bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen oft in erhöhter Konzentration im Serum (Moore et al., 2008, Hellstrom et al., 2003, Montagnana et al., 2009, Havrilesky et al., 2008). Moore schlägt einen Wert von 70pM als Grenzwert zur Diskrimination zwischen Karzinompatientinnen und Frauen ohne maligne Erkrankung vor (Moore et al., 2008).

Eine moderate Spiegelerhöhung ist auch bei Patientinnen mit Endometrium- und Zervixkarzinom möglich. Die Werte sind aber in der Regel niedriger als bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen, wo HE4 regelhaft in sehr hoher Konzentration im Serum nachzuweisen ist (Montagnana et al., 2009). Hellstrom et al. wiesen HE4 2010 auch im Urin von Frauen mit Ovarialtumoren nach und erzielten ähnlich gute Sensitivitäten wie mit der Messung im Serum (Hellstrom et al., 2010).

Eine Reihe von Arbeitsgruppen hat sich bereits mit der Bedeutung von HE4 als Biomarker für das Ovarialkarzinom, vor allem im Vergleich zu CA 125, beschäftigt.

Einige untersuchten auch die klinische Anwendbarkeit von Kombinationen aus HE4 und anderen Biomarkern (Moore et al., 2009, Moore et al., 2008, Havrilesky et al., 2008).

1.3.3 Die Galektine-1 und -3

Galektine gehören zur Protein-Familie der Lektine (Waalkes et al., 2010). Diese binden an Kohlenhydrate auf der Oberfläche von Proteinen oder Lipiden und haben dabei besondere Affinität zu spezifischen Oligosacchariden (Krzeslak and Lipinska, 2004). Bislang wurden 15 Galektine identifiziert (Waalkes et al., 2010), deren gemeinsames Merkmal das Vorhandensein wenigstens einer Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (CRD) von etwa 135 Aminosäuren Länge mit besonderer Affinität für β -Galaktoside ist (Krzeslak and Lipinska, 2004).

Man findet Galektine im Zellkern und Zytoplasma, aber auch an der Zelloberfläche und innerhalb der extrazellulären Matrix. Es wird vermutet, dass ihre Sekretion unabhängig von endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat stattfindet, da ihnen der Signalerkennungspartikel (SRP), der dafür Voraussetzung wäre, fehlt (Perillo et al., 1998).

In Abhängigkeit ihrer Struktur und Anzahl der CRD lassen sich die Galektine in drei Subgruppen unterteilen: So haben die Galektine -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15 als sog. „Prototypen“ nur eine CRD, während die Galektine -4, -6, -8, -9 und -12 vom „tandem repeat“ Typ zwei CRD besitzen. Das chimäre Galektin-3 bildet allein die dritte Gruppe (Nakahara et al., 2005).

1.3.3.1 Galektin-1

Galektin-1 liegt unter physiologischen Bedingungen als Homodimer vor. Es besteht aus zwei monomeren Untereinheiten zu 14kD mit je einer CRD, und vermittelt so inter- und intramolekulare Quervernetzungen (Perillo et al., 1998). Bevorzugt bindet es dabei die Sequenz Gal- β 1-3/4 GlcNAc (LacNAc) (Fischer et al., 2009, Camby et al., 2006), kann aber auch über Protein-Protein-Wechselwirkungen Bindungen aufbauen (Camby et al., 2006).

Entsprechend hat Galektin-1 auch eine Vielzahl möglicher Bindungspartner. Darunter sind z.B. die T-Zell-Antigene CD45, CD7, CD3 und CD4 (Camby et al., 2006), das Muzin CA 125 (Seelenmeyer et al., 2003) und das Glykoprotein CEA (Camby et al., 2006). Darüber hinaus bindet es an Laminin, Fibronectin, LAMPs (Lysosomal-associated membrane protein) und Integrine (Camby et al., 2006, van den Brule et al., 2001), die Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) sind.

Galektin-1 wurde in verschiedenen Geweben und Zellen nachgewiesen, darunter Haut, Endothelzellen, Lunge, Milz, Thymus, Lymphknoten und Plazenta (Perillo et al., 1998). Außerdem wird es in unterschiedlichen Malignomen, häufig mit bevorzugter Akkumulation im tumor-assoziierten Stroma, exprimiert (van den Brule et al., 2003, van den Brule et al., 2001). Dabei geht das Vorhandensein von Galektin-1 in einem malignen Tumor oder dem umgebenden Stroma oft mit Progression des Tumors und mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einher (Camby et al., 2006, van den Brule et al., 2001).

Die Funktionen von Galektin-1 sind vielfältig. So fördert das Lektin die Verbindung zwischen Zelloberflächen und ECM und zwischen Zellen untereinander (van den Brule et al., 2001) und dadurch möglicherweise auch die Invasivität von Tumorzellen (van den Brule et al., 2003).

In niedrigen Konzentrationen wirkt Galektin-1 mitogen, in hohen Konzentrationen wachstumshemmend (van den Brule et al., 2003, Adams et al., 1996, Camby et al., 2006).

Darüber hinaus scheint es weitere Mechanismen zu geben, durch die Galektin-1 das Überleben und die Ausdehnung von Karzinomen fördern kann. So bindet Galektin-1 auch an Glykoproteine wie CD45 auf der Oberfläche von T-Zellen und löst bei aktivierten, nicht aber bei ruhenden T-Zellen, die Apoptose aus (Camby et al., 2006, Perillo et al., 1995). TH₁-Zellen sollen davon durch einen Unterschied ihrer Sialysierung in besonderem Maße betroffen sein, so dass TH₂-Zellen verstärkt an Einfluss gewinnen (Liu and Rabinovich, 2010). Daraus resultierend kommt es auch zu einer verminderten Freisetzung von proinflammatorischem Interleukin-2, IFN- γ und TNF- α , die von TH₁-Zellen gebildet werden, bei verstärkter Sekretion des anti-inflammatorischen Interleukin 10 aus TH₂-Zellen (van den Brule et al., 2003, van den Brule et al., 2001, Liu and Rabinovich, 2010, Camby et al., 2006). Die von TH₂-Zellen gebildeten Zytokine scheinen malignes Wachstum insgesamt zu unterstützen, sowie zusätzlich eine Polarisation von tumor-assoziierten Makrophagen zum Typ M2 herbeiführen (Henderson and Sethi, 2009, Rodriguez-Vita and Lawrence, 2010) welche ihrerseits wiederum Wachstum, Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen verstärken können (Dumont et al., 2008, Fraser et al., 2010, Rodriguez-Vita and Lawrence, 2010).

Galektin-1 fördert ferner die Entwicklung von CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (Liu and Rabinovich, 2010), die die Immunantwort gegen maligne Tumoren unterdrücken können (Dunn et al., 2004).

Außerdem interagiert Galektin-1 mit einem Protein der Ras-Familie. Es stabilisiert die Anheftung der aktiven Form von H-Ras an die Zellmembran und fördert dadurch dessen Aktivität und damit die maligne Transformation von Zellen (Liu and Rabinovich, 2005).

Die angeborene Abwehr wird von Galektin-1 insgesamt supprimiert. So hemmt Galektin-1 die Chemotaxis und Adhäsion von Neutrophilen, die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen, sowie die Degranulation von Mastzellen (Liu and Rabinovich, 2010).

Durch solche Mechanismen, die in ihrer Gesamtheit als anti-inflammatorisch und tumor-supportiv bezeichnet werden können, sollen auch Autoimmunerkrankungen durch Galektin-1 in ihrer Progression gehemmt werden können (Liu and Rabinovich, 2010).

Ferner gilt Galektin-1 auch als wichtiger Regulator der fetomaternalen Toleranz (Fitzgerald et al., 2010) und als vielversprechender therapeutischer Ansatz zur

Wiederherstellung des Immunzellgleichgewichts bei von Abort bedrohten Schwangerschaften (Fischer et al., 2009).

Auch wenn Galektin-1 neben Galektin-3 das am besten erforschte Lektin ist, sind viele seiner Eigenschaften noch unklar und müssen näher beleuchtet werden. Insgesamt scheint das Lektin durch Schaffung eines antientzündlichen Zytokinprofils und der Abtötung von T-Zellen maßgeblich zu einer Supprimierung der gegen einen malignen Tumor gerichteten Immunantwort („tumor immune escape“) beizutragen.

1.3.3.2 Galektin-3

Galektin-3 setzt sich neben der C-terminalen CRD von circa 140 Aminosäuren Länge (Califice et al., 2004b), aus einer NH₂-terminalen Domäne von 20 Aminosäuren Länge und aus einer dritten so genannten R-Domäne zusammen, die reich an Prolin, Glycin und Tyrosin ist (Califice et al., 2004a) und RNA binden kann (Perillo et al., 1998).

In Lösung findet man Galektin-3 als Monomer von 31 kD (Krzeslak and Lipinska, 2004), es kann aber zu Oligomeren aggregieren (Camby et al., 2006).

Das Lektin wurde in Eosinophilen, aktivierten Makrophagen und Mastzellen nachgewiesen, aber auch im Epithel des Gastrointestinal- und Atmungstraktes, den Nieren und sensorischen Neuronen (Krzeslak and Lipinska, 2004). Im Ovar wird Galektin-3 stark vom Oberflächenepithel und schwach vom Stroma exprimiert (Devouassoux-Shisheboran et al., 2006).

Es besitzt eine Reihe intra- und extrazellulärer Bindungspartner. Intrazellulär bindet es auch unabhängig von seiner CRD über Protein-Protein-Wechselwirkungen beispielsweise an RNA und das Proto-Onkogen Bcl2 (B-cell-lymphoma-2) (Perillo et al., 1998). Außerhalb der Zelle sind unter anderem Laminin und Fibronectin (Krzeslak and Lipinska, 2004, Perillo et al., 1998), sowie CD29 und CD7 auf der Oberfläche von T-Zellen seine Liganden (Nakahara et al., 2005).

Die biologische Aktivität von Galektin-3 ist nachweislich von dessen Lokalisation in der Zelle abhängig; sein Ausschluss aus dem Kern scheint eine Schlüsselrolle bei der Generierung von Invasivität zu spielen (Califice et al., 2004a).

Zudem kann Galektin-3 die Apoptose von Zellen beeinflussen. Es besitzt Ähnlichkeiten mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl2, beide besitzen das so genannte NWGR-Motiv, dass die Aminosäuren Asn-Trp-Gly-Arg enthält und für die anti-apoptotische Funktion entscheidend ist (Nakahara et al., 2005, Krzeslak and

Lipinska, 2004). So soll intrazelluläres Galektin-3, wie Bcl2, die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und damit die Einleitung der Apoptose verhindern (Devouassoux-Shisheboran et al., 2006), und auf diesem Wege z.B. T-Zellen, aber auch Tumorzellen, vor Apoptose schützen können (Califice et al., 2004b).

Extrazelluläres Galektin-3 soll dagegen die Apoptose von T-Zellen über die Bindung an deren Oberflächenglykoproteine CD29 und CD7 auslösen, also proapoptotisch wirken können (Nakahara et al., 2005, Liu and Rabinovich, 2005).

Expression und Wirkung von Galektin-3 in Zusammenhang mit malignen Tumoren werden außerdem von gewebe- oder tumorspezifischen Faktoren beeinflusst (Perillo et al., 1998).

Somit scheint Galektin-3 sowohl pro- als auch antiapoptotische Funktionen zu haben, abhängig vom Differenzierungsstatus der Zelle, dem Gewebetyp und seiner Lokalisation (Liu and Rabinovich, 2005, Nakahara et al., 2005). Möglicherweise ist es für die Rolle des Lektins bei der Apoptose auch entscheidend, ob es phosphoryliert vorliegt oder nicht (Califice et al., 2004b).

Demetriou zeigte 2001, dass Galektin-3 außerdem die Aktivierbarkeit von T-Zellen herabsetzen kann, wenn es an bestimmte N-Glykane auf deren Oberfläche bindet, wodurch die Zusammenlagerung von T-Zell-Rezeptoren (TCR) in einer für die Aktivierung der Zelle ausreichenden Anzahl beeinträchtigt wird (Demetriou et al., 2001).

Insgesamt scheinen diese Prozesse bevorzugt die TH₁-Antwort zu supprimieren und die TH₂-Antwort zu favorisieren, wie man es auch unter dem Einfluss von Galektin-1 festgestellt hat (Liu and Rabinovich). Ferner fördert Galektin-3 direkt die Entwicklung von M2-Makrophagen (Dumont et al., 2008, Liu and Rabinovich, 2010).

Galektin-3 hemmt zudem dendritische Zellen in Ihrer Funktion, die unter anderem in der Aktivierung von tumorreaktiven zytotoxischen T-Zellen besteht (Fraser et al., 2010, Liu and Rabinovich, 2010).

Darüber hinaus hat Galektin-3 anders als Galektin-1 auch proentzündliche Effekte, indem es beispielsweise die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten ans Gefäßendothel, die Opsonierung von Makrophagen und die Degranulation von Mastzellen fördert (Liu and Rabinovich, Henderson and Sethi, 2009). Henderson berichtet in einer Publikation aus dem Jahr 2009 sogar von einer unmittelbar

bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung des Lektins selbst (Henderson and Sethi, 2009).

Das multifunktionale Lektin Galektin-3, involviert in die Regulation der Apoptose, der T-Zell-Funktion, der Vermittlung von Zellkontakten und der Biologie von Tumoren, scheint eine wichtige Rolle für die Regulation der Immunantwort und Progression maligner Erkrankungen zu spielen.

1.4 Fragestellung

Raumforderungen im Bereich des kleinen Beckens sind ein häufiger Befund in der Gynäkologie. Auch wenn es sich bei diesen in den wenigsten Fällen um Ovarialkarzinome handelt, ist es von größter Wichtigkeit, gerade die Patientinnen mit hohem Karzinomrisiko frühzeitig zu erkennen, um sie der optimalen Behandlung zuführen zu können.

Ein Biomarkertest ist für diese Aufgabe wegen seiner Objektivität, Reproduzierbarkeit und geringen Invasivität grundsätzlich geeignet. Beim Ovarialkarzinom mit seiner relativ niedrigen Inzidenz sind die Voraussetzungen, die an die Sensitivität und Spezifität eines potentiellen Markers für die Früherkennung gestellt werden, jedoch hoch.

Zwar gilt CA 125 als der Einzelmarker mit der höchsten Sensitivität in der präoperativen Diagnostik des Ovarialkarzinoms, allerdings reicht seine Diskriminationsfähigkeit allein nicht aus, die geforderten Bedingungen zu erfüllen.

In der Hoffnung, zur Etablierung eines Biomarkertests in der präoperativen Diagnostik des Ovarialkarzinoms beitragen zu können, sollen CA 72-4, HE4 sowie Galektin-1 und -3 neben CA 125 als potentielle Marker-Proteine unter Berücksichtigung folgender Punkte untersucht werden:

1. Um die grundsätzliche Eignung eines Proteins für die Verwendung als Biomarker zu beurteilen, soll zunächst geprüft werden, ob es einen signifikanten Unterschied seines Serumspiegels zwischen Ovarialkarzinompatientinnen und Frauen mit benignen gynäkologischen Erkrankungen gibt.
2. Darauf folgend sollen Sensitivitäten und Spezifitäten jedes einzelnen Markers berechnet, die Genauigkeit seiner Differenzierungsfähigkeit bewertet und mit den Werten des etablierten Markers CA 125 verglichen werden.
3. Weiterhin soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Vorhersagefähigkeit durch Kombinationen von Biomarkern verbessert werden kann.
4. Ein besonderer Stellenwert soll darüber hinaus der Proteinfamilie der Galektine zukommen, die eine bedeutende Rolle in der Biologie maligner Tumore zu spielen scheinen. Zwei Vertreter dieser Gruppe von Glykoproteinen, die ebenfalls nach obigen Kriterien auf ihre Eignung als Biomarker bei Ovarialtumoren hin untersucht werden, sollen außerdem im Hinblick auf ihre Expression in Präparaten benigner und maligner ovarieller

Raumforderungen betrachtet werden, um ihre Bedeutung als Serummarker in Zusammenhang mit dem oben gesagten näher zu beleuchten.

2. Patientinnen, Material und Methoden

Die experimentelle Grundlage der vorliegenden Arbeit wird von zwei unterschiedlichen Verfahren gebildet. Im ersten Teil wurden die Konzentrationen der Muzine CA 125 und CA 72-4, des Glykoproteins HE4 und der Lektine Galektin-1 und -3 in Seren von Patientinnen mit der Diagnose eines operationswürdigen Ovarialtumors ermittelt.

Im zweiten Teil wurden Operationspräparate unterschiedlicher Ovarialtumoren immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. Untersucht wurde die Expression von Galektin-1 und Galektin-3.

2.1 Patientinnen

Die unterschiedlichen experimentellen Verfahren wurden an zwei Patientinnenkollektiven durchgeführt.

2.1.1 Kollektiv I

Kollektiv I besteht aus 92 Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, die dort in den Jahren 2003 bis 2005 vorstellig wurden. Einschlusskriterium war der Verdacht auf einen Ovarialtumor mit Indikation zur Operation. Das Kollektiv enthält sowohl prä- als auch postmenopausale Frauen.

Patientinnen, deren Ovarialtumore histologisch als Metastasen anderer Tumore identifiziert wurden (z.B. Krukenberg-Tumore), wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

Präoperativ wurde von jeder Patientin eine Serumprobe entnommen, die anschließend bei Raumtemperatur zentrifugiert und dann bei -80°C gelagert wurde.

Das bei den Operationen entnommene Gewebe wurde durch die Mitarbeiter des Pathologischen Instituts-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, untersucht. Dabei fand eine Überprüfung bezüglich Diagnose, histologischem Zelltyp, Differenzierungsgrad, Lymphangiosis, Hämangiosis und FIGO-Stadium (gemäß den FIGO-Kriterien von 1988) statt.

Die Serumproben wurden je nach Dignität der Histologie der malignen oder der benignen Untersuchungsgruppe zugeordnet. Insgesamt wurden 30 Serumproben Patientinnen mit malignen und 62 Serumproben Patientinnen mit benignen Erkrankungen zugeordnet. Die Charakteristika der beiden Untergruppen illustrieren die Tabellen 2.1 und 2.2.

Tab. 2.1 Details der malignen Untersuchungsgruppe aus Kollektiv I.

Alter	Mittleres Alter	62,23 Jahre
	Minimum	20 Jahre
	Maximum	80 Jahre
Tumorhistologie	serös	21 Tumore
	muzinös	1 Tumor
	endometroid	4 Tumore
	Müllerscher Mischtumor	1 Tumor
	Kein Befund	3 Fälle
Grading	G1	1 Patientin
	G2	10 Patientinnen
	G3	7 Patientinnen
	Kein Befund	12 Patientinnen
FIGO-Stadium	Ia	3 Patientinnen
	Ic	2 Patientinnen
	IIb	1 Patientin
	IIIb	2 Patientinnen
	IIIc	15 Patientinnen
	IV	2 Patientinnen
	Kein Befund	5 Patientinnen
Nodalstatus	Nx	8 Patientinnen
	N0	8 Patientinnen
	N1	7 Patientinnen
	Kein Befund	7 Patientinnen
Metastasen	Mx	11 Patientinnen
	M0	8 Patientinnen
	M1	2 Patientinnen

	Kein Befund	9 Patientinnen
--	-------------	----------------

Tab. 2.2 Details der benignen Untersuchungsgruppe aus Kollektiv I.

Alter	Mittleres Alter	50,1 Jahre
	Minimum	16 Jahre
	Maximum	82 Jahre
Art der benignen Erkrankung	Inklusionszyste	1 Tumor
	Follikelzyste	2 Tumore
	Corpus Luteum Zyste	3 Tumore
	Endometriose Zyste	5 Tumore
	einfach seröse Zyste	11 Tumore
	Seröse Zystadenome	8 Tumore
	Muzinöse Zystadenome	6 Tumore
	Seröse Zystadenofibrome	5 Tumore
	Muzinöse Zystadenofibrome	1 Tumor
	Brenner Tumoren	1 Tumor
	Teratome	8 Tumore
	Fibrome	3 Tumore
	Entzündliche Veränderung	4 Tumore
	Kein Befund	4 Fälle

Die pathologische Untersuchung der 30 malignen Tumorgewebe ergab, dass 27 davon den epithelialen Ovarialkarzinomen zuzuordnen sind. Von diesen ist mit insgesamt 21 die überwiegende Zahl serös, vier sind endometroid, ein Tumor hat sich als muzinös erwiesen und in einem Fall handelt es sich um einen Müllerschen Misch tumor (Abb. 2.1). Die drei übrigen Tumoren konnten keinem histologischen Typ des Ovarialkarzinoms zugeordnet werden.

Die pathologische Untersuchung der gutartigen Gewebeveränderungen (n=62) ergab eine Inklusionszyste, zwei Follikelzysten, drei Corpus Luteum Zysten, fünf Endometriosezysten und elf einfach seröse Zysten. Daruas ergibt sich eine Gesamtzahl von 22 zystischen benignen Veränderungen.

Die übrigen benignen Tumore (n=32) sind solide. Sie setzen sich zusammen aus acht serösen Zystadenomen, sechs muzinösen Zystadenomen, fünf serösen Zystadenofibromen, einem muzinösen Zystadenofibrom, einem Brenner-Tumor, acht Teratomen und drei Fibromen.

In die Auswertung der benignen Befunde gingen zudem vier entzündliche Veränderungen der Adnexe sowie vier nicht näher klassifizierte benigne Befunde ein (Abb. 2.2).

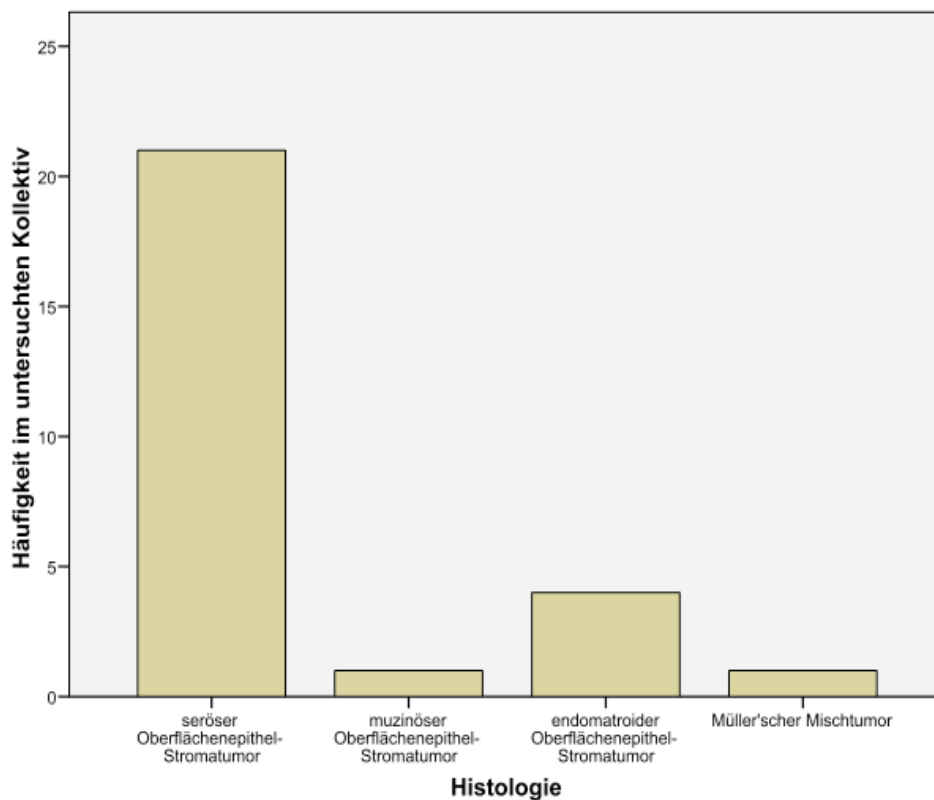


Abb. 2.1 Überblick zur Verteilung aller ermittelten malignen histologischen Befunde (n=27): Seröses Ovarialkarzinom: n=21; Muzinöses Ovarialkarzinom: n=1; Endometrioides Ovarialkarzinom n=4; Müllerscher Misch tumor: n=1.

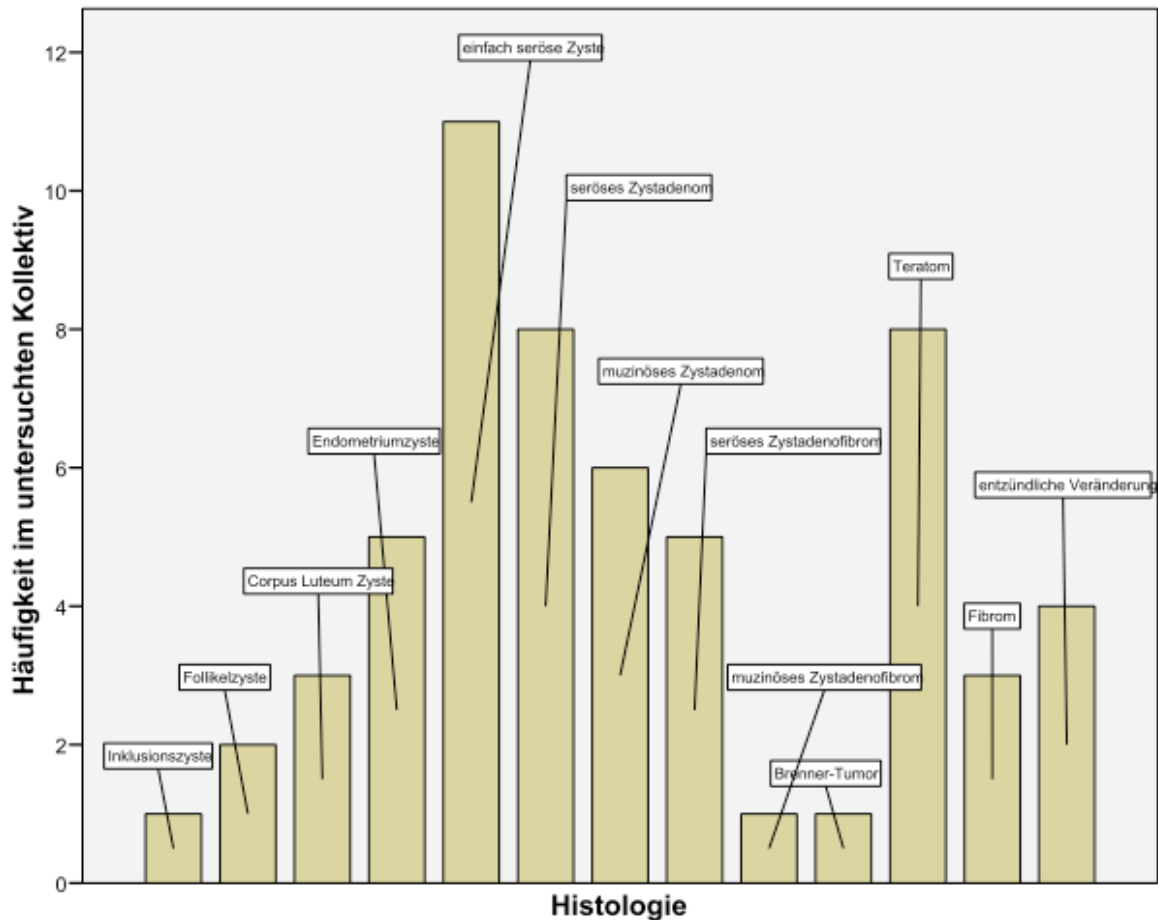


Abb. 2.2 Überblick zur Verteilung aller ermittelten benignen histologischen Befunde (n=58): Inklusionszyste (n=1); Follikelzyste (n=2); Corpus Luteum Zyste (n=3); Endometriozyste (n=5); einfach seröse Zyste (n=11); seröses Zystadenom (n=8); muzinöses Zystadenom (n=6); seröses Zystadenofibrom (n=5); muzinöses Zystadenofibrom (n=1); Brenner-Tumor (n=1); Teratom (n=8); Fibrom (n=3); entzündliche Veränderung der Adnexe (n=4).

2.1.2 Kollektiv II

Einschlusskriterium war auch hier Verdacht auf einen Ovarialtumor mit Indikation zur Operation. Teil des Kollektivs sind sowohl prä- als auch postmenopausale Frauen.

Unter Anwendung dieser Kriterien wurden 111 Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München aus den Jahren 2003-2005 in Kollektiv II eingeschlossen. Sofern Tumore sich als ovarielle Manifestation extragenitaler Malignome herausstellten, wurden sie von der Auswertung ausgeschlossen.

Die während des operativen Eingriffs gewonnenen Gewebeproben wurden durch die Mitarbeiter des Pathologischen Instituts-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München untersucht. Es fand jeweils eine Überprüfung bezüglich Diagnose, histologischem Typ, Differenzierungsgrad, Lymphangiosis, Hämangiosis und FIGO-Stadium (nach den FIGO-Kriterien von 1988) statt. Diese Untersuchungen ergaben 78 benigne und 33 maligne Ovarialtumore.

Das Gewebematerial wurde in Formalin fixiert, paraffiniert, mit dem Schlittenmikrotom 2-3 µm dünn geschnitten und auf Objektträger aufgezogen.

Insgesamt wurden 33 Schnitte von Patientinnen mit malignen Erkrankungen und 78 Schnitte von Patientinnen mit benignen Erkrankungen angefertigt. Die Tabellen 2.3 und 2.4 zeigen charakteristische Eigenschaften beider Untergruppen.

Tab. 2.3 Details der malignen Untersuchungsgruppe aus Kollektiv II.

Alter	Mittleres Alter	58,46 Jahre
	Minimum	20 Jahre
	Maximum	78 Jahre
Tumorhistologie	Serös	26 Tumore
	Muzinös	1 Tumor
	Endometroid	5 Tumore
	Kein Befund	1 Tumor
Grading	G1	2 Patientinnen
	G2	11 Patientinnen
	G3	10 Patientinnen
	Kein Befund	10 Patientinnen
FIGO-Stadium	Ia	2 Patientinnen
	Ic	2 Patientinnen
	IIa	1 Patientin
	IIb	2 Patientinnen
	IIIb	1 Patientin
	IIIc	18 Patientinnen
	IV	3 Patientinnen
	Kein Befund	4 Patientinnen
Nodalstatus	Nx	11 Patientinnen

	N0	9 Patientinnen
	N1	8 Patientinnen
	Kein Befund	5 Patientinnen
Metastasen	Mx	12 Patientinnen
	M0	9 Patientinnen
	M1	2 Patientinnen
	Kein Befund	10 Patientinnen

Tab. 2.4 Details der benignen Untersuchungsgruppe aus Kollektiv II.

Alter	Mittleres Alter	51,04 Jahre
	Minimum	16 Jahre
	Maximum	82 Jahre
Art der benignen Erkrankung	Inklusionszyste	4 Tumore
	Follikelzyste	3 Tumore
	Corpus Luteum Zyste	3 Tumore
	Endometriosezyste	8 Tumore
	Einfach seröse Zyste	12 Tumore
	Seröse Zystadenome	10 Tumore
	Muzinöse Zystadenome	10 Tumore
	Seröse Zystadenofibrome	6 Tumore
	Muzinöse Zystadenofibrome	1 Tumor
	Brenner Tumoren	1 Tumor
	Teratome	8 Tumore
	Fibrome	2 Tumore
	Paraovarialzysten	1 Tumor
	Entzündliche Veränderung	7 Tumore
	Kein Befund	2 Fälle

Die pathologische Untersuchung der 33 malignen Tumoren des Ovars, die später für diese Arbeit histologisch gefärbt und ausgewertet wurden, ergab, dass es sich in 32

Fällen um epitheliale Ovarialkarzinome handelt. Von diesen sind 26 dem serösen, eines dem muzinösen und fünf dem endometroiden Typ zuzuordnen, ein Ovarialkarzinom konnte nicht näher klassifiziert werden (Abb. 2.3).

Bei der histologischen Untersuchung der 78 benignen Befunde ergaben sich vier Inklusionszysten, drei Follikelzysten, drei Corpus Luteum Zysten, acht Endometriosezysten und zwölf „einfach seröse Zysten“. Insgesamt sind in Kollektiv II somit 30 zystische benigne Veränderungen enthalten.

Die zweite Gruppe bilden die soliden benignen Tumoren (n=39). Zu dieser gehören zehn seröse Zystadenome, zehn muzinöse Zystadenome, sechs seröse Zystadenofibrome, ein muzinöses Zystadenofibrom, ein Brenner-Tumor, acht Teratome, zwei Fibrome und eine Parovarialzyste.

In die Auswertung der benignen Befunde gingen zudem sieben entzündliche Veränderungen der Adnexe sowie zwei nicht näher klassifizierte benigne Befunde ein (Abb. 2.4).

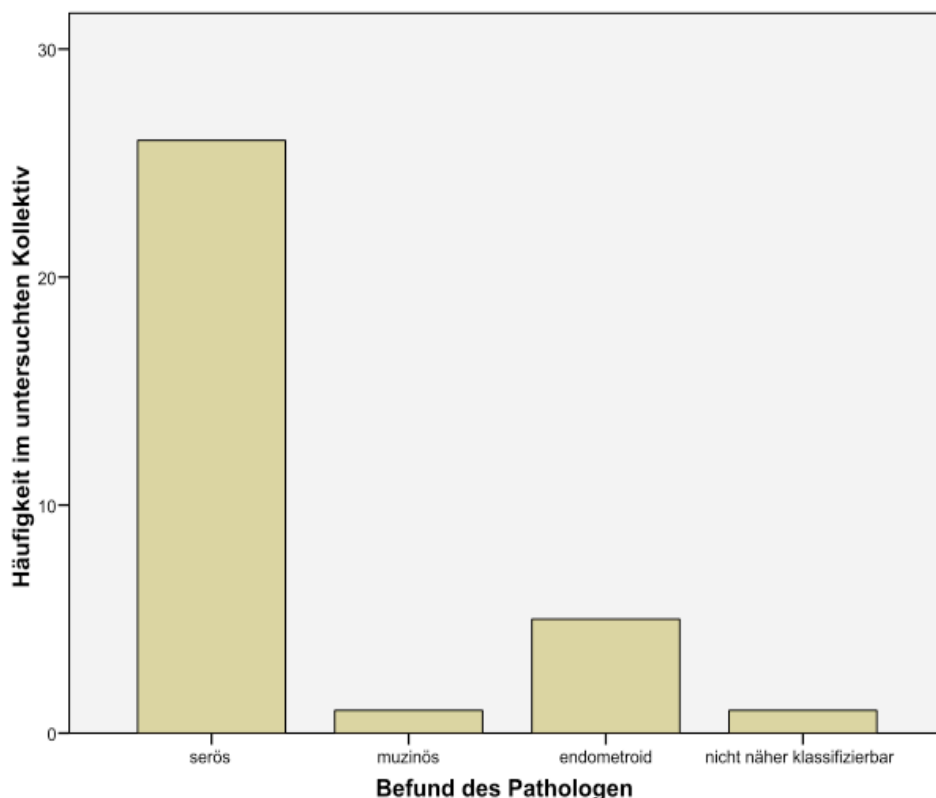


Abb. 2.3 Überblick zur Verteilung des histologischen Typs aller ermittelten malignen histologischen Befunde (n=32): Seröses Ovarialkarzinom: n= 26; Muzinöses Ovarialkarzinom: n= 1; Endometroides Ovarialkarzinom n= 5; ferner n= 1 nicht näher klassifizierbar.

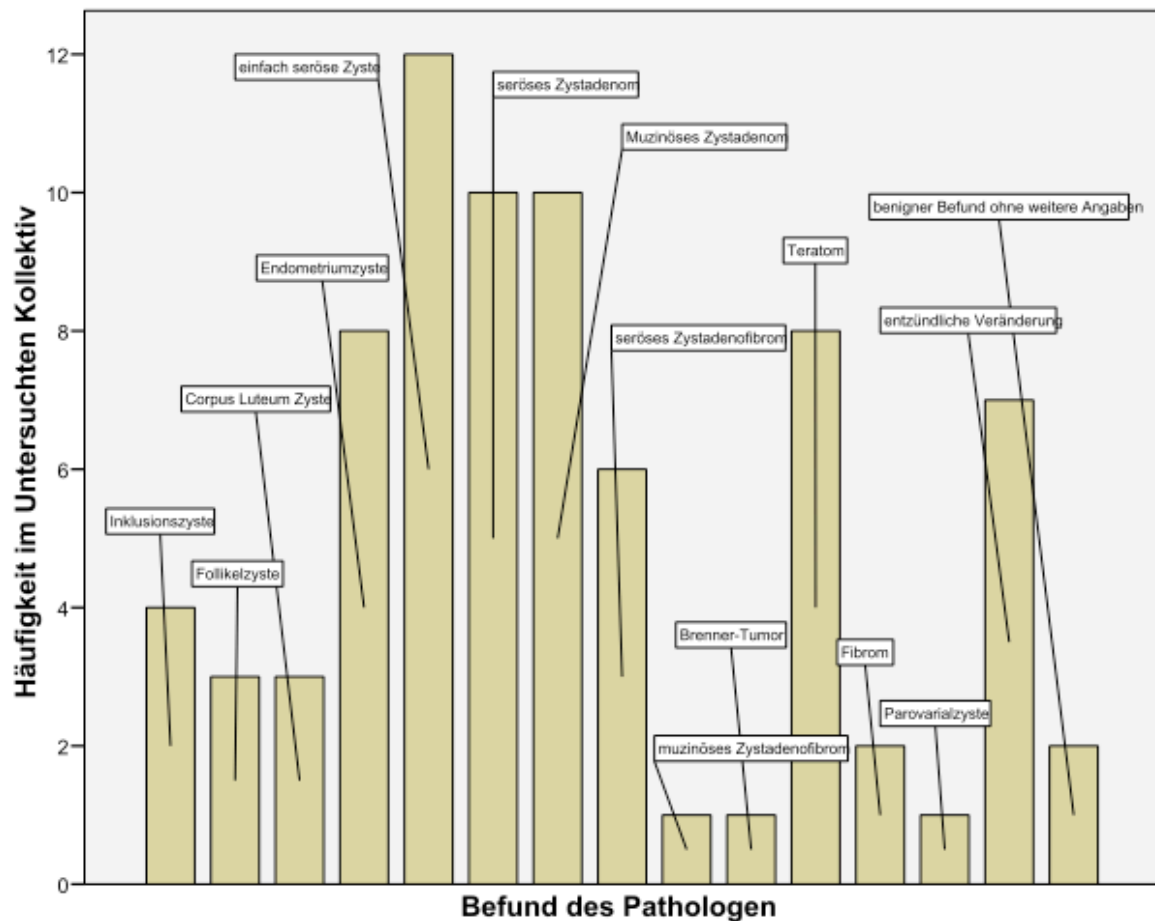


Abb. 2.4 Überblick zur Verteilung des histologischen Typs aller ermittelten benignen histologischen Befunde (n=76) sowie n=2 Fälle, die innerhalb der benignen Gruppe nicht weiter klassifiziert werden konnten: Inklusionszyste (n=4); Follikelzyste (n=3); Corpus Luteum Zyste (n=3); Endometriosezyste (n=8); einfach seröse Zyste (n=12); seröses Zystadenom (n=10); mucinöses Zystadenom (n=10); seröses Zystadenofibrom (n=6); mucinöses Zystadenofibrom (n=1); Brenner-Tumor (n=1); Teratom (n=8); Fibrom (n=2); Parovarialzyste (n=1) entzündliche Veränderung der Adnexe (n=7).

2.2 Verwendete Geräte, Chemikalien, Lösungsansätze und Antikörper

2.2.1 ELISA

- Verwendete Geräte:
 - Pipetten Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg)
 - ELISA-Reader MRX II und Revelation Software Version 4.22 (Dynex Technologies, USA)
 - Mini-Spin (Eppendorf, Hamburg)
 - Vari-Shaker (Dynatech, Guernsey, GB)
- Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien
 - CA 72-4 ELISA-Kit (IBL Hamburg (REF54111))
 - HE4-ELISA-Kit (Fujirebio Diagnostics, Göteborg, Schweden (Prod. No. 404-85))
 - ELISA-Kit (R & D Systems, Minneapolis, USA (Katalog Nummer DY1245))
 - Mikrotiterplatte MaxiSorp 96 Well (Nunc, Langenselbold)
 - Waschpufferkonzentrat (R&D Systems Nr. WA 126)
 - Reagent Diluent (R&D Systems Nr. DY 995)
 - Substrat Solution (R&D Systems Nr. DY 999) 1:1 Mischung aus Lösung A und Lösung B
 - Stop Solution (R&D Systems Nr. DY 994)
 - Galektin-3-ELISA-Kit (IBL Hamburg (REF BE59221))
 - Aqua destillata
 - PBS (Phosphate Buffered Saline)

2.2.2 Immunhistochemie

- Verwendete Verbrauchsmaterialien
 - Aqua destillata
 - Ethanol (Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München)
 - Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland)
 - Carboxylol (Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München)

- Peroxidase (Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München)
- PBS
- DAB (Dako North America, Carinteria, USA), 1 Tropfen DAB Chromogen + 1 ml Puffersubstrat
- Saures Hämalun (Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität, München)
- Adhäsiv beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, R. Langenbrinck, Teningen)
- Deckgläser (Superfrost Plus, R. Langenbrinck, Teningen)
- Eindeckmaterial Consul-Mount (Shandon, Pittsburgh, USA)

- Zusätzlich zum Nachweis von Galektin-1 (polyklonal):
 - Primär Antikörper Anti-h-Galektin-1 (goat IgG); polyklonal (R&D Systems, Minneapolis, USA), Verdünnung 1 : 3000 in PBS
 - Detektionssystem Vectastain elite ABC-Kit (goat IgG) (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
 - Power-Block (Universal Blocking reagent 10x, Firma BioGenex, San Ramon, USA)

- Zusätzlich zum Nachweis von Galektin-3 (monoklonal):
 - Primär Antikörper Anti-Galektin-3; Klon 9C4 (mouse IgG) (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK), 1:500 verdünnt in PBS.
 - Detektionssystem Vectastain elite ABC-Kit (mouse-IgG) (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
 - Normalserum zum Blockieren

2.3 Festphasen-ELISA-Sandwich-Verfahren (schematisch)

Mittels eines Enzym-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Sandwich-Verfahrens wurde die Konzentration der Biomarker CA 125, CA 72-4, HE4, Galektin-3 und Mouse-Galektin-1 in den Seren der Patientinnen des Kollektivs I bestimmt.

Der ELISA bedient sich eines Enzyms um die Konzentration eines Antigens in einer Probe zu bestimmen. Das Enzym wird dabei mittels eines Antikörpers an das nachzuweisende Antigen gebunden. Durch Zugabe eines Substrates wird ein Signal proportional zur Konzentration des Markers erzeugt, welches darauf detektiert und quantifiziert werden kann (Key, 2006, Luttmann et al., 2006).

Zunächst wird ein so genannter Fänger-Antikörper auf der adsorbativen Oberfläche einer 96-Well Mikrotiterplatte immobilisiert („Coating“).

Um zu verhindern, dass enzymmarkierte Antikörper oder Antigene später unspezifisch an noch freien Bindungsstellen anhaften, müssen diese nach dem Coaten zum Beispiel mittels Bovinem Serumalbumin (BSA), Gelatine oder Milchpulver, die mit keiner Komponente des Assays interagieren, abgeblockt werden. Dadurch wird die Hintergrundaktivität auf ein Minimum reduziert.

Wichtig ist ferner vor Durchführung des Tests alle Reagenzien, Proben und die Mikrotiterplatte auf Raumtemperatur zu bringen und die Reagenzien und Proben nochmals mit dem mini-shaker zu durchmischen.

In die einzelnen Wells der vorbereiteten Platte kann anschließend das Serum mit dem nachzuweisenden Antigen pipettiert und über eine bestimmte Zeit inkubiert werden. Während dieser Zeit bindet der Fängerantikörper das Antigen und immobilisiert es. Nicht gebundene Bestandteile werden durch Waschschriffe entfernt (Luttmann et al., 2006).

Anschließend wird ein zweiter Antikörper, der an ein anderes Epitop des immobilisierten Antigens bindet, zugegeben. Dieser Zweite, so genannte Detektions-Antikörper ist enzymkonjugiert, z.B. mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) (Abb.2.5). Alternativ kann auch das (Strept-)Avidin-Biotin-System zur Bindung des Enzyms an den Antikörper benutzt werden. Dabei ist der Detektionsantikörper mit Biotin verknüpft. Enzym-markiertes (Strept-)Avidin bindet dann in einem weiteren Schritt an das Biotin. Da (Strept-)Avidin bis zu vier Biotin-Moleküle binden kann,

können mehrere Signalgebermoleküle an ein Antigen binden und so die Signalstärke und damit auch die Testsensitivität erhöhen (Schneider et al., 2006).

Nach Inkubation werden nichtgebundene Antikörper durch einen Waschschrift entfernt.

Je nachdem welches Enzym an den Antikörper gebunden ist, wird jetzt das entsprechende Substrat hinzugegeben, für Peroxidase verwendet man z.B. häufig Tetramethylbenzidin (TMB). Durch die enzymatische Reaktion bildet sich ein blauer Farbstoff. Durch Zugabe einer so genannten Stop-Lösung (z.B. Schwefelsäure, Phosphorsäure) wird das Enzym denaturiert und die Reaktion somit gestoppt. Der blaue Farbstoff schlägt in eine gelbe Färbung um. Das Farbsignal wird mittels eines Photometers bei der entsprechenden Wellenlänge messbar. Die gemessene optische Dichte (OD) ist dabei direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe (Key, 2006). Die Quantifizierung der Analytkonzentration erfolgt dann über den Vergleich mit den Messwerten so genannter Standards (Analytlösungen bekannter Konzentration), deren OD-Werte gegen die entsprechende Konzentration als Sättigungskurve graphisch aufgetragen werden, so dass die Konzentration in den unbekanntem Proben berechnet werden kann (Key, 2006).

Der Sandwich-Assay ist ein sehr sensitives Testsystem, dass sich gut eignet, wenn mit niedrigen Antigenkonzentrationen in der Probe gerechnet wird. Seine theoretische Sensitivität liegt bei 10^{-15} bis 10^{-16} mol/l (Luttmann et al., 2006).

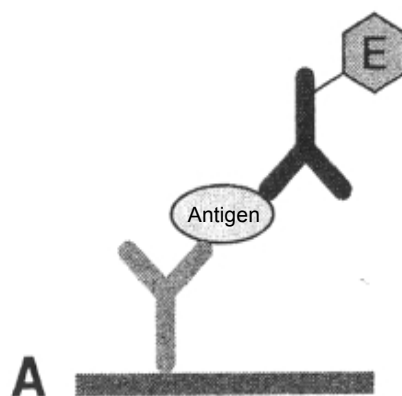


Abb. 2.5 Anordnung der in den verschiedenen Schritten aufgetragenen Komponenten beim Sandwich-Assay. Verändert nach Key, 2006.

2.3.1 Bestimmung von CA 125

Die Messung der CA 125-Konzentration in den oben genannten Seren wurde von Dr. med. Anamur Lan Schuhmacher im Rahmen ihrer 2008 veröffentlichten Dissertation durchgeführt (Schuhmacher, 2008). Verwendet wurde ein halbautomatisches Analyseverfahren (IMMULITE® 2000, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn). Die hierbei gewonnenen Daten wurden für unsere weiterführenden Analysen als Referenz verwendet.

2.3.2 Bestimmung von CA 72-4

Bei diesem Test zur Bestimmung von CA 72-4 handelt es sich um einen one-step Sandwich-ELISA. Das bedeutet, dass das Enzym (hier HRP) diesmal direkt an den Sekundär-Antikörper gebunden ist und in einem Schritt mit den Proben zugegeben und inkubiert wird. Laut Hersteller liegt der Messbereich bei 0-100 U/ml, die Sensitivität beträgt <0,311 U/ml, und Intra- und Inter-Assay-Varianz liegen bei <5 % bzw. <10 %.

Nach Vorbereitung aller Reagenzien gemäß der im Kit enthaltenen Anleitung werden Standards, Kontrollen und Proben in die mit monoklonalem Anti-CA 72-4-Antikörper beschichteten Wells pipettiert. Dazu kommt im selben Schritt die Enzym-Konjugat-Lösung, die den monoklonalen Sekundärantikörper enthält, der mit HRP konjugiert ist. Um sicherzustellen, dass der Inhalt der Wells gut miteinander vermischt ist, wird die Mikrotiterplatte für einige Sekunden sanft gerüttelt. Anschließend wird die Platte ohne Abdeckung für 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgen fünf Waschschriffe. Danach wird die Substratlösung (Tetramethylbenzidin) zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird anschließend durch die Zugabe der Stop-Lösung (H₂SO₄) beendet. Innerhalb von zehn Minuten nach Zugabe der Stop-Lösung wird die optische Dichte bei 450nm im ELISA-Reader gelesen.

2.3.3 Bestimmung von HE4

Dieser Test beruht auf dem direkten Sandwich-Verfahren, bei dem nicht der Fänger-Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden ist, wie bei der oben beschriebenen Methode, sondern (Strept-)Avidin. Die so gecoatete Platte wird im ersten Schritt des Verfahrens zusammen mit biotinyliertem, monoklonalem Anti-HE4-Antikörper inkubiert. Der Antikörper bindet dabei über das Biotin an das (Strept-)Avidin der

Platte. Die beiden hier verwendeten Antikörper 2H5 und 3D8 sind monoklonale, murine Antikörper, die gegen zwei Epitope der C-WFDC-Domäne von HE4 gerichtet sind. Der Hersteller gibt für diesen ELISA einen Messbereich von 15-900pM, eine Nachweisgrenze von <15pM und eine funktionelle Sensitivität von <25pM an. Die Präzision soll einem Gesamtvariantionskoeffizienten von <15 % entsprechen, Verdünnunlinearität und Wiederfindung lägen bei 100+/-15 %.

Die mit (Strept-)Avidin gecoatete Mikrotiterplatte wird vor Gebrauch mit Waschpuffer gewaschen, Standards, Kontrollen und Proben werden in die Wells pipettiert. Dazu wird der biotinylierte monoklonale Anti-HE4-Antikörper 2H5 (Maus) pipettiert. Anschließend wird die Platte eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Vari-Shaker inkubiert. Ist HE4 in den Proben, Standards oder Kontrollen vorhanden, so wird es von dem biotinylierten Antikörper 2H5 während der Inkubation gebunden und über Bindung des Biotins an (Strept-)Avidin immobilisiert. Nach dieser ersten Inkubation folgen drei Waschschrte. Anschließend wird die Tracer-Working-Solution, die den HRP-konjugierten Anti-HE4-Sekundärantikörper 3D8 (ebenfalls monoklonal) enthält, dazu pipettiert und die so bestückte Platte wieder für eine Stunde auf dem Vari-Shaker inkubiert. Es folgen sechs Waschschrte, anschließend wird die Substratlösung (gepuffertes Wasserstoffperoxid und TMB) zugegeben. Es folgen 30 Minuten Inkubation auf dem Vari-Shaker. Zum Schluss wird die Stop-Lösung (0,12 M HCL) dazu pipettiert und untergemischt, wodurch die Meerrettichperoxidase denaturiert und somit die Reaktion gestoppt wird. Die Platte wird sofort im ELISA-Reader bei 405nm ausgelesen. Dabei wird für jeden Test eine Standardkurve erstellt und die HE4-Konzentrationen werden aus dieser Standardkurve abgelesen.

2.3.4 Bestimmung von Galektin-1

Da zum Zeitpunkt der Messung kein kommerzieller Kit zur Detektion von humanem Galektin-1 zur Verfügung stand, wurde ein Mouse-Galektin-1 ELISA verwendet. In den Herstellerangaben dieses ELISAs wird eine Sensitivität von 125pg/ml angegeben. Die Spezifität betreffend soll keine Kreuzreaktivität oder Wechselwirkung mit rekombinantem Mouse-Galektin-4 und -8 und mit rekombinantem menschlichen Galektin-3 und -7 bestehen.

Zunächst muss der Fänger-Antikörper Anti-Mouse-Galektin-1 (Ziege) in PBS verdünnt und eine 96-well-Mikrotiterplatte über Nacht bei Raumtemperatur damit

gecoatet werden. Am nächsten Tag wird die Platte mehrmals gewaschen und mit Reagent Diluent für eine Stunde blockiert. Es folgen weitere drei Waschschriffe. Die gecoateten Wells werden nun mit Standards (verdünnt in Reagent Diluent) und Proben befüllt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wird der biotinylierte Sekundär-Antikörper anti-Mouse-Galektin-1 (Ziege) in die Wells pipettiert und ebenfalls für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann gewaschen. Anschließend wird (Strept-)Avidin-HRP in die Wells gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Es folgt der Waschschriff. Danach wird die Substrat Lösung (aus Lösung A H_2O_2 und Lösung B Tetramethylbenzidin) dazu pipettiert und für 20 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss wird die Stop-Lösung (2 N H_2SO_4) hinzugefügt. Die optische Dichte wird im ELISA-Reader bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 540nm gemessen.

2.3.5 Bestimmung von Galektin-3

Der Galektin-3-ELISA von IBL funktioniert prinzipiell nach dem oben erläuterten Schema. Laut Hersteller liegt seine Sensitivität bei 0,12ng/ml, es besteht keine Kreuzreaktivität mit anderen Faktoren des Immunsystems. Die Inter-/Intra-Assy-Varianz liegt bei 11,4 respektive 6,4 %.

Zunächst wird die Mikrotiterplatte, die bei diesem Assay bereits gebrauchsfertig mit einem Fänger-Antikörper gecoatet ist, mit Standards und Proben (1:2 mit einer im Kit enthaltenen Lösung verdünnt) bestückt, aus denen die Galektin-3-Konzentration bestimmt werden soll. Dazu wird direkt ein Anti-Galektin-3-Sekundärantikörper pipettiert, der mit Biotin konjugiert ist. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur und drei Waschschriffen wird (Strept-)Avidin-HRP (mit Meerrettichperoxidase konjugiertes (Strept-)Avidin) in die Wells pipettiert. Darauf wird die abgedeckte Mikrotiterplatte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Vari-Shaker bei 200 rpm inkubiert. Während dieser Zeit bindet das mit HRP konjugierte Streptavidin an das Biotin des Sekundärantikörpers, so dass Galektin-3 nun indirekt an das Enzym HRP gebunden ist. Nach der Inkubationszeit folgen wieder mehrere Waschschriffe, anschließend wird die Substratlösung, hier TMB, dazu pipettiert. Die Platte wird nun im Dunkeln bei Raumtemperatur zehn Minuten inkubiert.

Zum Schluss wird die Stop-Lösung (1M Phosphorsäure) dazu gegeben, die die HRP denaturiert und dadurch die Reaktion stoppt. Die Platte wird daraufhin zügig bei 450nm (Referenzwellenlänge 620nm) im ELISA-Reader ausgelesen. Die Konzentration von Galektin-3 in den Proben wird über die gemessene Extinktion und die Sättigungskurve der Standards bestimmt. Der ausgegebene Wert wurde mit zwei multipliziert, da die Proben im Verlauf des Experiments gemäß Protokoll zur Vermeidung eines High-Dose-Hook-Effektes, im Verhältnis 1:2 verdünnt wurden. Ein solcher Effekt tritt auf, wenn die Konzentration in der Probe die Konzentration im höchsten Standard überschreitet und es dadurch zu falsch niedrigen Werten kommt.

2.4 Immunhistochemie

Den immunhistochemischen Untersuchungen liegen die während der Operation gewonnen, fixierten und auf Objektträger aufgezogenen Präparate des Kollektivs II zu Grunde. Ermittelt wurden die Expression von Galektin-1 und Galektin-3 in benignen und malignen Tumoren und im peritumoralen Stroma.

2.4.1 In situ-Immunlokalisation von Galektin-1 und Galektin-3

- Fixierung:

Dem Körper entnommenes Gewebe muss aus unterschiedlichen Gründen, wie z.B. autolytischen Vorgängen oder zur Ermöglichung der Antikörper-Penetration durch Zellmembranen, fixiert werden. Durch die Fixierung bleibt außerdem die Morphologie des Präparates erhalten - es wird konserviert und gehärtet.

Um Gewebe zu fixieren sollte es binnen 30 Minuten nach Entnahme in das Fixativ gelegt und dabei vollständig bedeckt werden. Die Dauer der Fixation richtet sich nach der Größe des Gewebes. Bei großen Gewebestücken wird zunächst *in toto* für 24h fixiert. Anschließend werden relevante Teile entnommen (ca. 10 x 10 x 5 mm oder kleiner) und nochmals 24h fixiert.

- Einbettung:

Der Fixierung folgt die Einbettung des Gewebestückes in Paraffin. Dazu wird zunächst das Fixativ gründlich mit destilliertem Wasser ausgewaschen, dann folgt die Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe. Zur Entfettung und Entalkoholisierung wird Xylol verwendet, das sich sowohl mit Ethanol als auch mit Paraffin mischt. Zum Schluss wird das Präparat in einer geeigneten Form mit 60°C warmem Paraffin durchtränkt (dieser Schritt erfolgt in einem Automaten). Nachdem das Paraffin erkaltet ist, wird der Block aus der Form gelöst und im Gefrierfach gekühlt (Luttmann et al., 2006).

- Schneiden:

Die Paraffinblöcke werden zum Schneiden in ein Schlittenmikrotom eingespannt, mit dem dann 2-3 µm dünne Schnitte angefertigt werden. Diese werden auf der Oberfläche eines Wasserbades aufgefangen. Von dort werden sie auf adhäsiv

beschichtete Objektträger überführt und über Nacht bei 56-58°C im Brutschrank getrocknet.

- Entparaffinierung:

Die Präparate werden zunächst für 15 Minuten in Xylol entparaffiniert und dann über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (2x 100 %iger Alkohol + 2x 96 %iger Alkohol + 2x 70 %iger Alkohol). Anschließend werden Ethanolreste mit Aqua destillata herausgewaschen.

- Blockierung endogener Enzyme:

Bei Anwendung von Enzymmarkierungen zum Antigennachweis müssen eventuell im Präparat vorhandene endogene Enzyme blockiert werden, weil sie sonst ebenfalls zugegebenes Substrat umsetzen und falsch positive Ergebnisse erzeugen würden (Luttmann et al., 2006). Da bei allen hier durchgeführten Färbungen Peroxidase verwendet wird, werden die Schnitte 20 Minuten in 3 %igem H₂O₂ in Methanol inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren.

- Epitop-Demaskierung:

Vor allem bei, wie hier, formalinfixierten Schnitten ist eine Antigen-Demaskierung notwendig, denn es muss davon ausgegangen werden, dass durch das Fixationsmittel (hier 4 %iges neutral gepuffertes Formalin) die Proteine des Präparates in unterschiedlichem Maße denaturiert und somit besonders in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur verändert werden können (Buchwalow et al., 2006, Luttmann et al., 2006).

Durch die Demaskierung wird die Zahl an immunreaktiven Epitopen wieder erhöht (Luttmann et al., 2006). Dazu werden die Schnitte in kochendem Na-Citratpuffer (pH 6,0) in einem Dampfkochtopf bei Überdruck erhitzt. Nach Druckausgleich durch Öffnung des Deckels werden die Schnitte durch Nachlaufen von Leitungswasser heruntergekühlt. Es folgt ein Waschschrift: 2 x 2 Minuten in PBS.

- Blockierung unspezifischer Protein-Bindungsstellen:

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, müssen unspezifische Proteinbindungsstellen mit konkurrierendem Protein abgeblockt werden (Luttmann et al., 2006). Im Falle von Galektin-3 wird dazu Blockierungsserum (drei Tropfen

Normalserum aus der gleichen Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammt, auf 10ml sterilem PBS) verwendet, das nach Auftrag eine Einwirkzeit von 20 Minuten hat. Für die Detektion von h-Galektin-1 wird mit Power-Block Universal Blocking reagent 10x für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem nächsten Schritt wird das Blockierungsreagenz abgeschüttet.

- Immundetektion mit der ABC-Methode:

Bei dieser Methode (Abb. 2.6) macht man sich wieder die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. Es bindet zunächst ein Primärantikörper (monoklonales Maus-IgG für Galektin-3 bzw. polyklonales Ziegen-IgG für Galektin-1) an das nachzuweisende Antigen. Der Primärantikörper verbleibt bei einer Temperatur von 4°C über Nacht auf den Schnitten.

Nach zwei Waschschritten in PBS wird am nächsten Tag der Sekundärantikörper (10ml PBS + 3 Tropfen Normalserum + 1 Tropfen Anti-Maus bzw. Anti-Ziegen IgG) zugegeben, der für 30 Minuten auf den Schnitten verbleibt. Dieser Brückenantikörper ist mit dem wasserlöslichen Vitamin Biotin markiert und bindet während dieser Zeit an den Primärantikörper.

Nach einem Waschschrift wird der ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Komplex) zugegeben. Das (Strept-)Avidin des Komplexes, das mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist, bindet über das Biotin an den Antikörper und verknüpft die Peroxidase so indirekt mit diesem. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein mit hoher Affinität zu Biotin. Alternativ wird (Strept-)Avidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* verwendet. Beide können vier Biotin-Moleküle binden. Weil somit pro Antikörper, der an das Galektin des Präparates gebunden hat, mehrere Enzyme binden können, führt die Verwendung des ABC-Komplexes zu einer Signalverstärkung. Der ABC-Komplex muss 30 Minuten vor Gebrauch hergestellt werden (4 Tropfen Reagenz A + 4 Tropfen Reagenz B + 10 ml steriles PBS). Die Inkubationszeit beträgt auch bei diesem Schritt 30 Minuten. Gibt man das Chromogen 3,3 Diaminobenzidin (DAB) als Substrat dazu und belässt es eine Minute auf dem Schnitt, wird dieses mit dem Substratpuffer H_2O_2 als Katalysator von der HRP umgesetzt und färbt die Strukturen, die Antikörper gebunden haben, braun an. DAB ist in organischen Lösungsmitteln unlöslich und kann daher die zur anschließenden Dehydrierung notwendige aufsteigende Alkoholreihe und das zur Entparaffinierung verwendete Xylol durchlaufen und mit Eukitt bedeckt werden.

Vorteil dieser Methode ist die hohe Sensitivität. Vor dem nächsten Schritt wird wieder zweimal zwei Minuten in Aqua destillata gespült (Noll and Schaub-Kuhnen, 2002).

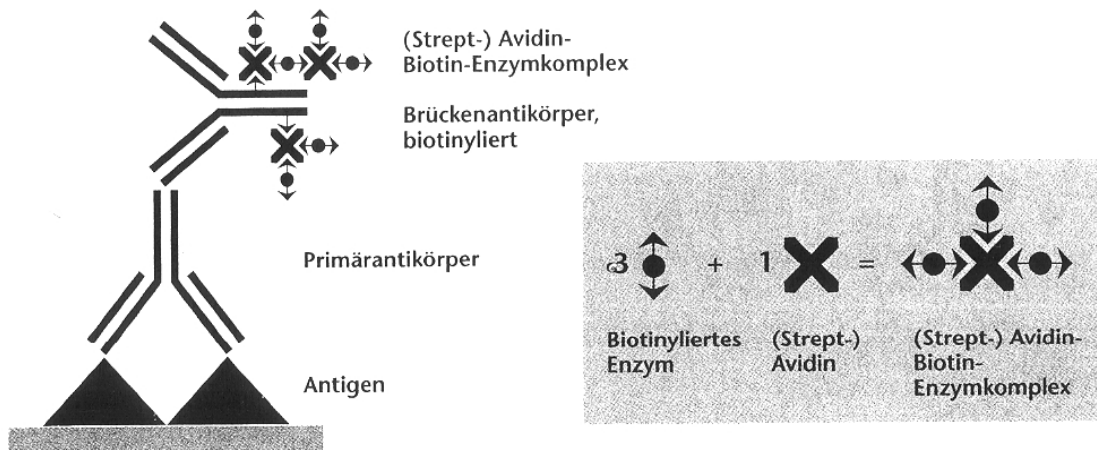


Abb. 2.6 Schema der ABC-Methode. Aus: Noll and Schaub-Kuhnen, 2002.

- Gegenfärbung:

Mit einer geeigneten Gegenfärbung kann der unspezifisch gefärbte Gewebehintergrund dargestellt werden (Luttmann et al., 2006). Hier erfolgte die Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer, das für 2 Minuten auf den Objektträgern verbleibt. Hämalaun ist ein basischer Farbstofflack in saurer Lösung. Da das Milieu stark sauer ist, werden nur die Kerne gefärbt, weil nur sie noch eine negative Ladung haben. Die positiv geladenen basischen Farbstoffe, lagern sich dabei an die negativ geladene Phosphatgruppe der DNS im Kern an. Durch fünfminütiges, intensives Spülen mit Leitungswasser wird dann die blaue Färbung erreicht (Bläuen). Die Färbung wird durch das Spülen außerdem haltbarer, da der Farbstoff im Alkalischen schlecht löslich ist. Positive Zellen sind nun braun gefärbt während Zellen, die das jeweilige Antigen nicht exprimieren, sich blau darstellen.

- Nachbehandlung und Eindeckung:

Das gefärbte Präparat wird zunächst wieder in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Es folgt eine Entparaffinierung und Aufhellung mit Xylol. Zum Schluss erfolgt das Eindecken mit Deckglas und Eindeckmedium. Nach Aushärtung des Mediums ist das Präparat für Jahre haltbar.

- **Positiv-Kontrolle:**

Als Positiv-Kontrolle des Detektionssystems führt man ein oder mehrere Präparate (Kolon für Galektin-1, Kolon und Plazenta für Galektin-3) mit, die das relevante Antigen sicher exprimieren.

2.4.2 Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte

Die Auswertung der Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch (Lichtmikroskop der Firma Leica, Solms). Dabei wurden das Karzinomgewebe bzw. das benigne veränderte Gewebe und das umgebende Stroma jeweils getrennt betrachtet und bewertet.

Das jeweilige Gewebe wurde zunächst mit Lupenvergrößerung (10fach) aufgesucht und dann bei stärkerer Vergrößerung (25fach) beurteilt.

Die Quantifizierung der Antigenexpression erfolgte dann nach dem immunreaktiven Score (IRS) von Remmele und Stegner. Dieser Score berücksichtigt zwei Parameter: Erstens die Farbintensität (Staging Intensity = SI), die Werte zwischen 0 = keine Färbereaktion, über 1 = schwache Färbereaktion und 2 = mäßige Färbereaktion bis 3 = starke Färbereaktion annehmen kann. Zweitens den Prozentsatz der Zellen, die das gesuchte Antigen exprimieren (Prozentsatz positiver Zellen (PP)). Der Prozentsatz positiver Zellen kann Werte zwischen 0 = keine positiven Zellen, 1 = <10 % positive Zellen, 2 = 10-50 % positive Zellen, 3 = 51-80 % positive Zellen und 4 = >80 % positive Zellen annehmen. Der IRS-Score ergibt sich dann aus dem Produkt der beiden eben genannten Parameter. Damit kann der Score minimal 0 und maximal 12 betragen. Dabei bedeutet ein Score von 0 "keine Expression", ein Score von 1-3 "geringe Expression", ein Score von 4-8 "mäßige Expression" und ein Score von 9-12 "starke Expression" (Remmele and Stegner, 1987).

Die Fotodokumentation fand mit einer digitalen Kamera statt (Firma Olympus, Tokyo, Japan).

2.5 Statistische Analyse

Die Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerstatistikprogramms SPSS für Windows (Social Sciences Computer Software Version 14.0; SPSS Inc., Chicago, USA). Die statistische Signifikanz der Übereinstimmung der Tumormarkerwerte bzw. der IRS-Scores der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate zwischen den an malignen und benignen Tumoren erkrankten Patientinnen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Dabei handelt es sich um einen Rangsummentest, der die Mediane zweier unverbundener, nicht-normalverteilter Stichproben vergleicht (Kundt et al., 2010).

Um herauszufinden, ob sich die mittleren Ränge der Serumkonzentrationen der genannten Marker im Hinblick auf unterschiedliche Tumorstadien, Grading, Staging, Metastasen- bzw. Rezidivstatus signifikant unterscheiden oder ob verschiedene histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms zu unterschiedlich hohen Markerkonzentrationen im Serum führen, wurde jeweils der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Bei diesem handelt es sich wie beim U-Test nach Mann und Whitney um einen Rangsummentest, er kann jedoch für den Vergleich von mehr als zwei Merkmalen verwendet werden.

Bei beiden Testverfahren wurden Unterschiede bei p-Werten $<0,05$ als signifikant betrachtet.

Ferner wurden für die Biomarkerspiegel und und IRS-Scores der gefärbten Präparate Korrelationsanalysen durchgeführt. Dabei wurde jeweils der Korrelationskoeffizient nach Pearson ermittelt, der die Stärke eines Zusammenhanges zwischen zwei intervallskalierten Merkmalen quantifiziert und Werte zwischen -1 und +1 annehmen kann. Ein Wert von -1 bedeutet dabei einen vollständig negativen, ein Wert von +1 einen positiven linearen Zusammenhang. Solche Aussagen sind allerdings nur gültig, wenn der ermittelte Korrelationskoeffizient signifikant ist. Bei einem Signifikanzlevel p von $<0,01$ werden die Ergebnisse der Korrelationsanalyse als hochsignifikant, bei p $<0,05$ als signifikant betrachtet.

Um die Güte jedes Tumormarkers zu ermitteln und ihn mit anderen zu Vergleichen wurden „Receiver-Operating-Characteristic“ (ROC)-Kurven erstellt. Diese erhält man, wenn man für jeden möglichen Cut-off der Serumkonzentration den Anteil der Patientinnen mit falsch positivem Ergebnis (1-Spezifität) gegen den Anteil derjenigen mit richtig positivem Test (Sensitivität) aufträgt und die Punkte verbindet.

Schwellenwerte, die gut zur Unterscheidung Gesunder und Kranker geeignet sind, findet man in der oberen linken Ecke, möglichst nahe am Punkt (0/1) (Weiß, 2010).

Anschließend kann die Fläche unter dieser Kurve, die „Area Under the Curve“ (AUC) berechnet werden, mit deren Hilfe die Genauigkeit eines potentiellen Biomarkers beurteilt werden kann und ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Markern möglich ist. Die ROC-Kurven wurden mit dem Programm „R“, Version 2.13.2, erstellt (www.r-project.org).

Um die diagnostische Aussagekraft jedes einzelnen Markers und der Markerkombinationen zu ermitteln, wurden Sensitivitäten und Spezifitäten berechnet. Je näher die Sensitivität (richtig-positiv Rate) eines Markers dem Wert 1 ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass eine an einem malignen Ovarialtumor erkrankte Patientin auch als solche erkannt wird. Die Spezifität (richtig-negativ Rate) erfasst den Anteil der nicht erkrankten Patientinnen, die durch die Biomarker-Bestimmung auch als solche eingestuft werden (Weiß, 2010).

Der Grenzwert, mit dessen Hilfe am besten zwischen Karzinomen und benignen Tumoren unterschieden werden kann, wurde mit Hilfe der ROC-Kurven ermittelt. Für diesen Grenzwert wurden dann jeweils die Sensitivität und Spezifität berechnet. Um die Marker besser vergleichen zu können wurden die Sensitivitäten auch bei einer festgelegten Spezifität von 95 % berechnet.

Zur Erhöhung der Voraussagefähigkeit wurden die Marker miteinander kombiniert. Wegen des kleineren Patientenkollektivs blieb dies auf Zweierkombinationen beschränkt. Die Übersichtsgraphik hierzu wurde ebenfalls mit dem Programm „R“, Version 2.13.2, erstellt (www.r-project.org).

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung von CA 125, CA 72-4, HE4, Galektin-1 und Galektin-3 im Serum

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Konzentrationen der Muzine CA 125 und CA 72-4, des Glykoproteins HE4 und der Lektine Galektin-1 und -3 in den Seren der Patientinnen aus Kollektiv I ermittelt.

3.1.1 CA 125

Im Mann-Whitney-U-Test hat sich ein signifikanter Unterschied des CA 125-Spiegels zwischen den Ovarialkarzinompatientinnen und den Patientinnen mit benignen Erkrankungen ergeben. So sind der mittlere Rang sowie der Median und der Mittelwert des Serumspiegels bei den Karzinompatientinnen deutlich höher als bei der benignen Vergleichsgruppe. Der p-Wert beträgt $<0,001$. Dies wird durch Abbildung 3.1, sowie die Tabellen 3.1 und 3.2 illustriert.

Der ROC-Kurve für CA 125, ist in Abbildung 3.2 zu sehen. Nachdem die ROC-Kurve eines Markers mit 100 %iger Trennschärfe auf der linken bzw. oberen Begrenzungsseite des umschließenden Quadrates mit maximalem Abstand zur Diagonalen liegt, besitzt CA 125 zwar keine 100 %ige Trennschärfe, der Verlauf ist jedoch demjenigen einer idealen Kurve angenähert. So beträgt die AUC für CA 125 0,944, was mit einer guten Differenzierungsfähigkeit zwischen der malignen und der benignen Gruppe durch den Biomarker CA 125 vereinbar ist.

Durch CA 125 konnten, bezogen auf die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messungen, 91,2 % (Konfidenzintervall KI 86,7 % - 96,5 %) der Patientinnen bezüglich der Dignität ihrer Erkrankung korrekt zugeordnet werden. Der Schwellenwert, der dies ermöglicht, beträgt 55,1 U/ml. Es ergeben sich unter dieser Konstellation eine Sensitivität von 87,2 % (KI 76,9 % - 97,4 %) und eine Spezifität von 93,2 % (KI 86,5 % - 98,6 %).

Legt man zum besseren Vergleich der Marker eine Spezifität von 95 % zugrunde, so beträgt die Sensitivität von CA 125 61,5 % (KI 52,6 % - 70,5 %).

Tab. 3.1 Mittelwert und Median der Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		Statistik		Standardfehler
CA 125	maligne	Mittelwert	2420,05	1059,70
		Median	466,50	
	benigne	Mittelwert	24,16	5,68
		Median	9,31	

Tab. 3.2 Mittlerer Rang der Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
CA 125	maligne	28	65,82	1843,00
	benigne	55	29,87	1643,00
	Gesamt	83		

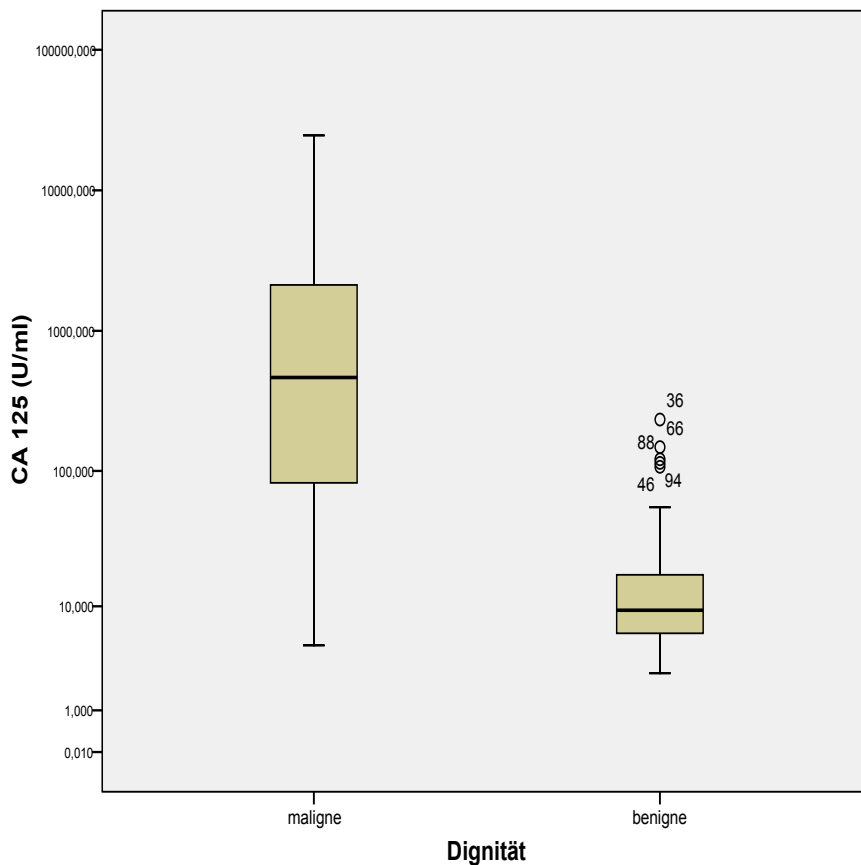


Abb. 3.1 Boxplot Diagramm (logarithmiert) zur Darstellung der CA 125-Konzentration (U/ml) im Serum von Patientinnen mit benignen (n=55) und malignen (n=28) Erkrankungen der Ovarien. Der waagrechte Balken entspricht dem Median. Die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und der 75. Perzentile an. Die Fehlerbalken beschreiben den größten Wert oberhalb der 75. Perzentile bzw. den kleinsten Wert unterhalb der 25. Perzentile, die nicht als Ausreißer bezeichnet werden. Ausreißer liegen zwischen 1,5 und 3 Boxenlängen oberhalb der 75. Perzentile. Sie sind durch Kreise repräsentiert.

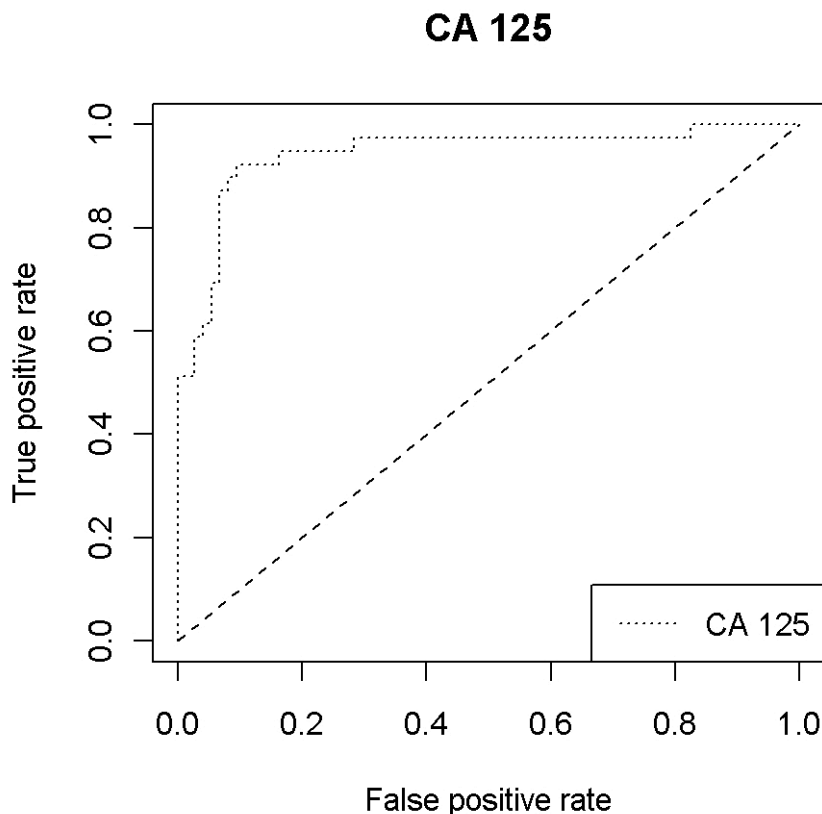


Abb. 3.2 ROC-Kurve für CA 125 (x-Achse: Anteil der falsch positiven Patientinnen oder 1-Spezifität; y-Achse: Anteil der richtig Positiven oder Sensitivität).

3.1.2 CA 72-4

Auch für CA 72-4 hat sich im Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zwischen der malignen und der benignen Patientinnengruppe ergeben. So ist der Median des Serumsiegels im Mann-Whitney-U-Test bei den Patientinnen mit malignen Erkrankungen signifikant höher als bei den Patientinnen mit benignen Erkrankungen ($p < 0,001$). Dies lässt sich auch anhand von Abbildung 3.3 nachvollziehen.

Die ROC-Kurve für CA 72-4 ist in Abbildung 3.4 zu sehen. Die AUC für CA 72-4 beträgt 0,726.

Die höchste Genauigkeit wird mit CA 72-4, bezogen auf die zugrundeliegenden Messungen, bei einem Schwellenwert von 5,876 U/ml erzielt. Ein Anteil von 82,8 % (KI 75,9 % - 90,8 %) der Patientinnen wäre so der korrekten Gruppe - maligne oder benigne - zugeordnet worden. Die resultierende Sensitivität liegt bei 53,3 % (KI 36,7 % - 70 %), die Spezifität bei 98,2 % (KI 94,7 % - 100 %).

Bei einer festgelegten Spezifität von 95 % liegt die Sensitivität von CA 72-4 bei 53,3 % (KI 42,9 % - 63,8 %).

Tab. 3.3 Mittelwert und Median der Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		Statistik		Standardfehler
CA 72-4	maligne	Mittelwert	28,83	9,24
		Median	6,71	
	benigne	Mittelwert	1,07	0,24
		Median	0,18	

Tab. 3.4 Mittlerer Rang der Serumspiegels der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
CA 72-4	maligne	30	56,88	1706,50
	benigne	57	37,22	2121,50
	Gesamt	87		

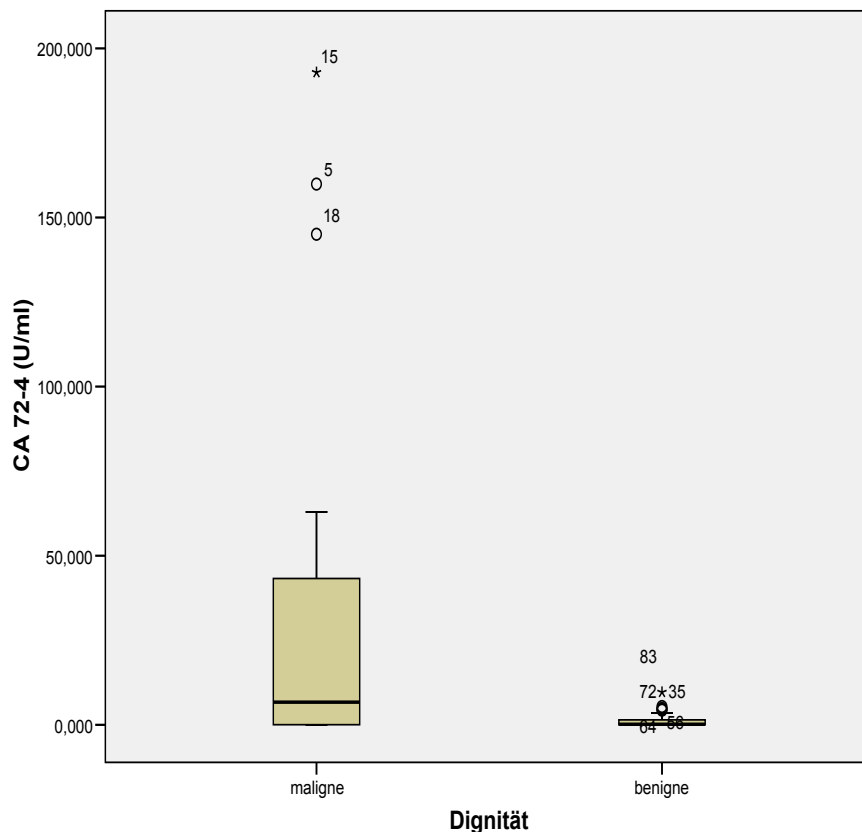


Abb. 3.3 Logarithmiertes Boxplot Diagramm zur Darstellung der CA 72-4 Konzentration (U/ml) im Serum von Patientinnen mit benignen (n=57) und malignen (n=30) Erkrankungen der Ovarien. Der waagrechte Balken entspricht dem Median. Die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und der 75. Perzentile an. Die Fehlerbalken beschreiben den größten Wert oberhalb der 75. Perzentile, die nicht als Ausreißer oder extreme Werte bezeichnet werden. Ausreißer liegen zwischen 1,5 und 3

Boxenlängen oberhalb der 75. Perzentile und sind durch Kreise dargestellt. Extreme Werte überschreiten die 75. Perzentile um >3 Boxenlängen. Sie sind mit einem Stern gekennzeichnet.

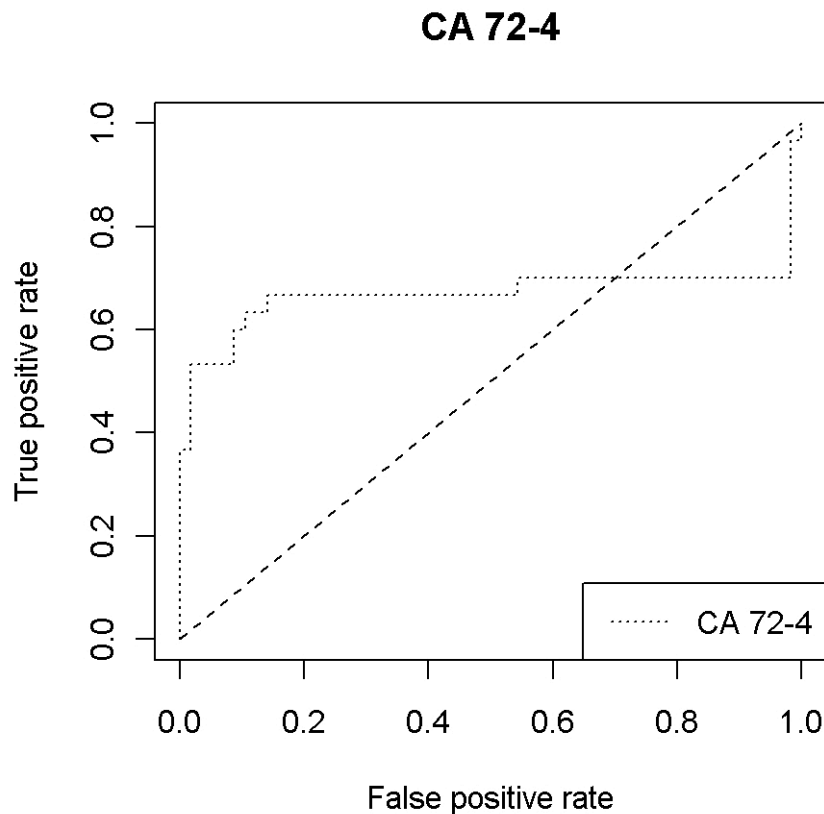


Abb. 3.4 ROC Kurve für CA 72-4 (x- u. y-Achse wie bei Abb. 3.2).

3.1.3 HE4

Der Median des HE4-Serumspiegels ist bei der an malignen Ovarialtumoren erkrankten Gruppe höher als bei der Vergleichsgruppe (Abb. 3.5). Dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,001$).

Die ROC-Kurve (Abb. 3.6) des Glykoproteins HE4 verläuft annähernd konvex mit weitem Abstand oberhalb der Diagonalen. Die AUC für HE4 beträgt 0,897.

Der optimale Cut-off, bei dem 85,5 % (KI 79,5 % - 94 %) korrekt zugeordnet worden wären, beträgt 118,9 pM. Die Sensitivität für diesen Grenzwert ergibt 62,1 % (KI 44,8 % - 79,3 %), die Spezifität ist 98,1 % (KI 94,4 % - 100 %).

Bei einer der Vergleichbarkeit wegen auf 95 % festgelegten Spezifität beträgt die Sensitivität 65,5 % (KI 55,3 % - 75,7 %).

Tab. 3.5 Mittelwert und Median der Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		Statistik		Standardfehler
HE4	maligne	Mittelwert	497,71	138,53
		Median	201,94	
	benigne	Mittelwert	32,20	4,07
		Median	20,37	

Tab. 3.6 Mittlerer Rang der Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
HE4	maligne	29	63,41	1839,00
	benigne	54	30,50	1647,00
	Gesamt	83		

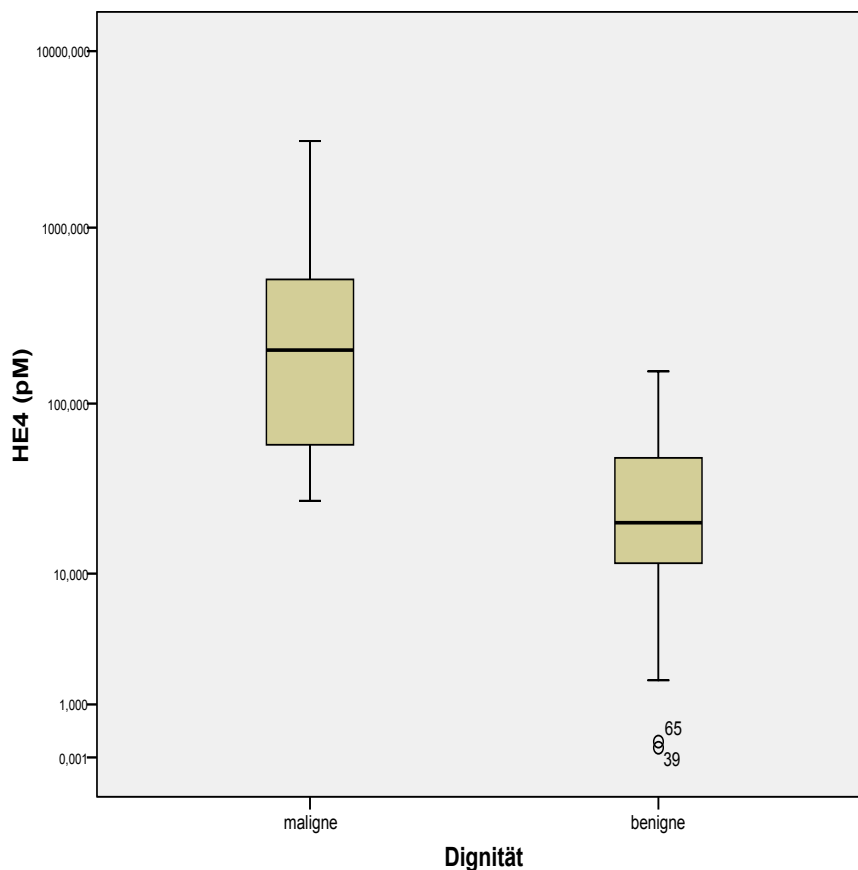


Abb. 3.5 Boxplot Diagramm zur Darstellung der HE4-Konzentration (pM) im Serum von Patientinnen mit benignen (n=54) und malignen (n=29) Erkrankungen der Ovarien. Der waagrechte Balken entspricht dem Median. Die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und der 75. Perzentile an. Die Fehlerbalken beschreiben den größten Wert oberhalb der 75. Perzentile bzw. den kleinsten Wert unterhalb der 25. Perzentile, die nicht als Ausreißer oder extreme Werte bezeichnet werden. Ausreißer liegen zwischen 1,5 und 3 Boxenlängen unterhalb der 25. Perzentile und sind durch Kreise dargestellt.

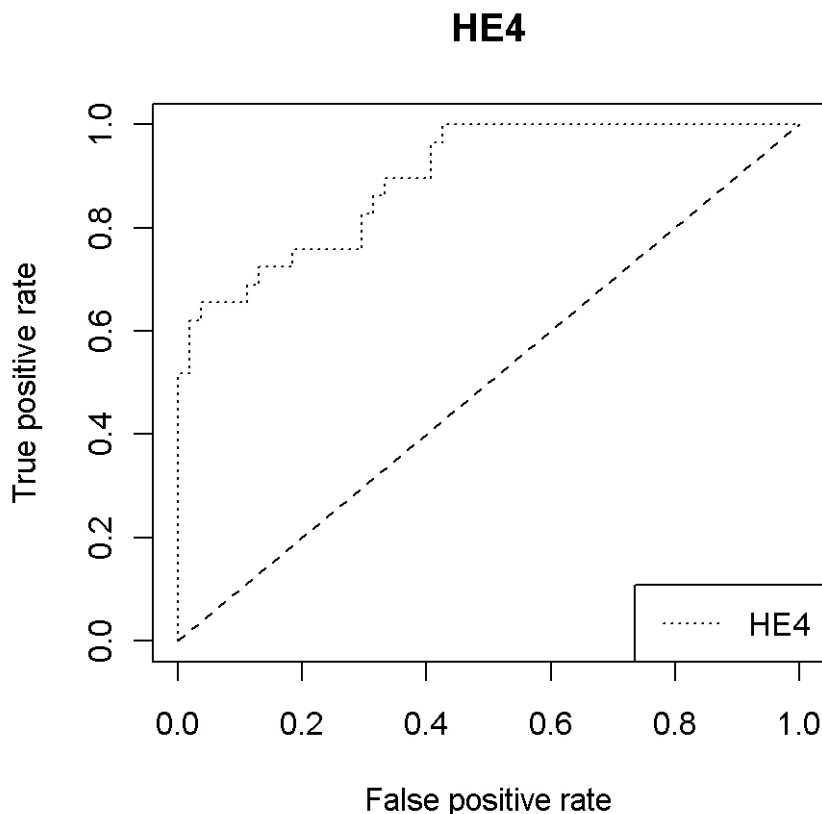


Abb. 3.6 ROC-Kurve für HE4 (x- u. y-Achse wie bei Abb. 3.2).

3.1.4 Mouse-Galektin-1

Die Bestimmung von Mouse-Galektin-1 in den Serumproben ergab im Mann-Whitney-U-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Patientinnengruppen ($p=0,101$). Illustriert wird dies auch durch die Ähnlichkeit der beiden Boxen im zugehörigen Boxplot-Diagramm (Abb. 3.7).

Der Median des Mouse-Galektin-1-Spiegels beträgt 341,947 pg/ml für maligne und 13,979 pg/ml für benigne Befunden.

Die ROC-Kurve für Mouse-Galektin-1 verläuft nahe entlang der Diagonalen und schneidet sie an zwei Stellen, wie in Abbildung 3.8 zu sehen ist. Die AUC des Markers Mouse-Galektin-1 beträgt 0,609.

Es wurden im optimalen Fall 66,2 % (KI 60 % - 77,5 %) der Patientinnen bezüglich der Dignität ihrer Erkrankung korrekt zugeordnet. Daraus resultiert eine Sensitivität von 0 % und eine Spezifität von 100 %. Der Schwellenwert ist in diesem Fall mit dem Maximalwert für Mouse-Galektin-1 gleichzusetzen und beträgt 146100 pg/ml. Bei

einer auf 95 % festgelegten Spezifität ergibt sich für Mouse-Galektin-1 eine Sensitivität von 0 %.

Tab. 3.7 Mittelwert und Median der Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		Statistik		Standardfehler
Mouse-Galektin-1	maligne	Mittelwert	24842,53	10129,68
		Median	341,95	
	benigne	Mittelwert	18177,93	6375,53
		Median	13,98	

Tab. 3.8 Mittlerer Rang der Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Mouse-Gelektin-1	maligne	27	46,30	1250,00
	benigne	53	37,55	1990,00
	Gesamt	80		

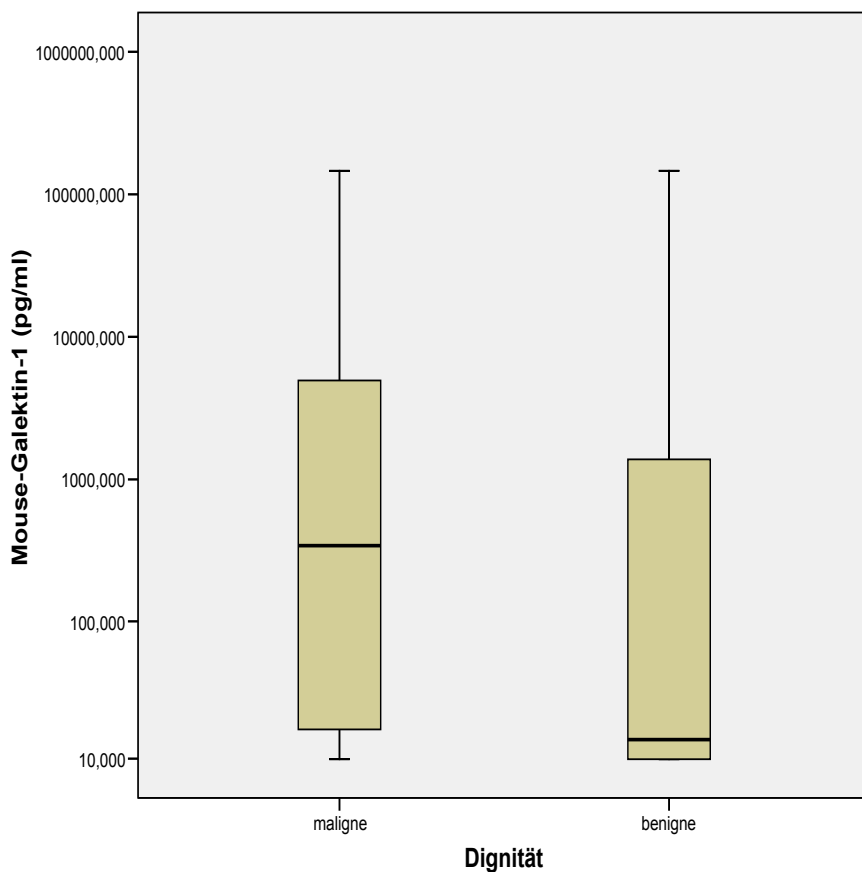


Abb. 3.7 Boxplot Diagramm zur Darstellung der Mouse-Galektin-1 Konzentration (pg/ml) im Serum von Patientinnen mit benignen (n=53) und malignen (n=27) Erkrankungen der Ovarien. Der waagrechte Balken entspricht dem Median. Die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und der 75.

Perzentile an. Die Fehlerbalken beschreiben den größten Wert oberhalb der 75. Perzentile bzw. den kleinsten Wert unterhalb der 25. Perzentile, die nicht als Ausreißer oder extreme Werte bezeichnet werden.

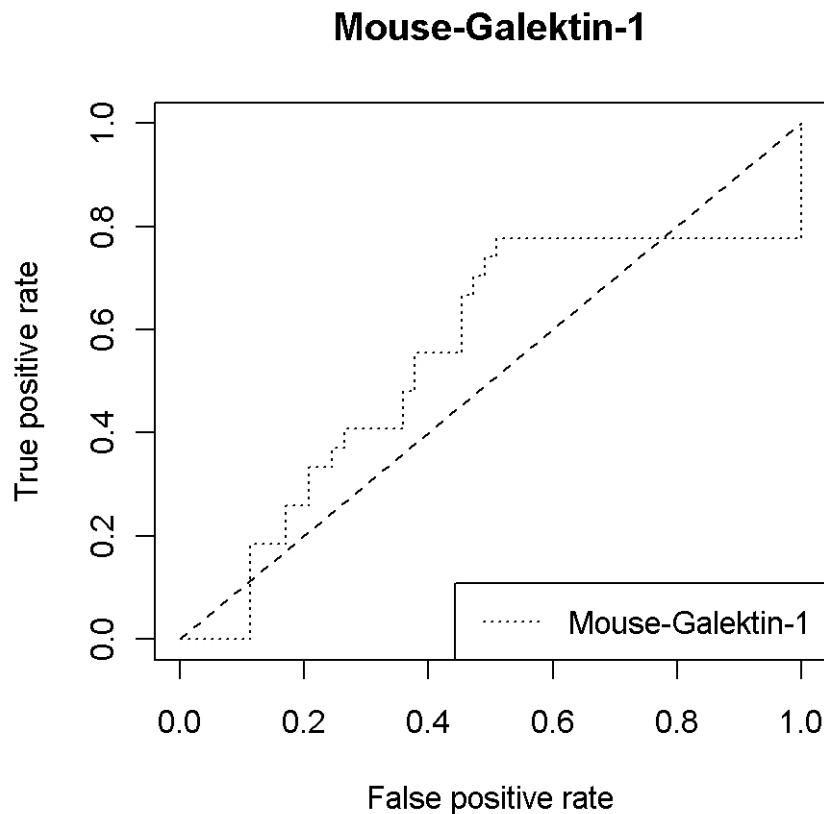


Abb. 3.8 ROC-Kurve für Mouse-Galektin-1 (x- u. y-Achse wie bei Abb. 3.2).

3.1.5 Galektin-3

Im Mann-Whitney-U-Test hat sich ein signifikanter Unterschied des Galektin-3-Spiegels zwischen den Ovarialkarzinompatientinnen und den Patientinnen mit benignen Erkrankungen ergeben. Der Median des Serumspiegels ist bei den Karzinompatientinnen signifikant ($p=0,002$) höher als bei der benignen Vergleichsgruppe (Abb. 3.9).

Die Fläche unter der ROC-Kurve von Galektin-3, die etwa mittig zwischen der Diagonalen und der linken bzw. oberen Begrenzungslinie des umschließenden Quadrates verläuft, beträgt 0,71 (Abb. 3.10).

Durch Galektin-3 konnten, bezogen auf die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messungen, 76,2 % (KI 68,8 % - 86,2 %) der Patientinnen der richtigen Gruppe zugeordnet werden. Der Schwellenwert, auf den dies zutrifft, beträgt 2,478 ng/ml. Es

ergibt sich eine Sensitivität von 48,4 % (KI 32,3 % - 67,7 %) und eine Spezifität von 93,9 % (KI 85,7 % - 100 %).

Legt man die Spezifität zur besseren Vergleichbarkeit auf 95 % fest, so resultiert eine Sensitivität von 22,6 % (KI 13,4 % - 31,7 %).

Tab. 3.9 Mittelwert und Median der Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle			Statistik	Standardfehler
Galektin-3	maligne	Mittelwert	3,02	0,49
		Median	2,11	
	benigne	Mittelwert	1,28	0,21
		Median	0,75	

Tab. 3.10 Mittlerer Rang der Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Mouse- Gelektin-1	maligne	31	50,79	1574,50
	benigne	49	33,99	1665,50
	Gesamt	80		

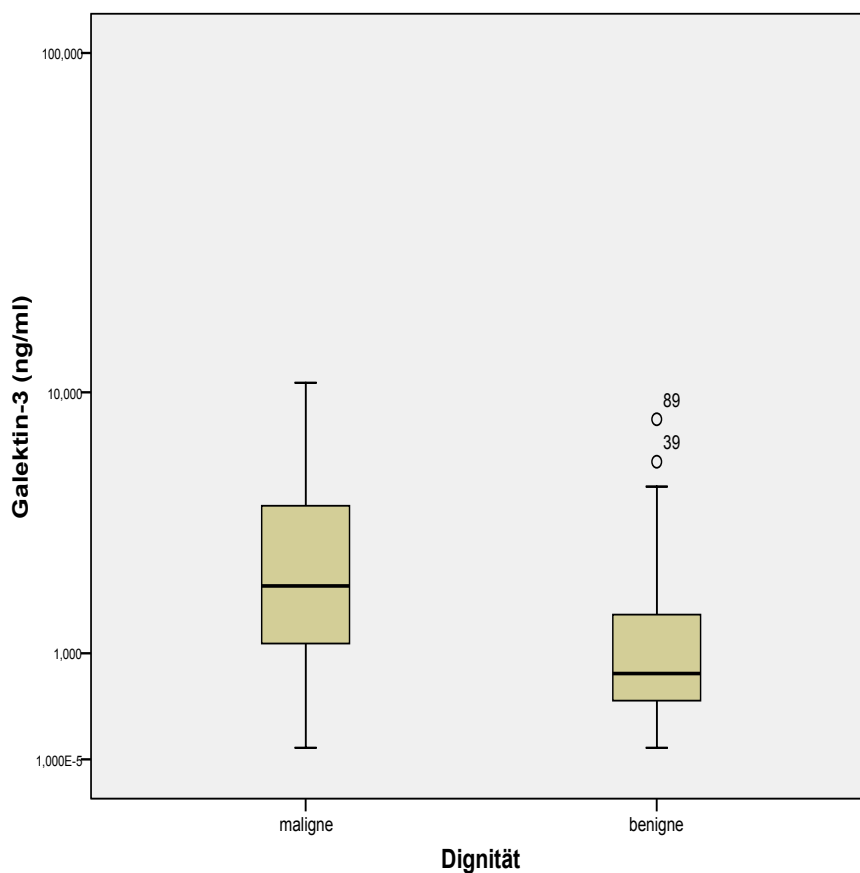


Abb. 3.9 Boxplot Diagramm (logarithmiert) zur Darstellung der Galektin-3-Konzentration (ng/ml) im Serum von Patientinnen mit benignen (n=49) und malignen (n=31) Erkrankungen der Ovarien. Der waagrechte Balken entspricht dem Median. Die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und der 75. Perzentile an. Die Fehlerbalken beschreiben den größten Wert oberhalb der 75. Perzentile bzw. den kleinsten Wert unterhalb der 25. Perzentile, die nicht als Ausreißer oder extreme Werte bezeichnet werden. Ausreißer liegen zwischen 1,5 und 3 Boxenlängen oberhalb der 75. Perzentile und sind durch Kreise dargestellt.

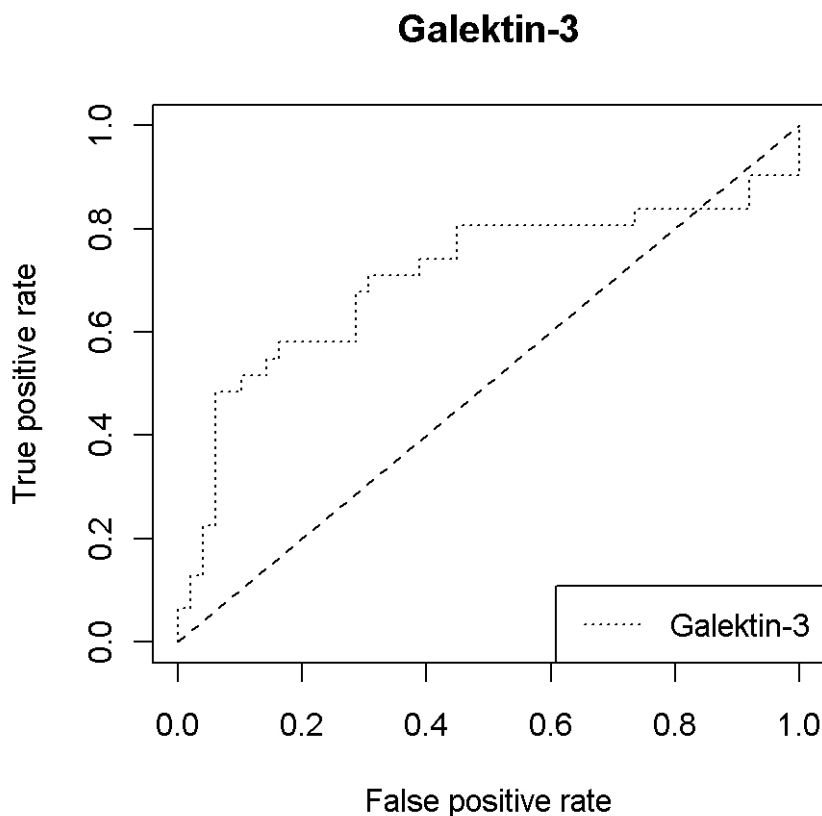


Abb. 3.10 ROC Kurve für Galektin-3 (x- u. y-Achse wie bei Abb. 3.2).

3.1.6 Übersicht über die Verteilung der Messergebnisse

Die untenstehende Abbildung 3.11 zeigt die Verteilung der Messergebnisse aller untersuchten Marker geordnet nach der Dignität der Befunde.

Abbildung 3.12 veranschaulicht die ROC-Kurven der hier untersuchten Biomarker CA 125, CA 72-4, HE4, Mouse-Galektin-1 und Galektin-3 in einer Graphik und ermöglicht damit einen schnellen Überblick über deren Aussagekraft.

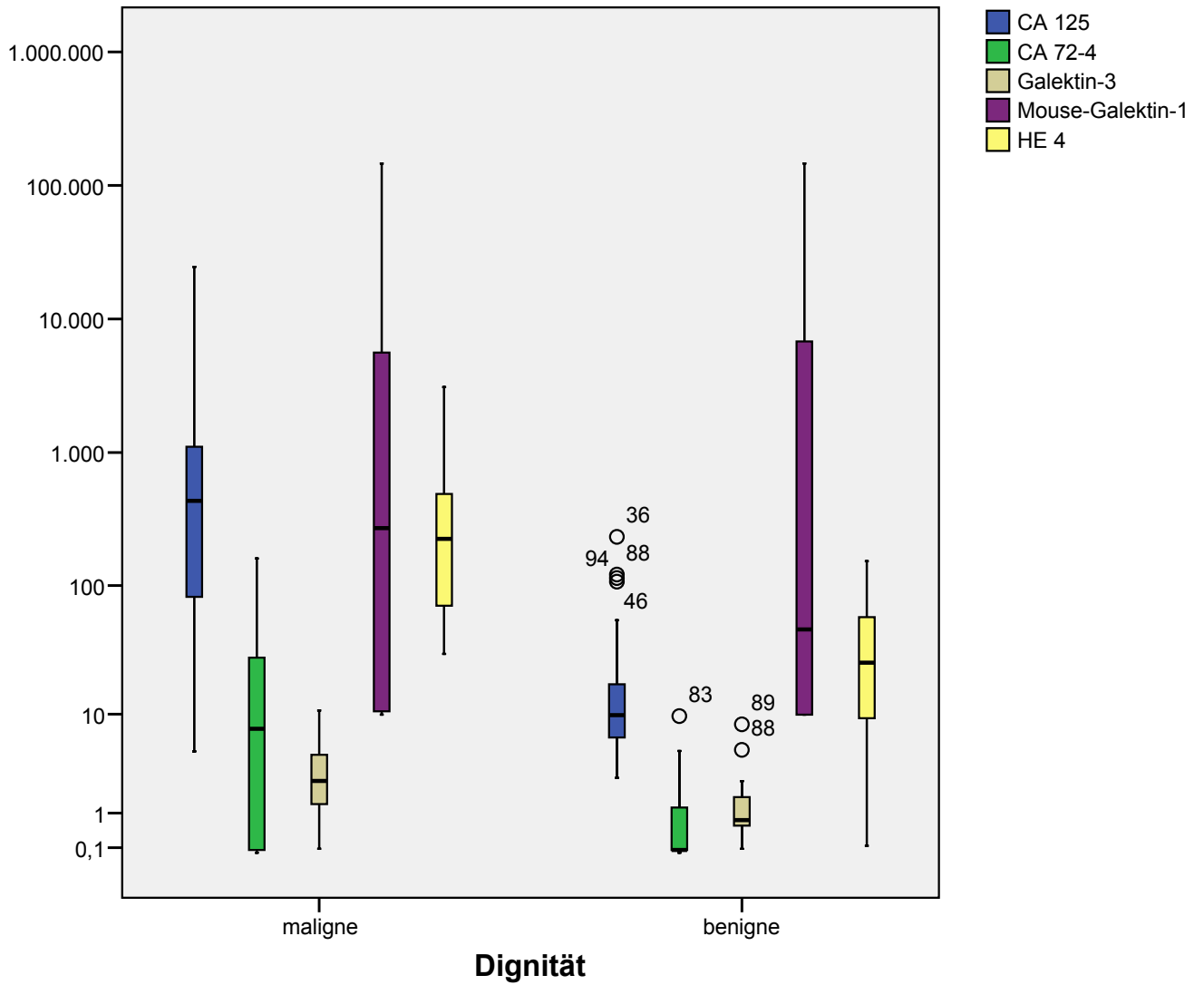


Abb. 3.11 Boxplot Diagramm zur Darstellung der Konzentrationen der Marker CA 125 (U/ml), CA 72-4 (U/ml), Galektin-3 (ng/ml), Mouse-Galektin-1 (pg/ml) und HE4 (pM) im Serum von Patientinnen und malignen und benignen Erkrankungen des Ovars. Der waagrechte Balken entspricht dem Median. Die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und der 75. Perzentile an. Die Fehlerbalken beschreiben den größten Wert oberhalb der 75. Perzentile bzw. den kleinsten Wert unterhalb der 25. Perzentile, die nicht als Ausreißer oder extreme Werte bezeichnet werden. Ausreißer liegen zwischen 1,5 und 3 Boxenlängen oberhalb der 75. Perzentile und sind durch Kreise dargestellt.

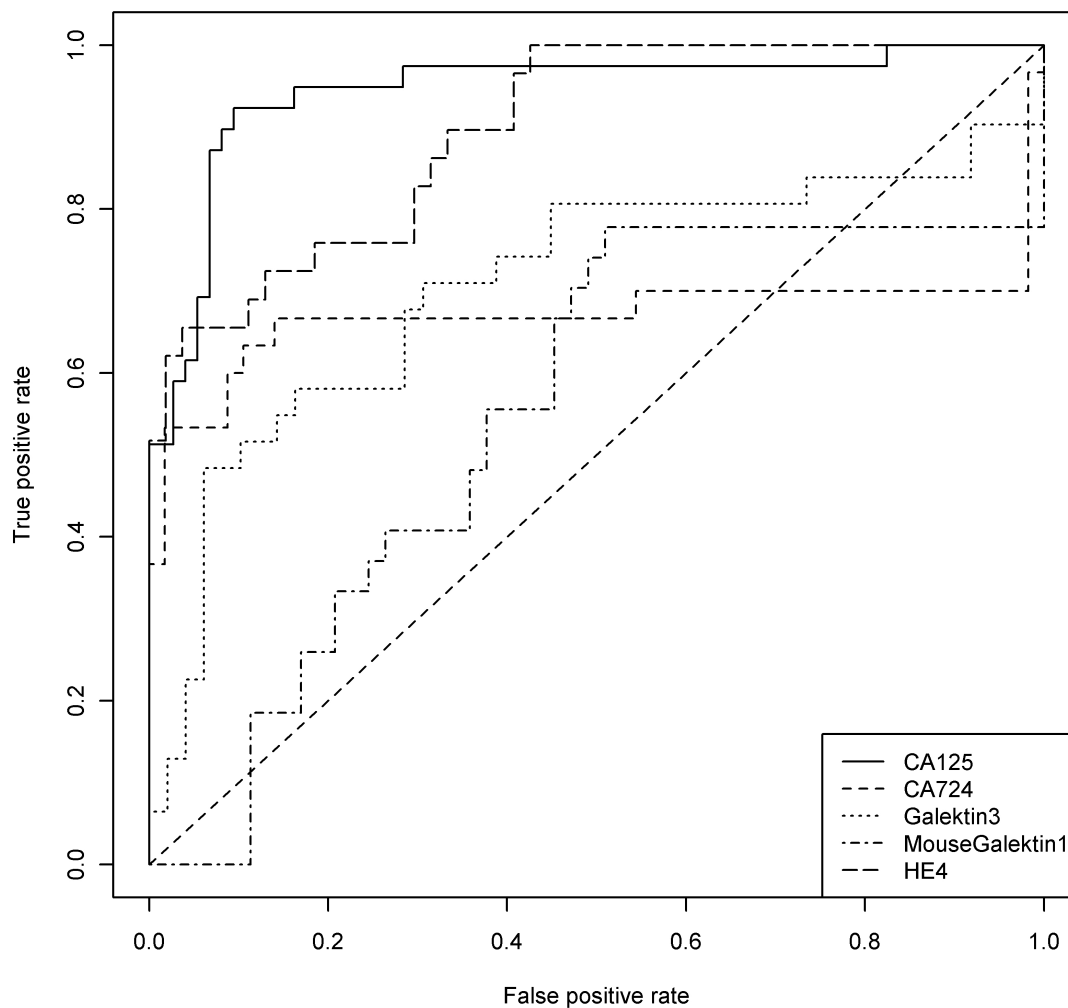


Abb. 3.12 Übersicht über die ROC-Kurven von CA 125, CA 72-4, HE4, Mouse-Galektin-1 und Galektin-3 (x-Achse: Anteil der falsch positiven Patientinnen oder 1-Spezifität; y-Achse: Anteil der richtig Positiven oder Sensitivität).

Tabelle 3.11 zeigt, wie viele Patientinnen durch den jeweiligen Biomarker die korrekte Diagnose hinsichtlich der Dignität ihres Tumors erhalten hätten, sowie die zugehörigen Cut-off-Werte, Sensitivitäten und Spezifitäten.

Tabelle 3.12 zeigt die Sensitivitäten bei einer auf 95 % festgelegten Spezifität und die AUC.

Tab. 3.11 Sensitivitäten und Spezifitäten der untersuchten Biomarker bei maximaler Zahl richtig diagnostizierter Patientinnen. Die resultierenden Cut-off-Werte wurden auf eine Nachkommastelle gerundet.

	CA 125	CA 72-4	HE4	Mouse-Galektin-1	Galektin-3
Korrekt zugeordnet	91,2 %	82,8 %	85,5 %	66,2 %	76,2 %
Sensitivität	87,2 %	53,3 %	62,1 %	0 %	48,4 %
Spezifität	93,2 %	98,2 %	98,1 %	100 %	93,9 %
Resultierender Cut-off	55,1 U/ml	5,8 U/ml	118,9 pM	146100 pg/ml	2,48 ng/ml

Tab. 3.12 Sensitivitäten der untersuchten Biomarker bei einer Spezifität von 95 % sowie die AUC.

	CA 125	CA 72-4	HE4	Mouse-Galektin-1	Galektin-3
Sensitivität	61,5 %	53,3 %	65,5 %	0 %	22,6 %
Spezifität (gerundet)	95 %	95 %	95 %	95 %	95 %
AUC	0,944	0,726	0,897	0,609	0,71

3.1.7 Korrelationsanalyse

3.1.7.1 Korrelation unabhängig von der Dignität der Befunde

Alle ermittelten Tumormarkerwerte wurden einer Korrelationsanalyse unterzogen und der Korrelationskoeffizient nach Pearson ermittelt (Tabelle 3.13). Bei einem Signifikanzlevel p unter 0,01 sind die Werte hochsignifikant, unter 0,05 sind sie signifikant. Im Einzelnen haben sich für die hier untersuchten Marker folgende Resultate ergeben:

- **CA 125**

CA 125 korreliert hochsignifikant mit CA 72-4 (Korrelationskoeffizient 0,46; $p=0,000$), mit Galektin-3 (Korrelationskoeffizient 0,433; $p=0,000$) und mit HE4 (Korrelationskoeffizient 0,817; $p=0,000$).

- **CA 72-4**

CA 72-4 korreliert hochsignifikant mit CA 125 (Korrelationskoeffizient 0,460; p=0,000) und mit HE4 (Korrelationskoeffizient 0,648; p=0,000).

- **Galektin-3**

Galektin-3 korreliert hochsignifikant mit CA 125 (Korrelationskoeffizient 0,433; p=0,000) und mit HE4 (Korrelationskoeffizient 0,492; p=0,000).

- **Mouse-Galektin-1**

Mouse-Galektin-1 korreliert weder hochsignifikant noch signifikant mit einem der anderen Marker.

- **HE4**

HE4 korreliert hochsignifikant mit CA 125 (Korrelationskoeffizient 0,817; p=0,000), CA 72-4 (Korrelationskoeffizient 0,648; p=0,000) und mit Galektin-3 (Korrelationskoeffizient 0,492; p=0,000).

Tab. 3.13 Korrelationen - maligne und benigne Befunde.

		CA 125	CA 72-4	Galektin-3	Mouse-Galektin-1	HE4
CA 125	Korrelation nach Pearson	1	0,460(*)	0,433(*)	-0,094	0,817(*)
	Signifikanz (2-seitig)		0,000	0,000	0,434	0,000
	N	83	80	72	71	73
CA 72-4	Korrelation nach Pearson	0,460(*)	1	0,165	-0,100	0,648(*)
	Signifikanz (2-seitig)	0,000		0,157	0,388	0,000
	N	80	87	75	77	80
Galektin-3	Korrelation nach Pearson	0,433(*)	0,165	1	-0,165	0,492(*)
	Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,157		0,180	0,000
	N	72	75	80	68	72
Mouse-Galektin-1	Korrelation nach Pearson	-0,094	-0,100	-0,165	1	-0,105
	Signifikanz (2-seitig)	0,434	0,388	0,180		,371
	N	71	77	68	80	75
HE4	Korrelation nach Pearson	0,817(*)	0,648(*)	0,492(*)	-0,105	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,000	0,000	0,371	
	N	73	80	72	75	83

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant

3.1.7.2 Korrelation in Abhängigkeit von der Dignität der Befunde

Zusätzlich fand eine Korrelationsanalyse der Tumormarkerwerte jeweils nur der benignen bzw. nur der malignen Befunde untereinander statt. Bei den malignen Befunden wurden zusätzlich Metastasenstatus, FIGO-Stadium und Grading mit einbezogen.

Auch hier wurde jeweils der Korrelationskoeffizient nach Pearson ermittelt.

Innerhalb der benignen Befunde konnte keine Korrelation zwischen den einzelnen Biomarkern festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Betrachtet man die Korrelationsanalyse ausschließlich der malignen Befunde (Tabelle 3.14), so ergeben sich zwischen den einzelnen Markern ähnliche Korrelationskoeffizienten wie bei der Betrachtung der Korrelation aller Befunde.

Bei der zusätzlich durchgeführten Analyse der Korrelationen zwischen Biomarkern und Tumor- bzw. FIGO-Stadium, Metastasen- und Lymphknotenmetastasenstatus hat sich folgendes ergeben:

Der Spiegel von HE4 und CA 125 korreliert jeweils hochsignifikant mit dem Vorhandensein vom Metastasen (Korrelationskoeffizient=0,582; p=0,009).

Der Spiegel von Mouse-Galektin-1 korreliert hochsignifikant negativ mit dem Tumorstadium (Korrelationskoeffizient=-0,687; p=0,002) und signifikant negativ mit dem FIGO-Stadium (Korrelationskoeffizient=-0,538; p=0,014).

Tab. 3.14 Korrelationen - nur maligne Befunde.

	CA 125	CA 72-4	Galektin-3	Mouse-Galektin-1	HE4	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	FIGO-Stadium
CA 125									
Korrelation nach Pearson	1	0,374(*)	0,404(*)	-0,199	0,813(**)	0,250	-0,047	0,582(**)	0,213
Signifikanz (2-seitig)		0,050	0,033	0,339	0,000	0,273	0,841	0,009	0,329
N	28	28	28	25	26	21	21	19	23
CA 72-4									
Korrelation nach Pearson	0,374(*)	1	0,011	-0,232	0,566(**)	0,107	0,042	0,212	0,214
Signifikanz (2-seitig)	0,050		0,956	0,255	0,002	0,637	0,852	0,369	0,316
N	28	30	30	26	28	22	22	20	24
Galektin-3									
Korrelation nach Pearson	0,404(*)	0,011	1	-0,275	0,508(**)	0,227	-0,172	0,343	0,155
Signifikanz	0,033	0,956		0,166	0,005	0,309	0,445	0,138	0,470

	(2-seitig)									
Mouse Galektin- 1	N	28	30	31	27	29	22	22	20	24
	Korrelation									
	nach	-0,199	-0,232	-0,275	1	-0,252	0,687(**)	,137	-,121	0,538(*)
	Pearson									
	Signifikanz	0,339	0,255	0,166		0,225	0,002	0,589	0,643	0,014
	(2-seitig)									
HE4	N	25	26	27	27	25	18	18	17	20
	Korrelation									
	nach	0,813(**)	0,566(**)	0,508(**)	-0,252	1	0,304	-0,041	0,582(**)	0,330
	Pearson									
	Signifikanz	0,000	0,002	0,005	0,225		0,180	0,859	0,009	0,125
	(2-seitig)									
	N	26	28	29	25	29	21	21	19	23

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

3.1.8 Zweierkombinationen verschiedener Biomarker

Die Biomarker HE4, CA 125, CA 72-4, Galektin-3 und Mouse-Galektin-1 und die von Dr. med. Lan Anamur Schuhmacher im selben Patientenkollektiv bereits früher im Rahmen ihrer Dissertation quantifizierten Marker CA 19-9, CA 15-3, CA 27-29, Panko-Mab, CEA, HCG, Glykodelin und PP1490 (Schuhmacher, 2008) wurden miteinander zu Zweierkombinationen kombiniert. Die AUCs dieser Kombinationen sind in Abbildung 3.13 dargestellt.

Es gibt mehrere Zweierkombinationen, die die Voraussagefähigkeit des besten Einzelmarkers CA 125 (AUC 0,944) übertreffen. Die beste Kombination ist die aus CA 125 und HE4 mit einer AUC von 0,961. Eine Verbesserung ergab sich auch durch Kombination von CA 125 mit CA 19-9 (AUC 0,953), Mouse-Galektin-1 (AUC 0,95), PP1490 (AUC 0,947) und CA 15-3 (AUC 0,946). Durch die führende Zweierpaarung aus CA 125 und HE4 hätten maximal 94,4 % (KI 88,7 % - 98,6 %) der Patientinnen durch eine Serumprobe die korrekte Aussage hinsichtlich der Dignität ihrer Erkrankung erhalten. Die zugehörige Sensitivität beträgt 92,3 % (KI 80,8 % - 100 %), die Spezifität liegt bei 95,6 % (KI 88,9 % - 100 %).

AUC

0.85

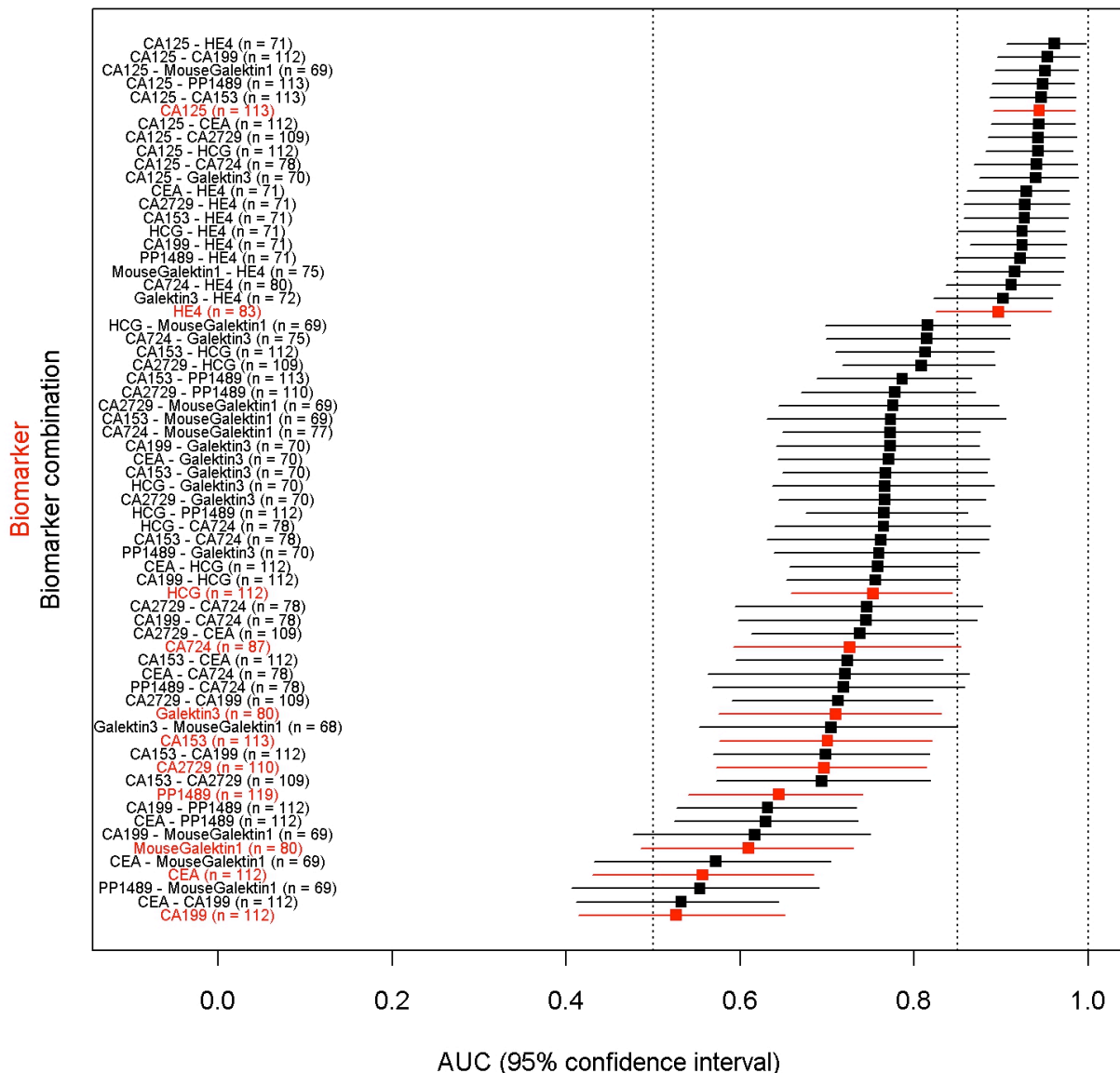


Abb. 3.13 Zweierkombination von Biomarkern und ihre Flächen unter ROC-Kurve (AUC). Einzelmarker sind rot dargestellt, Zweierkombinationen schwarz.

3.1.9 Weitere Untersuchungen

Im Kruskal-Wallis-Test konnten bei keinem Marker signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen TNM- oder FIGO-Stadien oder hinsichtlich Grading, Metastasenstatus oder Rezidiv vs. Rezidivfreiheit gefunden werden.

Auch zwischen den einzelnen histologischen Untergruppen der Karzinome und zwischen benignen Erkrankungen verschiedener Genese gab es keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

3.2 Untersuchung der Expression von Galektin-1 und Galektin-3 in histologischen Präparaten

Weiterhin wurden die 111 in Paraffin eingebettete Operationspräparate der Patientinnen aus Kollektiv II, nach immunhistochemischer Färbung auf die Expression der Lektine Galektin-1 und Galektin-3 hin untersucht.

Bei allen Präparaten wurde die Gewebeexpression des jeweiligen Proteins für die maligne bzw. benigne Veränderung sowie für das peritumorale Stroma getrennt bewertet.

Die Bewertung der Expression wurde mittels des IRS-Scores vorgenommen.

Die IRS-Scores der Präparate aus malignen Tumoren wurden anschließend mit den Scores der Präparate aus benignen Veränderungen verglichen.

Dazu wurden der U-Test von Mann und Whitney durchgeführt und die Ergebnisse durch Boxplot-Diagramme visualisiert. Ferner wurden Korrelationsanalysen durchgeführt um Zusammenhänge zwischen Galektin-1- und -3-Expressionsmustern im Tumorgewebe zu erschließen.

3.2.1 Galektin-1

3.2.1.1 Expression im Tumor

Der Median des IRS-Scores der Expression von Galektin-1 im malignen Gewebe beträgt 2,0. Für die benignen Veränderungen liegt dieser Wert bei 1,5. Im Mann-Whitney-U-Test hat sich mit $p=0,46$ kein signifikanter Unterschied der Ränge zwischen beiden Gruppen ergeben. Der geringe Unterschied zwischen beiden Gruppen wird auch bei Betrachtung von Abbildung 3.14 deutlich.

Tab. 3.15. Mittelwert und Median der IRS-Scores der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		Statistik	Standardfehler
Galektin-1 Expression im veränderten Gewebe (IRS)	maligne	Mittelwert	2,50
		Median	2,00
	benigne	Mittelwert	2,06
		Median	1,50

Tab. 3.16 Mittlerer Rang der IRS-Scores der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Galektin-1 Expression im veränderten Gewebe (IRS)	maligne	32	55,64	1780,50
	benigne	72	51,10	3679,50
	Gesamt	104		

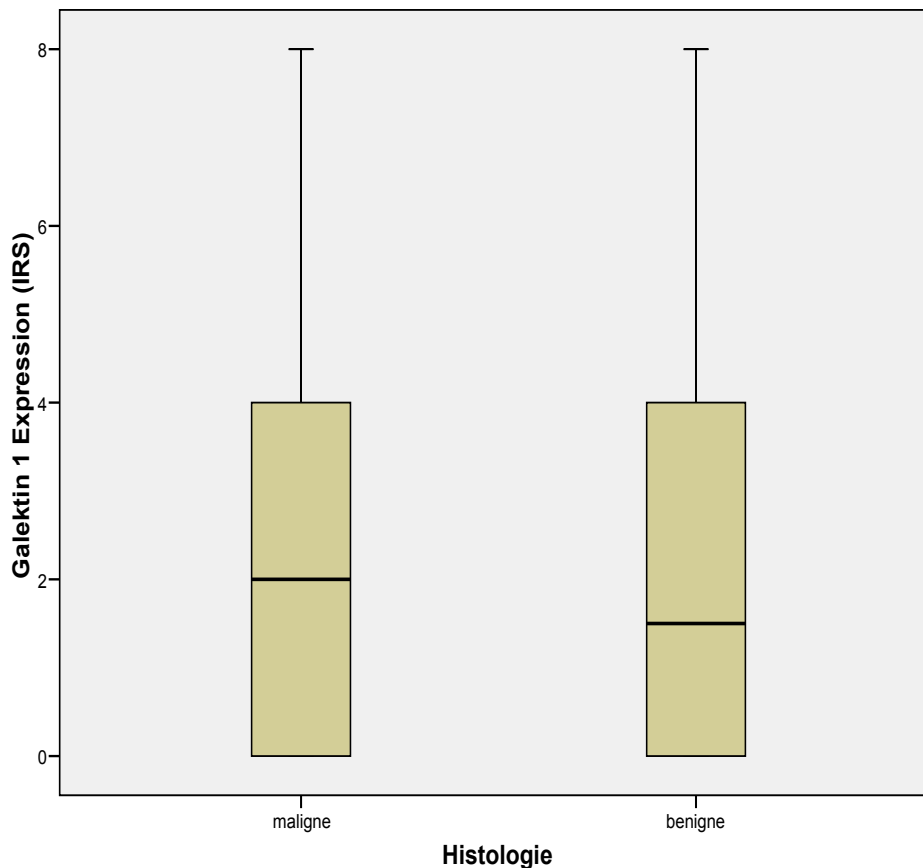


Abb. 3.14 Boxplot Diagramm zur Darstellung der Galektin-1 Expression im Tumor der maligne bzw. benigne veränderten Ovarien. Der waagrechte Balken entspricht dem Median. Die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und der 75. Perzentile an. Die Fehlerbalken beschreiben den größten Wert oberhalb der 75. Perzentile, die nicht als Ausreißer oder extreme Werte bezeichnet werden.

3.2.1.2 Expression im Stroma

Der Median des IRS-Scores für die Galektin-1-Expression im die Neubildung umgebenden Stroma beträgt 4,0 für die maligne und 3,0 für die benigne Gruppe. Der mittlere Score liegt bei 5,70 für die Karzinome und 3,29 für die benignen Raumforderungen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist mit $p < 0,001$ hier signifikant (Abb. 3.15).

Die starke Expression von Galektin-1 gerade im peritumoralen Stroma, bei schwächerer Expression im Tumor ist exemplarisch auch in den Abbildungen 3.16 und 3.17 dargestellt.

Tab. 3.17 Mittelwert und Median der IRS-Scores der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle			Statistik	Standardfehler
Galektin-1 Expression im Stroma (IRS)	maligne	Mittelwert	5,70	0,468
		Median	4,00	
	benigne	Mittelwert	3,29	0,187
		Median	3,00	

Tab. 3.18 Mittlerer Rang der IRS-Scores der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Galektin-1 Expression im Stroma (IRS)	maligne	33	77,58	2560,00
	benigne	76	45,20	3435,00
	Gesamt	109		

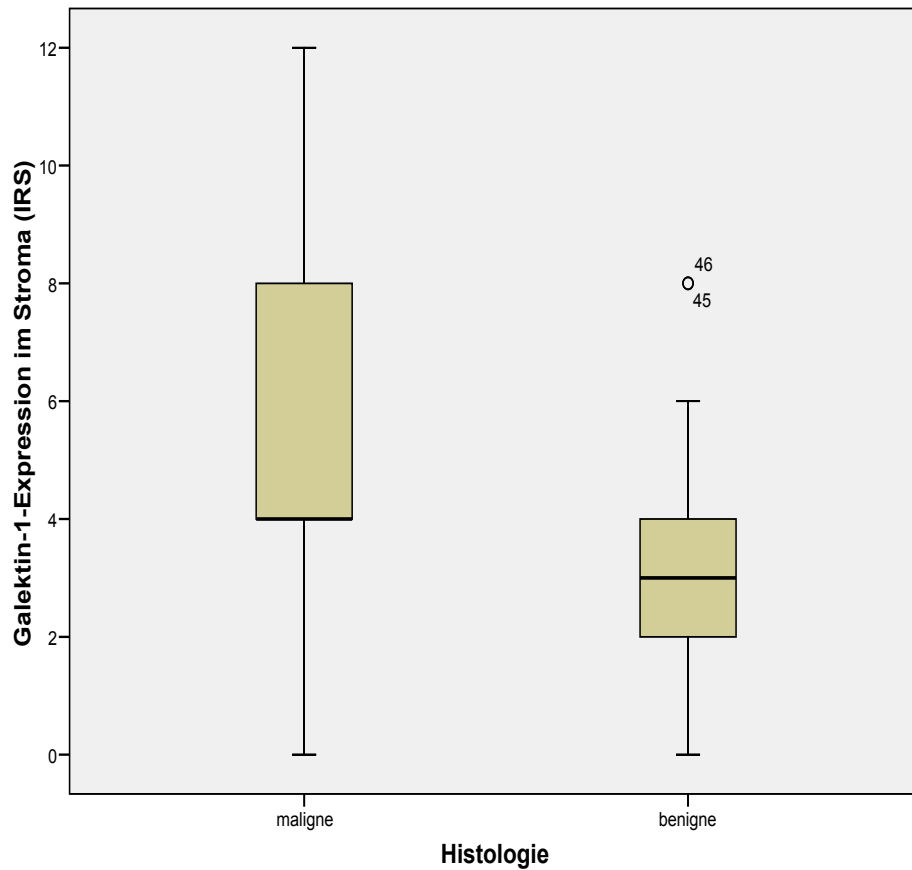


Abb. 3.15 Boxplot Diagramm zur Darstellung der Galektin-1-Expression im Stroma von Ovarien mit einer kanzerösen bzw. einer benignen Veränderung. Der waagrechte Balken entspricht dem Median. Die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und der 75. Perzentile an. Die Fehlerbalken beschreiben den größten Wert oberhalb der 75. Perzentile bzw. den kleinsten Wert unterhalb der 25. Perzentile, die nicht als Ausreißer oder extreme Werte bezeichnet werden. Der Kreis ist ein Ausreißer, da er zwischen 1,5 und 3 Boxenlängen oberhalb der 75. Perzentile liegt.

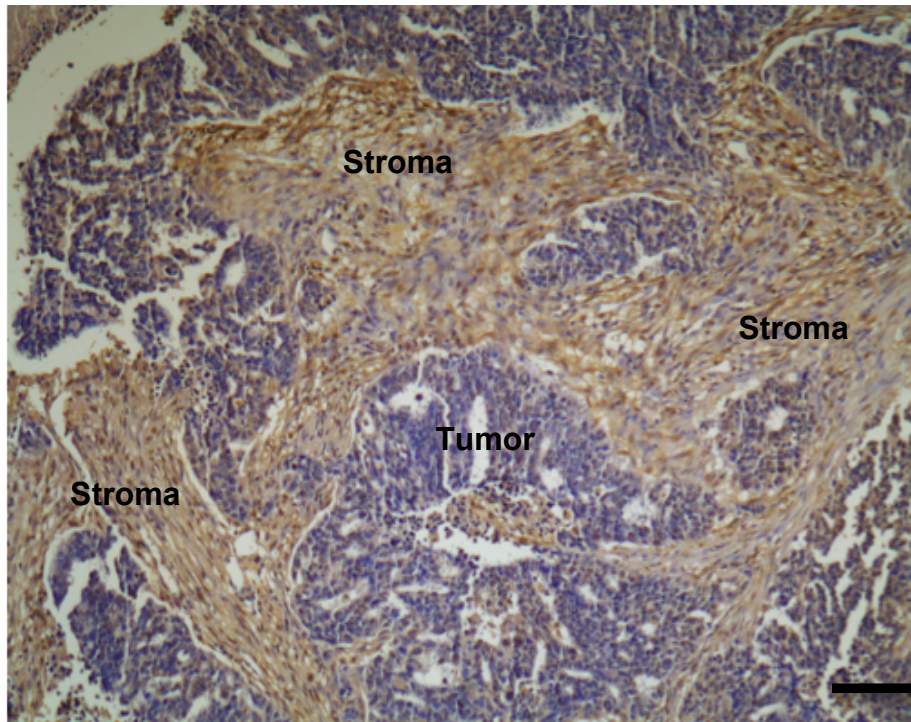


Abb. 3.16 Expression von Galektin-1 in einem rezidierten epithelialen Ovarialkarzinom bei 100facher Vergrößerung. Der Balken entspricht einer Länge von 100 μ m.

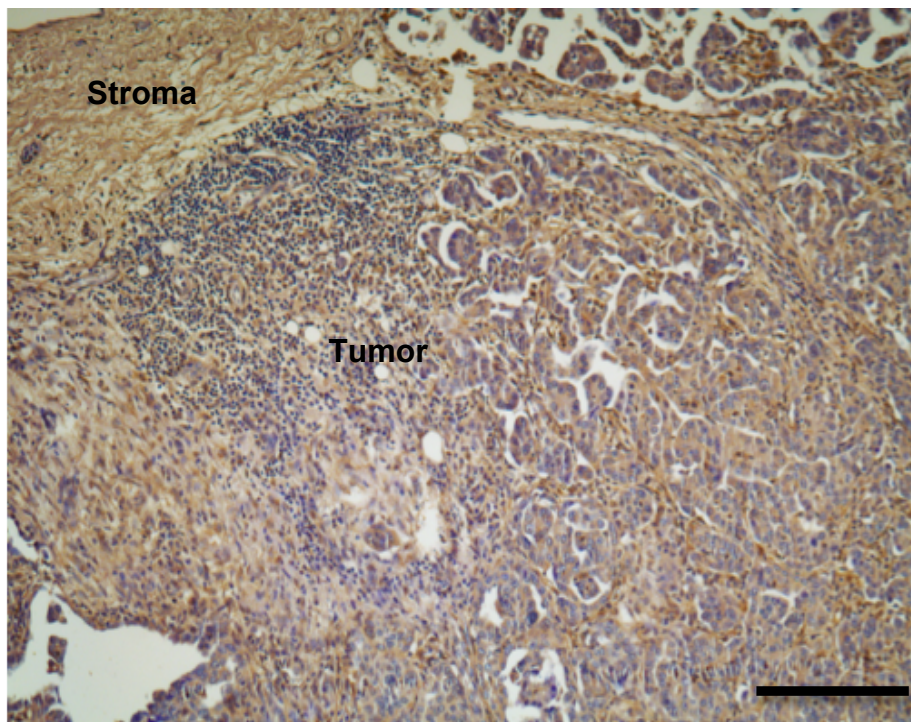


Abb. 3.17 Expression von Galektin-1 in einem serös-papillären Adenokarzinom bei 200facher Vergrößerung. Der Balken entspricht einer Länge von 100 μ m.

3.2.2 Galektin-3

3.2.2.1 Expression im Tumor

Der mittlere IRS-Score für die Expression von Galektin-3 in den Karzinomen liegt bei 2,24. Für die benignen Veränderungen beträgt er 2,49. Der Mittelwert ist für die benignen Veränderungen geringfügig höher, als für die malignen. Im Mann-Whitney-U-Test hat sich mit einem p-Wert von 0,342 kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ergeben. Der geringe Unterschied der Galektin-3-Expression wird durch die Ähnlichkeit der beiden Boxen in Abbildung 3.18 und exemplarisch durch die Abbildungen 3.20 und 3.21 verdeutlicht.

Tab. 3.19 Mittelwert und Median der IRS-Scores der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		Statistik	Standardfehler
Galektin-3 Expression im veränderten Gewebe (IRS)	maligne	Mittelwert	2,24
		Median	1,00
	benigne	Mittelwert	2,49
		Median	2,00

Tab. 3.20 Mittlerer Rang der IRS-Scores der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Galektin-3 Expression im veränderten Gewebe (IRS)	maligne	33	51,21	1690,00
	benigne	77	57,34	4415,00
	Gesamt	110		

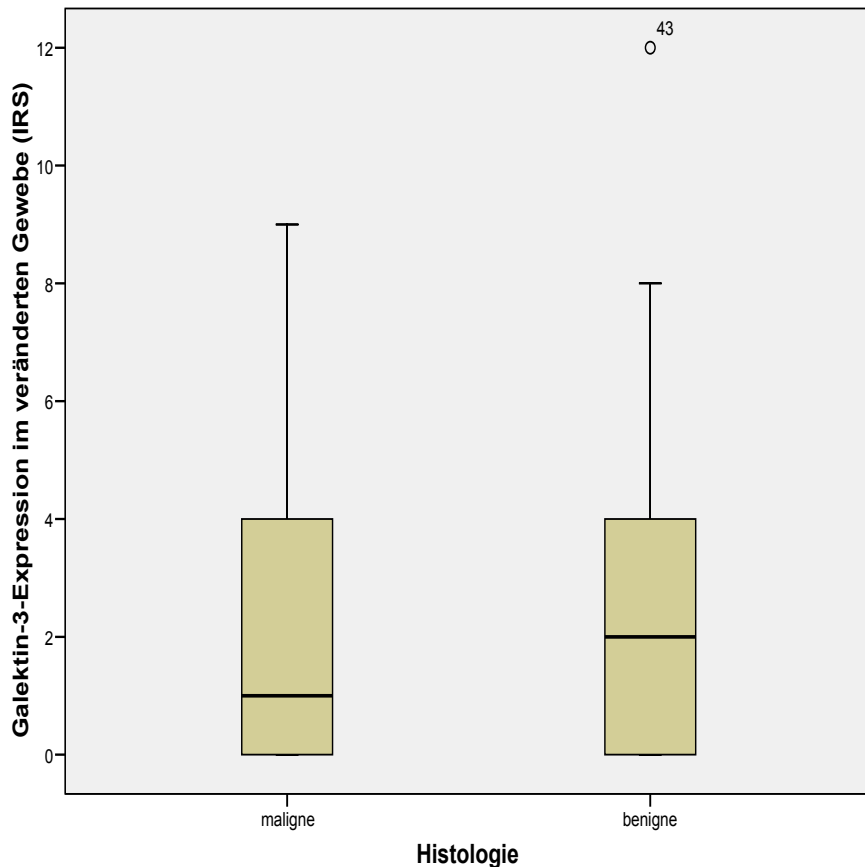


Abb. 3.18 Boxplot Diagramm zur Darstellung der Galektin-3-Expression im Tumor der teils kanzerös, teils benigne veränderten Ovarien. Der waagrechte Balken entspricht dem Median. Die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und der 75. Perzentile an. Die Fehlerbalken beschreiben den größten Wert oberhalb der 75. Perzentile, die nicht als Ausreißer oder extreme Werte bezeichnet werden. Der Kreis liegt zwischen 1,5 und 3 Boxenlängen oberhalb der 75. Perzentile und ist daher ein Ausreißer.

3.2.2.2 Expression im Stroma

Der mittlere IRS-Score der Galektin-3-Expression im Stroma beträgt 1,12 für die Karzinompatientinnen und 2,95 für die Patientinnen mit benignen Befunden. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist signifikant ($p < 0,001$) und wird in Abbildung 3.19 gezeigt.

Die Divergenz der Farbtintensität des peritumoralen Stromas ist auch beim Vergleich der exemplarischen Abbildungen 3.20 und 3.21 zu erkennen.

Tab. 3.21 Mittelwert und Median der IRS-Scores der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		Statistik		Standardfehler
Galektin-3 Expression im Stroma (IRS)	maligne	Mittelwert	1,12	0,379
		Median	0,00	
	benigne	Mittelwert	2,95	0,196
		Median	3,00	

Tab. 3.22 Mittlerer Rang der IRS-Scores der benignen und malignen Patientinnengruppe.

Fälle		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Galektin-3 Expression im Stroma (IRS)	maligne	33	32,18	1062,00
	benigne	78	66,08	5154,00
	Gesamt	111		

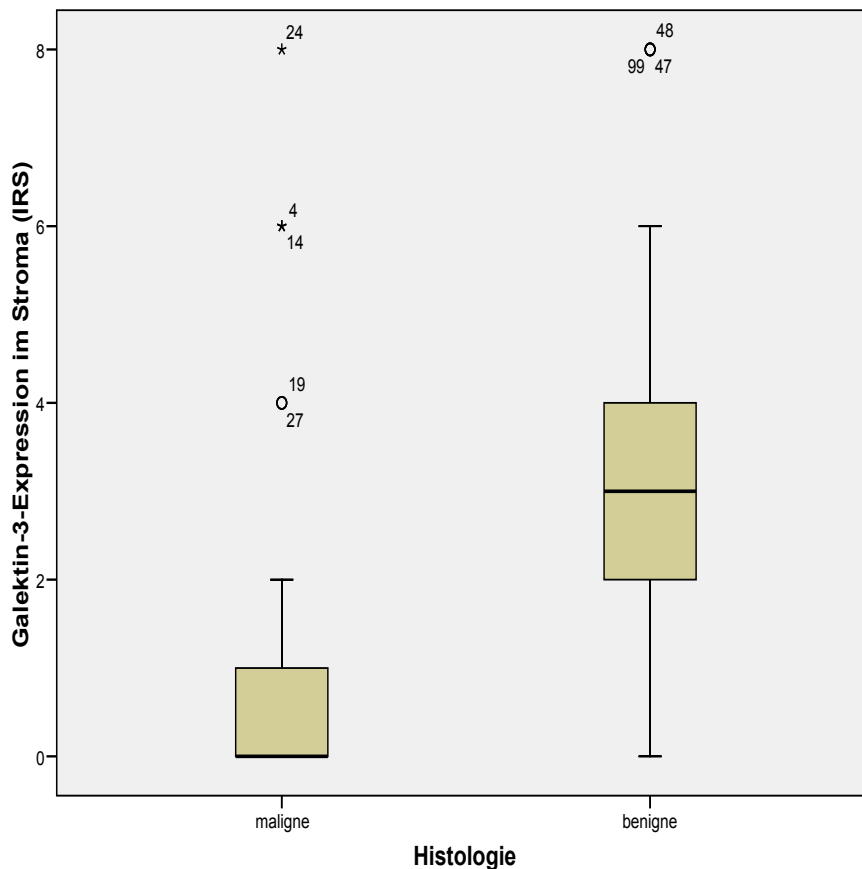


Abb. 3.19 Boxplot Diagramm zur Darstellung der Galektin-3-Expression im Stroma von Ovarien mit einer kanzerösen bzw. mit einer benignen Veränderung. Der waagrechte Balken entspricht dem Median. Die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und der 75. Perzentile an. Die Fehlerbalken beschreiben den größten Wert oberhalb der 75. Perzentile bzw. den kleinsten Wert unterhalb der 25. Perzentile, die nicht als Ausreißer oder extreme Werte bezeichnet werden. Ausreißer liegen zwischen 1,5 und 3 Boxenlängen oberhalb der 75. Perzentile und sind durch Kreise dargestellt. Extreme Werte überschreiten die 75. Perzentile um >3 Boxenlängen und sind durch Sterne repräsentiert.

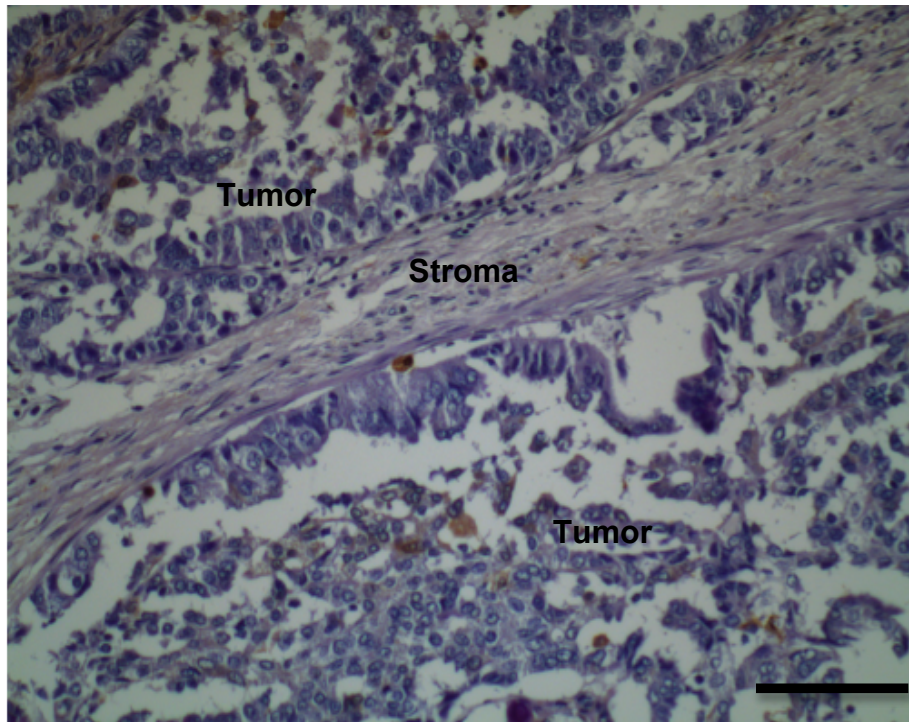


Abb. 3.20 Expression von Galektin-3 in einem in einem serös-papillären Adenokarzinom bei 200facher Vergrößerung. Der Balken entspricht einer Länge von 100µm.

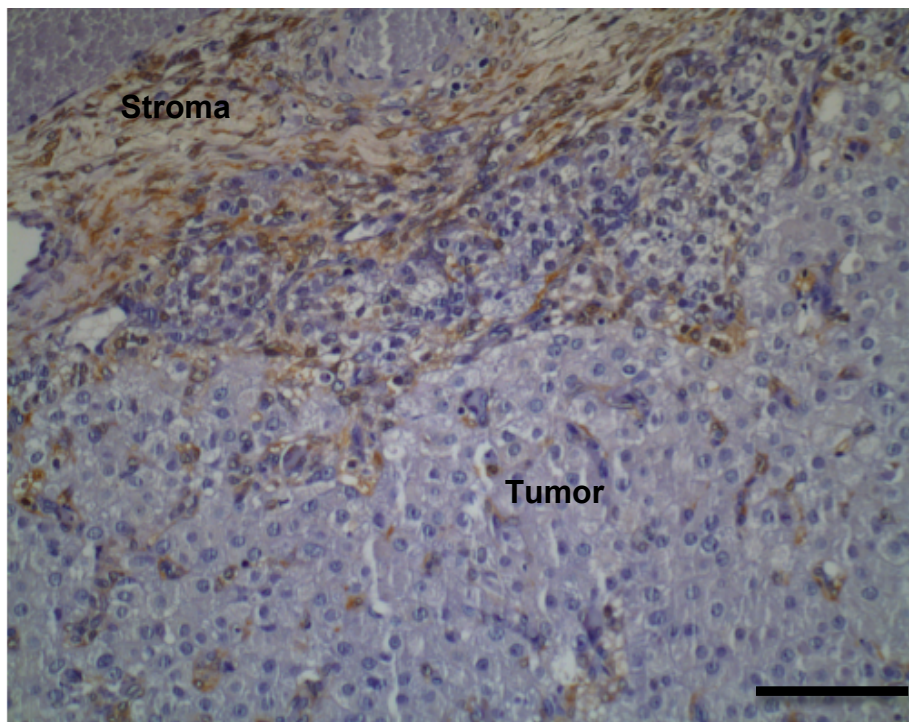


Abb. 3.21 Expression von Galektin-3 in einem muzinösen Zystadenom bei 200facher Vergrößerung. Der Balken entspricht einer Länge von 100µm.

3.2.3 Übersicht über die Verteilung der Ergebnisse

Die untenstehende Abb. 3.22 gibt einen Überblick über die Expression der untersuchten Proteine Galektin-1 und Galektin-3 im Tumor bzw. dem peritumoralen Stroma, geordnet nach der Dignität der Befunde.

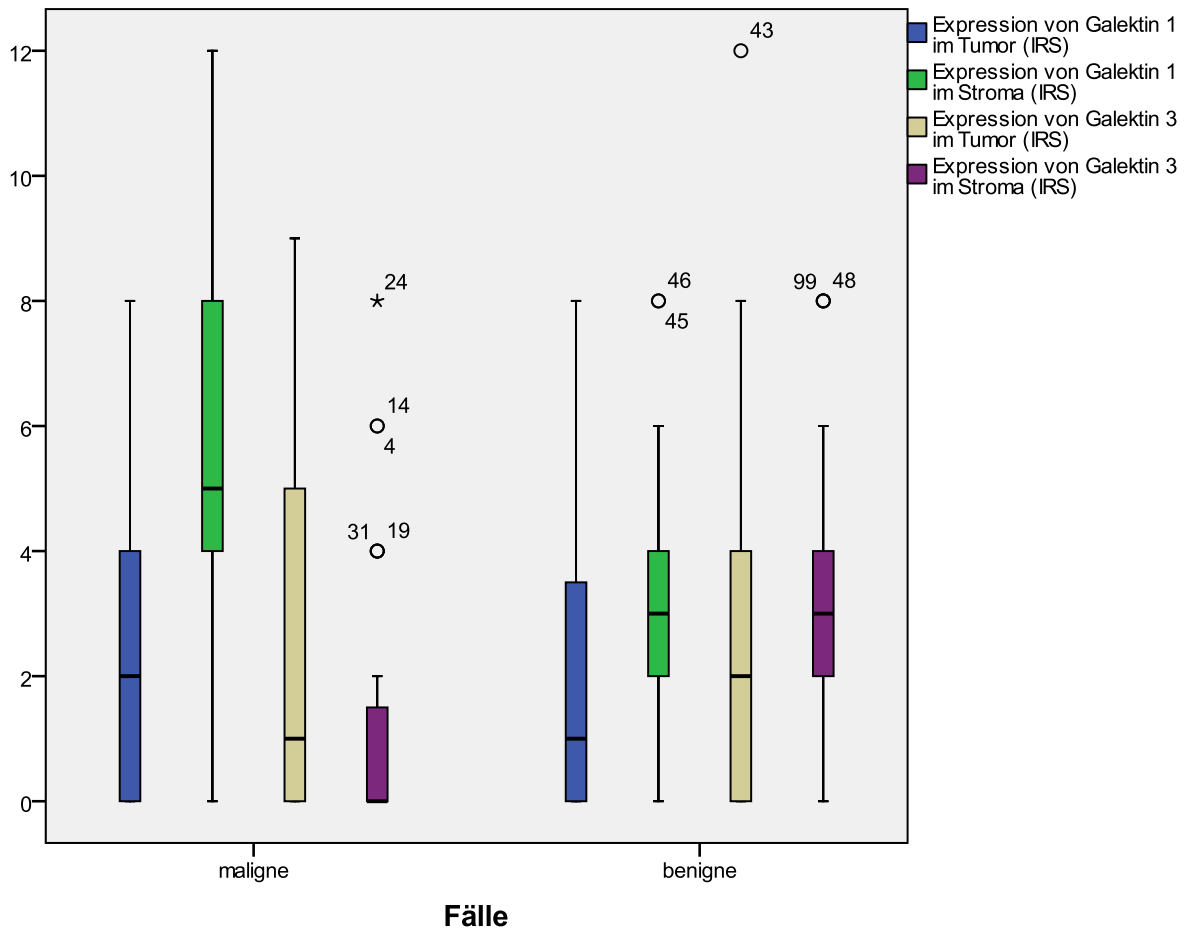


Abb. 3.22 Boxplot Diagramm zur Darstellung der Expression von Galektin-1 und Galektin-3 im Tumor bzw. im peritumoralen Stroma. Der waagrechte Balken entspricht dem Median. Die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und der 75. Perzentile an. Die Fehlerbalken beschreiben den größten Wert oberhalb der 75. Perzentile bzw. den kleinsten Wert unterhalb der 25. Perzentile, die nicht als Ausreißer oder extreme Werte bezeichnet werden. Ausreißer liegen zwischen 1,5 und 3 Boxenlängen oberhalb der 75. Perzentile und sind durch Kreise dargestellt. Extreme Werte, repräsentiert von Sternen, überschreiten die 75. Perzentile um >3 Boxenlängen.

3.2.4 Korrelationsanalyse

3.2.4.1 Korrelation unabhängig von der Dignität der Befunde

Es wurde eine Korrelationsanalyse aller ermittelten IRS-Scores durchgeführt, zunächst unabhängig von der Dignität der Befunde. Dabei wurde jeweils der Korrelationskoeffizient nach Pearson ermittelt (Tabelle 3.23).

Die Korrelationsanalyse hat ergeben, dass die Expression von Galektin-1 im veränderten Gewebe hochsignifikant mit der Galektin-1-Expression im umgebenden Stroma (Korrelationskoeffizient=0,28; p=0,004) und mit der Expression von Galektin-3 im veränderten Gewebe korreliert (Korrelationskoeffizient=0,284; p=0,004). Ferner korreliert die Expression von Galektin-1 im Stroma signifikant mit der Galektin-3 Expression im veränderten Gewebe selbst (Korrelationskoeffizient=0,241; p=0,012).

Tab. 3.23 Korrelationen aller ermittelten Werte (maligne und benigne).

		Galektin-1 im veränderten Gewebe (IRS)	Galektin-1 im Stroma (IRS)	Galektin-3 im veränderten Gewebe (IRS)	Galektin-3 im Stroma (IRS)
Galektin-1 im veränderten Gewebe (IRS)	Korrelation nach Pearson	1	0,280(**)	0,284(**)	0,025
	Signifikanz (2- seitig)		0,004	0,004	,805
	N	104	104	103	104
Galektin-1 im Stroma (IRS)	Korrelation nach Pearson	0,280(**)	1	0,241(*)	-0,066
	Signifikanz (2- seitig)	0,004		0,012	0,492
	N	104	109	108	109
Galektin-3 im veränderten Gewebe (IRS)	Korrelation nach Pearson	0,284(**)	0,241(*)	1	0,076
	Signifikanz (2- seitig)	0,004	0,012		0,427
	N	103	108	110	110
Galektin-3 im Stroma (IRS)	Korrelation nach Pearson	0,025	-0,066	0,076	1
	Signifikanz (2- seitig)	0,805	0,492	0,427	
	N	104	109	110	111

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

3.2.4.2 Korrelation in Abhängigkeit von der Dignität der Befunde

Zusätzlich fand eine Korrelationsanalyse der IRS-Scores jeweils nur der benignen (Tab. 3.24) bzw. nur der malignen Befunde untereinander statt. Auch hier wurde jeweils der Korrelationskoeffizient nach Pearson ermittelt.

Bei der Analyse der Korrelation der benignen Befunde untereinander (Tabelle 3.24) ergeben sich zwischen den einzelnen IRS-Scores ähnliche Korrelationskoeffizienten, wie bei der Betrachtung der Korrelation der Scores aller Befunde. Das Signifikanzniveau ist jedoch abweichend.

Die Expression von Galektin-1 im veränderten Gewebe korreliert signifikant mit der Galektin-1-Expression im umgebenden Stroma (Korrelationskoeffizient=0,287; p=0,014) und mit der Expression von Galektin-3 im veränderten Gewebe (Korrelationskoeffizient=0,286; p=0,016).

Ferner korreliert die Expression von Galektin-1 im die maligne oder benigne Veränderung umgebenden Stroma hochsignifikant mit der Galektin-3-Expression im veränderten Gewebe selbst (Korrelationskoeffizient=0,347; p=0,002).

Innerhalb der malignen Befunde ist keine Korrelation hinsichtlich der IRS-Scores der Expression von Galektin-1 und -3 vorhanden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden Metastasenstatus, FIGO-Stadium und Grading mit einbezogen. Es konnte jedoch auch hier keine signifikante Korrelation zwischen den IRS-Scores der Gewebemarker (Galektin-1, Galektin-3) und Metastasenstatus, FIGO-Stadium und Grading festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.24 Korrelation der benignen Befunde.

		Galektin-1- Expression im veränderten Gewebe (IRS)	Galektin-1 Expression im Stroma (IRS)	Galektin-3 Expression im veränderten Gewebe (IRS)	Galektin-3 Expression im Stroma (IRS)
Galektin-1- Expression im veränderten Gewebe (IRS)	Korrelation nach Pearson	1	0,287(*)	0,286(*)	0,156
	Signifikanz (2-seitig)		0,014	0,016	0,189
	N	72	72	71	72
Galektin-1 Expression im Stroma (IRS)	Korrelation nach Pearson	0,287(*)	1	0,347(**)	0,122
	Signifikanz	0,014		0,002	0,293

Galektin-3 Expression veränderten Gewebe (IRS)	(2-seitig)				
	N	72	76	75	76
	Korrelation				
	im nach Pearson	0,286(*)	0,347(**)	1	0,163
	Signifikanz (2-seitig)	0,016	0,002		0,156
Galektin-3 Expression Stroma (IRS)	N	71	75	77	77
	Korrelation				
	im nach Pearson	0,156	0,122	0,163	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,189	0,293	0,156	
	N	72	76	77	78

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

4. Diskussion

4.1 Biomarker

Das Ovarialkarzinom ist noch immer die gynäkologische Krebserkrankung mit der schlechtesten Prognose. Dies ist vor allem dem Umstand geschuldet, dass die Diagnose in den meisten Fällen erst gestellt wird, wenn die Erkrankung bereits in FIGO-Stadium III oder IV fortgeschritten ist. In den frühen Stadien I und II mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 90 % werden nur ein Viertel der Fälle diagnostiziert. Neben Fortschritten bei der Therapie kann folglich jedes Verfahren, das zur früheren Erkennung des Ovarialkarzinoms beiträgt, die Mortalität der Erkrankung senken.

Eine weitere Möglichkeit, die Prognose zu verbessern, gründet sich auf der Tatsache, dass bisher nur rund die Hälfte der Frauen mit Ovarialkarzinom in etablierten Zentren behandelt wird, obwohl der Outcome in solchen nachweislich besser ist. Ein Verfahren, mit dem die Dignität einer Raumforderung im Adnexegebiet präoperativ zuverlässig eingeschätzt werden kann, könnte bewirken, dass mehr Patientinnen in Zentren überwiesen und dort von erfahrenen Operateuren behandelt werden.

Unzählige Arbeitsgruppen haben zum Thema Früherkennung und Diagnostik des Ovarialkarzinoms geforscht. Seit seiner Entdeckung durch die Forscher um Robert C. Bast 1981 ist der Biomarker CA 125 Zentrum vieler Studien. Er wird in der Klinik vielfach verwendet, ist aber nicht sensitiv und spezifisch genug, um in der Früherkennung als alleiniger Marker eingesetzt zu werden. Die transvaginale Sonographie, allein oder in Kombination mit CA 125, scheint wegen ihrer geringeren Spezifität für diese Aufgabe ebenfalls nur bedingt geeignet.

4.1.1 Der Biomarker CA 125 und seine Bedeutung für Früherkennung und Diagnostik

CA 125 ist der am häufigsten eingesetzte Biomarker beim Ovarialkarzinom. Er wird regelmäßig verwendet, um das Ansprechen einer Therapie zu überprüfen, wobei ansteigende CA 125-Spiegel in 90 % der Fälle mit einer Progression der Erkrankung korrelieren. Bei Patientinnen, die sich in Remission befinden, zeigt der Marker zuverlässig ein Rezidiv an, bevor dieses klinisch sichtbar wird (Milojkovic et al., 2004,

Schutter et al., 2002). Die Spiegel von CA 125 im Serum zeigen außerdem signifikante Unterschiede zwischen Patientinnen mit Ovarialkarzinomen und solchen mit gutartigen Erkrankungen im Bereich des kleinen Beckens (Milojkovic et al., 2004).

Auch bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit waren die Spiegel von CA 125 im Serum der Karzinompatientinnen mit einem p-Wert von $<0,001$ signifikant höher als bei der Vergleichsgruppe mit benignen Erkrankungen.

CA 125 gilt auch als der Einzelmarker mit der höchsten Sensitivität in der präoperativen Diagnostik des Ovarialkarzinoms (Schutter et al., 2002, Gadducci et al., 1992). Allerdings reicht seine Diskriminationsfähigkeit allein nicht aus, um ein Screening zu rechtfertigen. Beim Ovarialkarzinom mit seiner relativ niedrigen Inzidenz von 40/100.000 in der weiblichen Bevölkerung (Andersen et al., 2010) wäre ein positiv prädiktiver Wert von 10 %, bei einer Sensitivität von 75 % und einer 99,6 %igen Spezifität, hierfür Voraussetzung (Bast, 2004).

CA 125 weist jedoch bei nur 80 % der Ovarialkarzinompatientinnen erhöhte Werte auf (Badgwell and Bast, 2007, Moore et al., 2010b, Husseinzadeh, 2010, Rosen et al., 2005, Bast, 2004, Yin and Lloyd, 2001). Ferner scheint der Marker bei muzinösen Karzinomen weit häufiger im Normbereich zu liegen als bei serösen oder endometrioiden Karzinomen (Rosen et al., 2005, Gadducci et al., 2004, Badgwell and Bast, 2007). Diese Ergebnisse lassen sich durch unsere Untersuchungen weder bestätigen noch widerlegen, da das untersuchte Kollektiv bei weitem von serösen Tumoren dominiert wird.

Im Frühstadium der Erkrankung sind die Serumspiegel von CA 125 sogar nur bei 50-60 % der Patientinnen erhöht (Milojkovic et al., 2004, Husseinzadeh, 2010, Rosen et al., 2005)

Weil das Cancer Antigen auch von mesothelialen Zellen, die Peritoneum, Pleura und Perikard auskleiden und von Endometrium, EndoZervix und dem Epithel der Tuben als Reaktion auf entzündliche Reize oder Verwachsungen produziert wird (Schorge et al., 2010), können eine Reihe benigner gynäkologischer Erkrankungen, wie Endometriose oder funktionelle Zysten, ebenso wie nicht-gynäkologische Erkrankungen wie Leberzirrhose oder Pneumonien zu erhöhten Serumwerten von CA 125 führen (Gallup and Talledo, 1997, Moore et al., 2010a). Gerade bei prämenopausalen Frauen, bei denen entzündliche und gutartige Erkrankungen

häufig vorkommen, ist die Aussagekraft eines erhöhten CA 125 Spiegels deshalb kritisch zu bewerten (Moore et al., 2010b, Badgwell and Bast, 2007).

Trotz dieser Einschränkungen für die Verwendung in der Früherkennung gilt CA 125 als Goldstandard unter den Biomarkern für das Ovarialkarzinom. Deshalb muss jeder neu einzuführende Biomarker mit CA 125 verglichen werden (Kreienberg et al., 1999).

Bei unseren Untersuchungen war CA 125 der beste Einzelmarker und zeigte mit einer AUC von 0,944 eine gute Trennschärfe zwischen Karzinomen und benignen Erkrankungen. Ein mit 91,2 % hoher Anteil der Patientinnen konnte durch den Marker bei einem optimalen Schwellenwert von 55,1 U/ml der richtigen Gruppe, maligne oder benigne, zugeordnet werden. Für diese Konstellation ergab sich eine Sensitivität von 87,2 % und eine Spezifität von 93,2 %. Bei einer auf 95 % festgelegten Spezifität lag die Sensitivität von CA 125 bei 61,5 %.

Auf eine Unterteilung unserer Patientinnen in eine prä- und eine postmenopausale Gruppe wurde verzichtet. Bei einem mittleren Alter von 62 Jahren in der malignen Gruppe ist aber davon auszugehen, dass die meisten Patientinnen zum Zeitpunkt der Blutentnahme postmenopausal waren. Dennoch ist es möglich, dass unsere CA 125-Bestimmung in einem rein postmenopausalen Kollektiv bessere Werte, gerade hinsichtlich der Spezifität, ergeben hätte.

Um die Sensitivität des Muzins zu erhöhen schlagen mehrere Arbeitsgruppen eine Kombination mit anderen Markern vor (Jacobs et al., 1990, Skates et al., 2003). Auch wir haben die von uns untersuchten Marker aus diesem Grund miteinander kombiniert. Die Ergebnisse werden unter Punkt 4.7 erörtert.

Andere Forscher diskutieren die Bestimmung des CA 125-Spiegels im zeitlichen Verlauf (Skates et al., 2003) oder die Kalkulation des Karzinomrisikos unter Einbeziehung von Menopausenstatus und Sonographie (Jacobs et al., 1990).

4.1.2 Der Biomarker CA 72-4 und seine Bedeutung für die Früherkennung und Diagnostik im Vergleich zu CA 125

Der Tumormarker CA 125 ist regelmäßig der Einzelmarker, mit dem in der Diagnostik des Ovarialkarzinoms die höchsten Sensitivitäten erreicht werden (Schutter et al., 2002). In der Gruppe der muzinösen Ovarialkarzinome ist seine Sensitivität jedoch mit durchschnittlich 50 % niedriger als für alle Histologien gemeinsam (Gadducci et

al., 2004, Negishi et al., 1993, Kreienberg et al., 1999, Meier, 1997, Zeimet et al., 1995, Gadducci et al., 1992).

Der Marker CA 72-4 wird von vielen Autoren als derjenige Marker bezeichnet, mit dem diese diagnostische Lücke geschlossen werden kann. Sie bezeichnen CA 72-4 als führenden Marker für das muzinöse Ovarialkarzinom (Hasholzner et al., 1996, Fayed et al., 1998).

Andere Forscher sehen CA 72-4 hingegen nicht als führenden Marker für muzinöse Histologien an (Zeimet et al., 1995, Gadducci et al., 2004, Ponnusamy et al., 2007). So war das Muzin in einer Studie von Zeimet bei muzinösen Karzinomen zwar öfter erhöht als beim Gesamtkollektiv, während CA 125 bei dieser Gruppe eine um rund 20 % geringere Sensitivität aufwies als gewöhnlich. Jedoch war CA 125 auch für die muzinösen Zystadenokarzinome insgesamt immer noch sensitiver als CA 72-4 (Zeimet et al., 1995).

In anderen Studien konnten weder im Serum (Gallup and Talledo, 1997, Menon and Jacobs, 2000) noch im Gewebe (Ponnusamy et al., 2007) wesentliche Unterschiede der Sensitivität bzw. der Expression von CA 72-4 zwischen den verschiedenen histologischen Formen festgestellt werden.

Bei den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist der Spiegel von CA 72-4 im Serum von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen (mittlerer Spiegel 28,83 U/ml) signifikant höher als bei Patientinnen mit gutartigen Veränderungen (Mittelwert 1,07 U/ml). Die AUC beträgt 0,726. Etwas bessere Werte erzielten Schutter und Moore mit einer AUC von 0,767 bzw. 0,775 in ihren Studien (Schutter et al., 2002, Moore et al., 2008).

Bei unseren Messungen wurden maximal 82,8 % der Patientinnen durch CA 72-4 der richtigen Gruppe, benigne oder maligne, zugeordnet. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend gut, als in unserem Kollektiv fast ausschließlich seröse Karzinome enthalten sind, CA 72-4 bei vielen Forschern aber gerade als guter Marker für muzinöse Tumore gilt (Negishi et al., 1993, Fayed et al., 1998, Hasholzner et al., 1996).

Auffällig ist auch, dass CA 72-4 die beste Spezifität unter allen untersuchten Markern liefert. Sie liegt bei dem Grenzwert, der 82,8 % der Patientinnen der richtigen Gruppe zuordnet, bei 98,2 % (vs. 93,2 % für CA 125). Auch bei den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte mit CA 72-4 besonders hohe Spezifitäten erzielt werden (Zeimet et al., 1995, Guadagni et al., 1995).

Eine weitere Frage, die im Zusammenhang mit CA 72-4 häufig diskutiert wird, ist ob eine kombinierte Bestimmung von CA 72-4 und CA 125 sinnvoll sein kann. Eine Gruppe von Autoren hält die Kombination beider Marker für sinnvoll (Zeimet et al., 1995, Fayed et al., 1998, Ponnusamy et al., 2007, Negishi et al., 1993, Guadagni et al., 1995). Dabei sind die Begründungen ganz unterschiedlich. Zeimet konnte 1995 durch Kombination der beiden Mazine schlicht Sensitivität, Spezifität und AUC steigern (Zeimet et al., 1995). Guadagni (1995) erreichte eine Steigerung der Sensitivität ohne Einbußen bei der Spezifität (Guadagni et al., 1995), was gewöhnlich oft miteinander einhergeht (Bast, 2004, Badgwell and Bast, 2007). Neghishi (1993) befürwortet die kombinierte Bestimmung der beiden Muzinmarker, weil er davon ausgeht, dass sie dadurch Ihre Defizite gegenseitig ausgleichen (Negishi et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Kombination von CA 125 mit CA 72-4 (AUC 0,941) kein Vorteil gegenüber CA 125 allein (AUC 0,944) erzielt werden.

Gadducci, Meier und Menon sehen ebenfalls keinen Vorteil in einer pauschalen Kombination von CA 125 und CA 72-4. Sie schlagen vor, dass CA 72-4 lediglich als Alternative bei solchen Ovarialkarzinomen herangezogen werden soll, die generell kein CA 125 exprimieren (Gadducci et al., 2004, Meier, 1997, Menon and Jacobs, 2000).

Tatsächlich hat sich eine pauschal kombinierte Bestimmung von CA 125 und CA 72-4 nicht durchgesetzt. Eine alleinige präoperative Bestimmung von CA 72-4 kann ebenfalls nicht empfohlen werden, weil seine Diskriminationsfähigkeit, trotz eines guten Ergebnisses in unserer Studie, der anderer Marker unterlegen ist. Somit scheidet CA 72-4 auch als Instrument zum Screening aus.

Dennoch muss wegen der hohen Spezifität bei positivem CA 72-4 mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem malignen Tumor ausgegangen werden (Fayed et al., 1998).

Insgesamt scheint CA 72-4 einer der Marker zu sein, dessen Bestimmung im Falle von CA 125-negativen Tumoren sinnvoll sein kann.

4.1.3 Der Biomarker HE4 und seine Bedeutung für Früherkennung und Diagnostik im Vergleich zu CA 125

Der Marker HE4 hat sich in Studien und auch bei unseren Untersuchungen dem etablierten Marker CA 125 als durchaus ebenbürtig erwiesen.

Bei den Messungen im Rahmen dieser Arbeit zeigte HE4 signifikant höhere Werte im Serum der Karzinompatientinnen im Vergleich zu den Patientinnen der benignen Gruppe. Die AUC für HE4 beträgt 0,897. Bei einer festgelegten Spezifität von 95 % liegt die Sensitivität von HE4 bei 65,5 %. 85,5 % der Patientinnen wurden durch HE4 mit einer resultierenden Sensitivität von 62,1 % und einer Spezifität von 98,1 % hinsichtlich der Dignität ihrer Erkrankung richtig eingeschätzt. Obwohl HE4 in unserem Kollektiv somit eine gute Trennschärfe geliefert hat, geht CA 125, wenn man dessen hervorragende AUC von 0,944 zugrunde legt, dennoch als leicht überlegener Marker aus unseren Untersuchungen hervor.

Auch in einigen anderen Studien war CA 125 der beste Einzelmarker (Andersen et al., 2010, Badgwell and Bast, 2007, Nolen et al., 2010). Es kamen jedoch auch viele Arbeitsgruppen zu dem Ergebnis, dass HE4 dem etablierten Marker CA 125 ebenbürtig oder sogar überlegen sei (Montagnana et al., 2009, Moore et al., 2008, Hellstrom et al., 2003, Havrilesky et al., 2008, Anastasi et al., 2010, Anton et al., 2012).

So soll HE4 bei vielen benignen Erkrankungen, bei denen CA 125 fälschlicherweise erhöht sein kann, keine erhöhten Werte aufweisen und somit eine höhere Spezifität liefern als der etablierte Marker (Rosen et al., 2005, Moore et al., 2008, Moore et al., 2010a, Moore et al., 2009, Hellstrom et al., 2003, Badgwell and Bast, 2007, Molina et al.). Darüber hinaus zeigte es in rund der Hälfte der Fälle, in denen CA 125 falsch negativ ist (20 %), seinerseits erhöhte Werte (Rosen et al., 2005). Für frühe Stadien des Ovarialkarzinoms soll HE4 ferner eine bessere Sensitivität aufweisen als CA 125, welches dort nur in 50 - 60 % der Fälle den Grenzwert überschreitet (Anastasi et al., 2010, Montagnana et al., 2009, Moore et al., 2008). Dieser frühere Anstieg könnte dadurch bedingt sein, dass HE4 ein geringes Molekulargewicht hat und auch der Sekretionsmechanismus weniger kompliziert zu sein scheint als der von CA 125 (Montagnana et al., 2009), dessen Freisetzung wohl stärker mit der Tumormasse verknüpft ist, so dass seine Sensitivität mit fortschreitendem Tumorstadium zunimmt (Moore et al., 2009).

Auch für das Monitoring von behandelten Patientinnen soll HE4 ebenso gut geeignet sein wie CA 125 (Anastasi et al., 2010, Granato et al., 2012).

Leider haben HE4 und CA 125 auch eine gemeinsame Schwäche. Beide detektieren muzinöse Ovarialkarzinome mit einer wesentlich geringen Sensitivität als die übrigen Histologien (Drapkin et al., 2005, Galgano et al., 2006, Moore et al., 2010b, Molina et al.).

Durch die teilweise komplementären Eigenschaften von HE4 und CA 125 wird die kombinierte Bestimmung der beiden Marker von vielen Arbeitsgruppen, auch von uns, für sinnvoll erachtet (Nolen et al., 2010, Moore et al., 2008, Scholler et al., 2006). So erwies sich diese Kombination in einer 2008 von Moore et al. veröffentlichten Studie mit 233 Patientinnen dabei nicht nur als allen Einzelmarkern überlegen, sondern auch als diejenige Zweierkombination mit der höchsten Sensitivität (76,4 %) bei einer Spezifität von 95 % und der größten Fläche unter der ROC-Kurve (AUC 0,914). Auch die Hinzunahme weiterer Marker brachte nur geringe Verbesserungen (Moore et al., 2008). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Forschungsgruppe um Nolen (Nolen et al., 2010). Bei unseren Untersuchungen hat sich die Kombination aus HE4 und CA 125 ebenfalls als die Beste erwiesen. Die AUC beträgt 0,961, was einer Zunahme von 1,7 % gegenüber unserem besten Einzelmarker CA 125 entspricht.

Ein Screeningtest, mit dem ein PPV von 10 % gewährleistet werden kann, konnte bisher leider weder mit HE4 als Einzelmarker noch in Kombination mit anderen Verfahren entwickelt werden.

Insgesamt stellt der neue Marker HE4 aber eine Alternative bei der Nachbeobachtung nicht nur CA 125-negativer Patientinnen mit Ovarialkarzinom dar (Anastasi et al., 2010).

Die kombinierte Bestimmung von CA 125 und HE4 könnte zudem bei auffälligem Sonographiebefund in Zukunft helfen, Patientinnen mit hohem Risiko für ein Ovarialkarzinom zu identifizieren und dazu beitragen, dass mehr Patientinnen von gynäkologischen Onkologen in spezialisierten Zentren behandelt werden.

4.1.4 Die Galektine 1 und 3 und ihre Bedeutung als Biomarker für die Diagnostik des Ovarialkarzinoms

4.1.4.1 Galektin-1

Zum jetzigen Zeitpunkt ist nur wenig Literatur zur Bedeutung von Galektin-1 als Biomarker bei malignen Erkrankungen verfügbar.

Bei unseren Messungen hat sich kein signifikanter Unterschied der Galektin-1-Spiegel zwischen der benignen und der malignen Patientinnengruppe ergeben. Der mittlere Galektin-1-Serumspiegel liegt bei 18,18 ng/ml für die benignen und 24,84 ng/ml für die malignen Tumoren.

Die AUC beträgt 0,61, was darauf schließen lässt, dass Galektin-1 weniger gut geeignet ist, um Karzinompatientinnen zuverlässig von solchen mit benignen Erkrankungen abzugrenzen.

Obwohl Galektin-1 und Galektin-3 die Progression maligner Tumoren in ähnlicher Weise zu fördern scheinen und zur selben Proteinfamilie gehören, konnte durch Nachweis von Galektin-1 im Serum die Dignität von Ovarialtumoren in unseren Untersuchungen weit weniger zuverlässig eingeschätzt werden als durch Nachweis von Galektin-3. Eine AUC von 0,61 bedeutet eine nur wenig bessere Diskriminationsfähigkeit, als sie bei einer zufälligen Zuordnung der Patientinnen mit einer resultierenden AUC von etwa 0,5 zu erwarten wäre.

Auch Saussez erzielte 2008 bei der Messung des Lektins im Serum von Patienten mit plattenepithelialen Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC) unter Verwendung eines humanen polyklonalen Antikörpers bei einem Cut-off von 13,5ng/ml lediglich eine Sensitivität von 22 % bei einer Spezifität von 100 %. Auch bei seiner Studie waren die Unterschiede des Galektin-1-Serumspiegels zwischen Karzinompatienten und Gesunden nicht signifikant (Saussez et al., 2008b).

Bei Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen stellte Saussez zwar einen Anstieg des Galektin-1-Serumspiegels bei gutartigen Veränderungen gegenüber Gesunden fest, fand aber keinen weiteren Anstieg bei Karzinomen (Saussez et al., 2008a).

Weil die Lektin-Spiegel aber bei beiden Erkrankungen nach einer Behandlung absanken, schlägt Saussez weitere Untersuchungen vor, um die prognostische Bedeutung von Galektin-1 weiter zu evaluieren.

Viele andere Autoren unterstreichen wegen der bereits erwähnten immunsuppressiven und tumorprogressionsfördernden Wirkungen des Lektins eher

sein Potential in der Therapie maligner und entzündlicher Erkrankungen sowie bei vom Abort bedrohten Schwangerschaften (Fischer et al., 2009, Wu et al., 2009, Camby et al., 2006, Kim et al., 2012).

4.1.4.2 Galektin-3

Galektin-3 scheint eine wichtige Rolle in der Biologie maligner Erkrankungen zu spielen (Liu and Rabinovich, 2005). Somit liegt die Frage nahe, ob das Lektin im Blut von Patienten mit malignen Erkrankungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe in erhöhter Konzentration vorkommt.

Sakaki fand im Jahr 2008 im Serum von Patienten mit Harnblasenkarzinomen erhöhte Spiegel des Lektins (Sakaki et al., 2008). Saussez ermittelte im selben Jahr bei an plattenepithelialen Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC) (Saussez et al., 2008b) und an Schilddrüsenkarzinomen (Saussez et al., 2008a) erkrankten Patienten erhöhte Galektin-Werte. Dabei ergab sich eine Sensitivität von 36 % für HNSCC bzw. 73 % für Schilddrüsenkarzinome und eine Spezifität von 90 % für HNSCC respektive 74 % für (Saussez et al., 2008b) Schilddrüsenkarzinome (Saussez et al., 2008a, Saussez et al., 2008b). Außerdem hatten die HNSCC-Patienten mit metastasierten Karzinomen höhere Serumspiegel als diejenigen Patienten mit lokalisiertem Tumor (Saussez et al., 2008b).

Bei Patienten, die an metastasierten malignen Melanomen erkrankt waren, wurden ebenfalls höhere Galektin-3-Konzentrationen gemessen als bei den gesunden Kontrollen (Vereecken et al., 2006).

Inohara konnte bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen andererseits keine erhöhten Galektin-3-Spiegel nachweisen (Inohara et al., 2008).

Iurisci bestimmte die Serumspiegel von Galektin-3 bei 99 Patienten mit verschiedensten malignen Erkrankungen, darunter waren vier mit Ovarialkarzinomen. Bei diesen, wie auch bei den anderen malignen Erkrankungen, außer bei den Patientinnen mit Mammakarzinomen, waren die Werte von Galektin-3 signifikant höher als bei der gesunden Vergleichsgruppe. Außerdem fand sich auch hier eine Korrelation des Galektin-3-Spiegels mit dem Vorhandensein von Metastasen (Iurisci et al., 2000).

Abgesehen von Iurisci hat bisher keine Arbeitsgruppe hinsichtlich der Bestimmung von Galektin-3 im Serum und der Evaluation seiner Bedeutung als Biomarker Ovarialkarzinompatientinnen einbezogen.

Bei unseren Untersuchungen haben wir signifikant erhöhte Galektin-3-Werte im Serum der Ovarialkarzinompatientinnen gemessen. Der Mittelwert des Spiegels für diese Patientinnen beträgt 3,02ng/ml. Für die benigne Vergleichsgruppe liegt er bei 1,28ng/ml. Die Fläche unter der von uns erstellten ROC-Kurve beträgt 0,71. Bei einer festgelegten Spezifität von 95 % beträgt die Sensitivität nur 22,6 %. Dennoch konnten bei einem optimalen Grenzwert von 2,48 ng/ml 76,2 % der Patientinnen mit einer Sensitivität von 48,4 % und einer Spezifität von 93,9 % hinsichtlich der Dignität ihrer Erkrankung korrekt zugeordnet werden.

Somit kann man anhand des Galektin-3-Serumspiegels zwar recht zuverlässig zwischen malignen und benignen Erkrankungen differenzieren, im Übrigen ist es dem etablierten Marker CA 125 aber weit unterlegen und daher allenfalls als ergänzender Marker in der Diagnostik des Ovarialkarzinoms geeignet.

Nachdem Vereecken bei malignen Melanomen eine Korrelation hoher Serumspiegel mit starker Expression in der Histologie fand (Vereecken and Heenen, 2006) und Inohara nachwies, dass papilläre Schilddrüsen Karzinome Galektin-3 sezernieren (Inohara et al., 2008), ist es wahrscheinlich, dass die Tumorzellen selbst zur Erhöhung des Serumspiegels beitragen. Galektin-3 wird aber auch von unterschiedlichen Zellen der angeborenen Abwehr exprimiert (Krzeslak and Lipinska, 2004), von denen einige, wie z.B. Makrophagen, Galektin-3 nachweislich sezernieren (Henderson and Sethi, 2009). Insofern sind hohe Galektin-3-Serumspiegel bei Karzinompatienten wohl zum Teil auch entzündlichen Ursprungs (Vereecken et al., 2006, Inohara et al., 2008). Es ist möglich, dass durch die karzinombedingte Galektin-3 Freisetzung die Entzündung durch dessen proinflammatorische Eigenschaften erst hervorgerufen wird und dann zu einer weiteren Freisetzung des Lektins führt (Vereecken and Heenen, 2006).

Weil Galektin-3 nicht spezifisch für eine bestimmte Tumorerkrankung ist, ist es wahrscheinlich, dass sein Vorhandensein allgemein für die Entstehung und Progression maligner Tumoren bedeutend ist. So kann das Lektin bei alleiniger Lokalisation im Zytosol, möglicherweise über Hemmung der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien (Devouassoux-Shisheboran et al., 2006, Califice et al., 2004b), maligne Zellen vor Apoptose schützen (Califice et al., 2004a, de Oliveira et al., 2010, van den Brule et al., 1996) und damit auch zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika beitragen (Liu and Rabinovich, 2005).

Extrazelluläres Galektin-3 kann darüber hinaus gegen den Tumor gerichtete T-Zellen der Apoptose zuführen (Liu and Rabinovich, 2005, Liu and Rabinovich, 2010).

Ferner bindet Galektin-3 das Proto-Onkogen KRAS, eine GTPase und wichtigen Bestandteil einer Reihe von Signaltransduktionswegen, wodurch das Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem KRAS hin zum aktiven KRAS GTP verschoben wird. Dadurch kommt es zu einer Verlängerung und Verstärkung des KRAS-Signals, was letztlich das Zellwachstum stimuliert und die Apoptose verhindert (Liu and Rabinovich, 2005).

Zhao zu Folge soll Galektin-3 auch unterstützend bei der Metastasierung von Tumorzellen wirken (Zhao et al., 2009) und laut Liu auch die Angiogenese, möglicherweise über Förderung der Migration von Endothelzellen, vorantreiben können (Liu and Rabinovich, 2005). Dazu passend hemmte in einer Studie von Wang ein Knockdown von Galektin-3 mittels siRNA in einer Prostatakarzinomzelllinie deren Invasions- und Migrationsfähigkeit sowie Proliferation und Wachstum und führte zum Zell-Zyklus-Arrest in der G1-Phase (Wang et al., 2009). Insofern ist heute zwar bekannt, dass Galektin-3 durch unterschiedliche Mechanismen zur Tumorprogression beitragen kann, dennoch sind die außergewöhnlich komplexen und vielfältigen Zusammenhänge bisher nur am Rande entschlüsselt worden, so dass weitere Forschung auf diesem Gebiet ebenso unerlässlich wie viel versprechend scheint.

4.1.5 Korrelation einzelner Marker

Betrachtet man alle Befunde, die malignen und die benignen, so korrelieren CA 125, HE4, Galektin-3 und CA 72-4 jeweils hochsignifikant miteinander. Einzig Mouse-Galektin-1 korreliert mit keinem anderen Marker. Betrachtet man nur die Patientinnen mit malignen Tumoren ergeben sich ähnliche Werte.

Eine Korrelation von CA 72-4 und CA 125 könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Herkunft beider auf gescheddete Muzin-Moleküle zurückzuführen ist. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Autoren, nach denen CA 72-4 eher ein Marker für muzinöse Ovarialtumoren ist, ist eine Korrelation mit CA 125 unerwartet, da Letzteres vor allem für seröse Karzinome hohe Beweiskraft besitzt. Andererseits hat CA 72-4 bei unseren Untersuchungen annehmbare Sensitivitäten und gute Spezifitäten geliefert, obwohl das hier verwendete Kollektiv vor allem seröse Malignome enthält, so dass eine Korrelation der beiden Muzine für dieses Kollektiv

plausibel ist. Somit sprechen die Ergebnisse unserer Arbeit dafür, dass CA 72-4 auch ein geeigneter Marker für seröse Karzinome sein kann, auch wenn es dabei keine so große Beweiskraft besitzt wie CA 125.

Die Korrelation von Galektin-3 mit CA 125 kann dadurch erklärt werden, dass Letzteres als Rezeptor für Galektine betrachtet wird, über den Tumorzellen galektinabhängig mit der extrazellulären Matrix interagieren können (Seelenmeyer et al., 2003).

Da CA 125 aber eigentlich stärker an Galektin-1 als an Galektin-3 binden soll (Seelenmeyer et al., 2003), ist es verwunderlich, dass in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation für Galektin-1 und CA 125 nachgewiesen werden konnte. Die fehlende Korrelation von Galektin-1 mit einem anderen Marker könnte aber auch auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass unsere Messungen mit einem Mouse-Galektin-1 ELISA durchgeführt wurden.

Die Korrelation zwischen HE4 und CA 125, die sich auch bei Montagnana findet (Montagnana et al., 2009), scheint plausibel. Obwohl die beiden Marker zum Teil komplementäre Eigenschaften haben, exprimieren viele, vor allem seröse Karzinome, beide Marker gemeinsam (Havrilesky et al., 2008, Nolen et al., 2010), während viele muzinöse Tumoren keinen der beiden exprimieren (Moore et al., 2010b).

Bei der zusätzlich durchgeführten Analyse der Korrelationen zwischen Serummarkern und Tumor- bzw. FIGO-Stadium, Metastasen- und Lymphknotenmetastasenstatus fanden wir einen Zusammenhang zwischen den Serumspiegeln von HE4 und CA 125 mit dem Vorhandensein von Metastasen (Korrelationskoeffizient=0,582; $p=0,009$). Ein Zusammenhang zwischen steigenden CA 125-Spiegeln und fortschreitendem Tumorstadium ist schon länger bekannt (Husseinzadeh, 2010, Moore et al., 2010b, Bast et al., 2005). Ferner sind beide Marker gerade für späte Tumorstadien sehr sensitiv (Havrilesky et al., 2008). Vor allem die Sekretion von CA 125 korreliert eng mit der Tumormasse (Montagnana et al., 2009, Husseinzadeh, 2010).

Der Spiegel von Mouse-Galektin-1 korreliert außerdem hochsignifikant negativ mit dem Tumorstadium (Korrelationskoeffizient=-0,687; $p=0,002$) sowie signifikant negativ mit dem FIGO-Stadium (Korrelationskoeffizient=-0,538; $p=0,014$). Aufgrund der Erkenntnisse über die eher progressionsfördernde und immunsuppressive Wirkung von Galektin-1 und die verstärkte Expression in malignen gegenüber

gesunden Geweben, die vielfach beschrieben wurden, ist eine Korrelation von hohen Serumspiegeln mit frühen Tumorstadien eher überraschend. Daher sollte dieser neue Zusammenhang in weiteren Studien beleuchtet werden.

Innerhalb der benignen Befunde konnte keine Korrelation zwischen den einzelnen Serummarkern festgestellt werden.

4.1.6 Kombination von Biomarkern und Anwendbarkeit in der Praxis

Im Hinblick auf die Heterogenität der Ovarialtumoren erscheint die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Biomarker grundsätzlich sinnvoll (Kobel et al., 2008). In der aktuellen Literatur findet man viele Belege für das Potential einer kombinierten Markerbestimmung in der Diagnostik des Ovariakarzinoms. Fayed erzielte 1998 mit einer Kombination aus CA 72-4 und CA 125 eine Sensitivität von 95 % bei einer ebenso großen Spezifität und übertraf damit CA 125 allein (Fayed et al., 1998). Moore und Nolen erreichten mit der Kombination CA 125/HE4 (AUC 0,914 bzw. 0,868) ebenfalls eine Verbesserung gegenüber ihren besten Einzelmarkern (Moore et al., 2008, Nolen et al., 2010).

Um die Vorhersagefähigkeit zu erhöhen haben auch wir unsere Marker miteinander kombiniert. Wegen des kleineren Patientenkollektivs wurde dies auf Zweier-Kombinationen beschränkt. Tatsächlich konnte die Vorhersagefähigkeit durch mehrere Kombinationen gegenüber der von CA 125 (AUC 0,944), unserem besten Einzelmarker, verbessert werden. Unsere beste Kombination ist, wie bereits erwähnt, die aus CA 125 und HE4 (AUC 0,961; entspricht einem Plus von 1,7 % gegenüber CA 125 allein).

Auch die Kombinationen aus CA 125 und Mouse-Galektin-1 (AUC 0,948), sowie den 2008 von Dr. med. L. Schuhmacher im Rahmen ihrer Dissertation untersuchten Markern CA19-9 (AUC 0,953), CA15-3 (AUC 0,946) und PP1490 (AUC 0,947) (Schuhmacher, 2008), hat leicht verbesserte Werte ergeben. Weder eine Kombination aus CA 72-4 mit CA 125 (AUC 0,94) noch mit HE4 (AUC 0,91) führte gegenüber CA 125 allein zu einer Steigerung der Diskriminationsfähigkeit.

Einige Forscher haben mehr als zwei Biomarker miteinander kombiniert. Wie die Ergebnisse von Moore und Nolen zeigen, kann durch Hinzunahme weitere Marker durchaus noch eine leichte Steigerung gegenüber der Zweierkombination erzielt werden (Moore et al., 2008, Nolen et al., 2010). Trotzdem gibt Moore, unter Verweis auf den limitierten Umfang der Sensitivitätssteigerung, der kombinierten

Bestimmung von nur zwei Markern - gegebenenfalls in Kombination mit bildgebenden Verfahren - den Vorzug (Moore et al., 2008).

Insgesamt erscheint die kombinierte Bestimmung von Biomarkern sinnvoll, um zusätzliches Differenzierungspotential bei der Unterscheidung zwischen malignen und benignen Raumforderungen zu erlangen. Obwohl viele Kombinationen gegenüber CA 125 keine Vorteile erbracht haben, so gelang doch die Identifikation einiger vielversprechender Paarungen. Besonders die Kombination CA 125/HE4 sollte in weitere Studien einbezogen werden.

Der von Moore entwickelte „*Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*“ (ROMA), der mit Hilfe der kombinierten CA 125- und HE4-Bestimmung im Serum und dem Menopausenstatus das Risiko quantifiziert, mit dem ein Tumor im Adnexegebiet malignen Ursprungs ist, erhielt in Europa und den USA kürzlich die Zulassung.

Eine Alternative zur Kombination von unterschiedlichen Biomarkern bietet die Hinzunahme anderer diagnostischer Verfahren.

Jacobs entwickelte 1990 den „*risk of malignancy index*“ (RMI), der den CA 125-Serumspiegel, den Menopausenstatus und die Sonographie zusammenfasst und erzielte damit gute Ergebnisse (Jacobs et al., 1990). Der RMI wurde allerdings in einer Studie von Moore vom ROMA in seiner Beweiskraft übertroffen (Moore et al., 2010b).

Skates entwickelte den „*risk of ovarian cancer*“- (ROC)-Algorithmus, der die Kinetik des CA 125 Spiegels über die Zeit sowie das Alter der Patientin einbezieht. Bei auffälligem Ergebnis erfolgt eine sonographische Untersuchung (Skates et al., 2003). Aktuell werden die flächendeckende Durchführbarkeit und der Nutzen des ROC-Algorithmus in Großbritannien in einer Studie mit über 200000 postmenopausalen Frauen evaluiert, die noch bis 2014 läuft. Bis jetzt sind die Ergebnisse vielversprechend. So wurden überdurchschnittlich viele Frauen bereits in frühen Stadien des Ovarialkarzinoms diagnostiziert. Ob sich daraus tatsächlich ein Überlebensvorteil ergibt, ist derzeit noch unklar (Menon et al., 2009).

4.2. Interpretation der Expressionsmuster der Galektine 1 und 3 in malignen und benignen Tumoren des Ovars unter Berücksichtigung ihrer Rolle in Tumorimmunologie und Metastasierung

4.2.1 Expression von Galektin-1 in malignen und benignen Tumoren und dem umgebenden Stroma

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit dem Expressionsmuster von Galektin-1 in malignen Ovarialtumoren beschäftigt, um Erkenntnisse über dessen Rolle bei der Progression solcher Tumoren zu gewinnen. Bei diesen Untersuchungen war Galektin-1 sowohl in den Ovariakarzinomen als auch in den benignen Veränderungen schwach exprimiert. Der Unterschied war nicht signifikant. Im karzinomassoziierten Stroma war die Expression stärker als in den Karzinomen selbst und auch im Vergleich zu dem die benignen Raumforderungen umgebenden Gewebe signifikant größer. Eine Korrelation zwischen den IRS-Scores für Galektin-1 und dem Metastasenstatus, FIGO-Stadium oder Grading konnte nicht festgestellt werden.

Auch van den Brûle, der bereits 2003 eine Studie zur Expression von Galektin-1 in Ovariakarzinomen veröffentlichte, fand eine bevorzugte Akkumulation des Lektins im peritumoralen Stroma (van den Brule et al., 2003). Zuvor hatte er dieses Phänomen bereits in Malignomen des Uterus (van den Brule et al., 1996) und der Prostata (van den Brule et al., 2001) beschrieben.

Eine Korrelation mit FIGO-Stadium, Lymphknoten-Status oder Invasionstiefe konnte er im Uterus ebenfalls nicht nachweisen (van den Brule et al., 1996), fand aber eine inverse Korrelation der Galektin-1 Expression im Stroma mit dem progressionsfreien Überleben der Patienten mit Prostatakarzinomen (van den Brule et al., 2001). Diese Ergebnisse bestätigte Kim bei Patientinnen mit Ovariakarzinomen (Kim et al., 2012). Andere Autoren beschreiben ebenfalls dieses stroma-betonte Expressionsmuster von Galektin-1 in malignen Tumoren von Zervix (Kohrenhagen et al., 2006), Vulva (Kohrenhagen et al., 2010), Kolon (Sanjuan et al., 1997, Hittellet et al., 2003) und in Malignomen der Leber (Spano et al., 2009), wobei die Expression bei Zervix, Vulva und Kolon mit zunehmender maligner Transformation der Zellen zunahm. Einige Arbeitsgruppen fanden eine in Stroma- und Karzinomzellen gleichermaßen hoch regulierte Galektin-1 Expression in Malignomen der Mamma (Jung et al., 2007), des Kolons (Sanjuan et al., 1997) und des Endometriums (van den Brule et al., 1996).

Doch wie ist diese Akkumulation von Galektin-1 im peritumoralen Stroma zu erklären?

Eine mögliche Theorie besagt, dass die Fibroblasten selbst das Lektin exprimieren, dazu aber von den malignen Zellen angeregt werden müssen, weil in Fibroblasten zwar Galektin-1 mRNA nachgewiesen wurde (Jung et al., 2007), man im nicht infiltriertem Stroma aber keine erhöhte Expression fand (van den Brule et al., 2003, Kohrenhagen et al., 2006, Jung et al., 2007). Für diese Theorie spricht auch, dass van den Brûle Fibroblasten durch Inkubation mit dem Zellkulturüberstand von Ovarialkarzinomzellen zu vermehrter Galektin-1 Expression stimulieren konnte (van den Brule et al., 2003).

Es ist aber auch vorstellbar, dass das Lektin von den malignen Zellen selbst gebildet und zügig ins Stroma sezerniert wird (Kohrenhagen et al., 2006, Jung et al., 2007, van den Brule et al., 2001, van den Brule et al., 2003). Letztlich sind in beiden Fällen die malignen Zellen der Initiator einer vermehrten Galektin-1 Expression im peritumoralen Stroma.

Bezüglich der Frage nach einem Nutzen der Galektin-1 Expression für maligne Zellen konnte Spano 2009 zeigen, dass sich maligne Tumoren in Anwesenheit von Galektin-1 invasiver verhalten. Er stellte nach Transfektion einer Galektin-1 cDNA via Plasmid in eine wenig invasive Leberkarzinomzelllinie verstärkte Migration und Invasion der Zellen fest (Spano et al., 2009). Entsprechend zeigte Kim 2012, dass sich Ovarialkarzinomzelllinien nach Transfektion mit einer Galektin-1-siRNA weniger invasiv verhalten und weniger stark proliferieren, als solche die mit rekombinatem Galektin-1 behandelt wurden (Kim et al., 2012). Van den Brûle berichtet von einer verstärkten Anheftung einiger Karzinomzelllinien an die Basalmembran-Proteine Laminin und Fibronectin bei steigenden Galektin-1 Konzentrationen in ihrer Umgebung (van den Brule et al., 2003, van den Brule et al., 1996).

Zudem fand man heraus, dass die stromale Expression des Lektins zu einer Verminderung der Proliferationsrate von Fibroblasten führt und damit möglicherweise der Bildung einer fibrösen Kapsel um den Tumor entgegenwirkt (van den Brule et al., 2003). Außerdem wurde vielfach berichtet, dass Galektin-1 über CD43 und CD45 die Apoptose tumor-reaktiver T-Zellen auslösen und die Zytokinproduktion zugunsten eines Malignoms verändern kann (Jung et al., 2007, van den Brule et al., 2003, Kohrenhagen et al., 2006).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Galektin-1 die Bedingungen für malignes Wachstum begünstigt und eine peritumorale Akkumulation des Lektins, wie wir sie in unseren Präparaten festgestellt haben, der Bildung eines „Schutzschildes“ um den Tumor entspricht.

Die Akkumulation von Galektin-1 im peritumoralen Stroma muss als Zeichen einer malignen Progression, oft verbunden mit Metastasierung und „tumor immun escape“, betrachtet werden und (Seelenmeyer et al., 2003).

4.2.2 Expression von Galektin-3 in malignen und benignen Tumoren und dem umgebenden Stroma

Einige Arbeitsgruppen haben eine erhöhte Expression von Galektin-3 in verschiedenen malignen Tumoren, beispielsweise in Schilddrüsen- (Inohara et al., 2008), Blasen- (Sakaki et al., 2008), Prostata- (Califice et al., 2004a) Pankreas- (Xie et al., 2012) und Nierenzellkarzinomen festgestellt (van den Brule et al., 2004). Nachdem bekannt ist, dass Galektin-3 viele Eigenschaften hat, die maligne Erkrankungen in ihrer Progression unterstützen können, scheinen diese Ergebnisse zunächst plausibel.

Im Widerspruch dazu berichten jedoch viele Autoren von einer verminderten Expression des Lektins im malignen Gewebe. So fand Castronovo eine massive Down-Regulation von Galektin-3 in invasiven und metastasierten Mamma-Karzinomen bei starker Expression in benignen Läsionen und gesundem Gewebe (Castronovo et al., 1996). Diese Ergebnisse wurden durch eine Studie von de Oliveira bestätigt (de Oliveira et al., 2010). In Malignomen der Niere, Prostata und Blase korrelierte ein Expressionsverlust ebenfalls mit zunehmender Progression des Tumors (Merseburger et al., 2008a, Merseburger et al., 2008b, Kramer et al., 2008). Auch van den Brûle fand in Endometrium- und Ovarialkarzinomen eine verminderte Galektin-3-Expression (van den Brule et al., 1996, van den Brule et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Galektin-3 in Ovarialkarzinomen untersucht und mit der in benignen Läsionen verglichen. Dabei hat sich für beide Dignitäten eine schwache Expression von Galektin-3, mit geringfügig höherem Mittelwert für die benignen Veränderungen ergeben. Mit einem einem p-Wert von 0,342 ist der Unterschied jedoch nicht signifikant.

Daneben haben wir die Galektin-3-Expression im peritumoralen Stroma betrachtet. Hierbei fand sich sowohl für die benigne als auch die maligne Gruppe eine schwache

Farbreaktion, bei höherem mittlerem IRS-Score für die benigne Gruppe. Der Unterschied ist signifikant. Diese Ergebnisse passen in Ihrer Tendenz zu den von van den Brûle, Castronovo und de Oliveira beschriebenen Expressionsmustern in verschiedenen gynäkologischen Malignomen.

Doch wie kann erklärt werden, dass einige Forscher eine erhöhte Galektin-3-Expression in Karzinomen finden, andere hingegen eine erniedrigte Expression?

Eine Möglichkeit wäre, dass Galektin-3 in Abhängigkeit von Zelltyp unterschiedliche, progressionsfördernde oder -hemmende, Funktionen hat (Castronovo et al., 1996). Denkbar wäre auch, dass eine Kreuzreaktion der zur Detektion verwendeten Antikörper mit dem in malignen Geweben hochregulierten Lamininrezeptor 67LR (Castronovo et al., 1996) oder anderen bisher unbekanntem Molekülen (van den Brule et al., 2004) zu falsch hohen Werten geführt hat.

Eine andere Theorie besagt, dass eine vorübergehende Down-Regulation von Adhäsionsmolekülen wie Galektin-3 und dessen Rezeptoren in der ECM die Tumorzellen überhaupt erst dazu befähigt, sich voneinander zu lösen, um anschließend im Rahmen der Metastasierung die Basalmembran und die ECM zu durchdringen und in Gefäße einzuwandern (de Oliveira et al., 2010, van den Brule et al., 1996). Dafür spricht auch, dass Galektin-3 in intravaskulären Tumorzellemboli von Mammakarzinompräparaten bei niedriger Expression in den Primärtumoren wieder vermehrt exprimiert wird und das Endothel dieser Gefäße wieder verstärkt Galektin-Rezeptoren trägt (de Oliveira et al., 2010). Somit scheint Galektin-3 in bestimmten Phasen der Proliferation nicht nur fördernd, sondern auch suppressiv auf Karzinome wirken zu können. Die erfolgreiche Expansion von Tumorzellen könnte also schlicht von der richtigen Balance zwischen vermehrter und verminderter Expression unterschiedlicher Moleküle abhängen (de Oliveira et al., 2010, van den Brule et al., 1996).

4.2.3 Korrelation der Expression von Galektin-1 und -3

Zunächst haben wir die Korrelation der Expression von Galektin-1 und -3 unabhängig von der Dignität der Befunde untersucht. Diese Analyse hat ergeben, dass die Expression von Galektin-1 im veränderten Gewebe hochsignifikant mit der Galektin-1-Expression im umgebenden Stroma (Korrelationskoeffizient=0,280; p=0,004) und mit der Expression von Galektin-3 im veränderten Gewebe korreliert (Korrelationskoeffizient=0,284; p=0,004). Ferner korreliert die Expression von

Galektin-1 im Stroma signifikant mit der Galektin-3-Expression im veränderten Gewebe selbst (Korrelationskoeffizient=0,241; $p=0,012$).

Bei der Analyse der Korrelation der benignen Befunde untereinander ergeben sich zwischen den einzelnen IRS-Scores ähnliche Korrelationskoeffizienten, wie bei der Betrachtung aller Befunde mit abweichendem Signifikanzniveau.

Innerhalb der malignen Befunde ist keine Korrelation hinsichtlich der IRS-Scores der Expression von Galektin-1 und -3 vorhanden. Eine Korrelation zwischen den IRS-Scores der beiden Lektine und Metastasenstatus, FIGO-Stadium und Grading konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

Insgesamt scheint eine Korrelation von Galektin-1 und -3 plausibel, da beide zur selben Proteinfamilie gehören und beide eine Rolle in der Progression maligner Tumoren spielen. Nachdem Galektin-1 bevorzugt im peritumoralem Stroma und Galektin-3 eher im Tumor selbst zu finden ist, wäre auch hier ein Zusammenhang zu erwarten. Verwunderlich ist, warum gerade bei ausschließlicher Betrachtung der malignen Befunde dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden kann.

Zudem fanden einige Autoren eine Korrelation der Galektin-Expression mit Invasivität, Prognose oder TNM-Status: So zeigte Jung eine Verbindung zwischen Galektin-1-Expression im Stroma und TNM-Status (Jung et al., 2007), Spano fand einen Zusammenhang zwischen der Expression des Lektins und dem Vorhandensein von Metastasen (Spano et al., 2009) und Merseburger wies eine Korrelation zwischen Expressionsverlust von Galektin-3 und zunehmender maligner Progression nach (Merseburger et al., 2008a, Merseburger et al., 2008b). Andere Forscher konnten, wie in der vorliegenden Arbeit, keine Korrelation von Galektin-1 oder -3 mit Tumor, Nodal- oder Metastasen-Status nachweisen, so etwa van den Brûle (van den Brule et al., 1996).

Insgesamt wäre eine Einbeziehung von Korrelationsanalysen in weitere Studien empfehlenswert, gerade um mehr über die teilweise komplementären, teilweise inversen Beiträge der Galektine-1 und -3 in der Progression maligner Tumoren und ihr Zusammenspiel zu erfahren.

4.3 Klinische Relevanz und Ausblick

Die Etablierung eines zuverlässigen Biomarkertests in der Diagnostik von Ovarialtumoren wäre ein wünschenswerter Fortschritt in der Gynäkologie. Ein solcher könnte einerseits helfen, die Anwendung invasiver Methoden zur Dignitätsabschätzung zu reduzieren und andererseits bewirken, dass Patientinnen mit hohem Karzinomrisiko frühzeitig identifiziert und vermehrt in etablierte Zentren überwiesen werden, in denen sie die bestmögliche Behandlung erhalten.

Um einen solchen Test auf den Weg zu bringen, haben wir neue und bekannte Biomarker im Blut von an malignen und benignen Ovarialtumoren erkrankten Patientinnen quantifiziert und hinsichtlich ihrer Voraussagefähigkeit mit dem etablierten Marker CA 125 verglichen. Dabei konnten wir vor allem mit dem neuen Marker HE4 gute Ergebnisse erzielen.

Um zusätzliches Differenzierungspotential zu erhalten und aufgrund der Heterogenität der Ovarialtumoren haben wir unsere Marker miteinander kombiniert. Dabei erzielten wir mit den komplementären Markern HE4 und CA 125 die besten Ergebnisse. Die kombinierte Bestimmung dieser beiden Marker wird auch von vielen anderen Wissenschaftlern für die präoperative Dignitätseinschätzung beim Ovarialkarzinom empfohlen. Zudem kann HE4 im Falle einer Negativität von CA 125 auch als Verlaufsmarker eingesetzt werden. Dies gilt mit Einschränkungen auch für CA 72-4. Zwar galt dieses bisher vor allem als Marker für das muzinöse Ovarialkarzinom, lieferte aber in dem hier herangezogenen, vor allem aus serösen Karzinomen zusammengesetzten Kollektiv dennoch eine annehmbare Sensitivität bei hervorragender Spezifität.

Wir hoffen, dass unsere Ergebnisse nicht nur zur Etablierung zuverlässiger, nicht-invasiver Verfahren in der Diagnostik von Ovarialtumoren beitragen, sondern auch weiterführenden Studien den Weg ebnen.

Die Galektine 1 und 3 liefern bisher weder in den aktuell verfügbaren Studien noch bei unseren Untersuchungen Ergebnisse, die eine Verwendung in der Diagnostik des Ovarialkarzinoms sinnvoll erscheinen lassen.

Galektine scheinen vielmehr eine wichtige Rolle in der komplexen Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem zu spielen (Dunn et al., 2004).

So fördern sowohl Galektin-1 (Motran et al., 2008) als auch Galektin-3 (Liu and Rabinovich, 2010) die Entwicklung von Th₂-Zellen, deren Zytokine malignes Wachstum zu unterstützen scheinen, gegenüber der von Th₁-Zellen, die besonders

wichtig für die Anti-Tumor-Immunität sind (Rodriguez-Vita and Lawrence, 2010). Galektin-1 und -3 können ferner die Apoptose tumorreaktiver T-Zellen induzieren (Liu and Rabinovich, 2010).

Durch diese und andere Eigenschaften fördern die Galektine-1 und -3 somit in erheblichem Maße, dass maligne Zellen der immunologischen Kontrolle entgehen können.

Beide Lektine können außerdem Bindungen zwischen der Zelloberfläche von Tumorzellen und der ECM oder den malignen Zellen untereinander herstellen (van den Brule et al., 2001, Iurisci et al., 2000), was bedeutsam für den Prozess der Metastasierung ist (Stricker and Kumar, 2010).

Dass Potential der Galektine scheint also weniger in der Tumor-Diagnostik als vielmehr in der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze in der Tumorthherapie und der Gewinnung neuer Erkenntnisse über das Wechselspiel zwischen malignen Zellen und dem Immunsystem zu liegen. Diese Hypothese wurde in ihrer Tendenz durch eine Studie von Kim et al. bestätigt, die zeigen konnte, dass die gleichzeitige Behandlung von Ovarialkarzinomzellen mit einer Galektin-3-siRNA und Paclitaxel gegenüber dem Chemotherapeutikum allein eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens herbeiführt (Kim et al., 2011).

Wir hoffen, dass die durch unsere Untersuchungen gewonnen Erkenntnisse zur Durchführung weiterführender Studien in diesem Zusammenhang beitragen.

5. Zusammenfassung

Die sichere präoperative Abgrenzung maligner Befunde ist ein essentieller Schritt zur optimalen Therapie des Ovarialkarzinoms. Mit dem Ziel, die präoperative Diagnostik um einen zuverlässigen, wenig invasiven Test zu ergänzen, wurden in 92 Serumproben von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen und benignen Raumforderungen im Adnexegebiet die Spiegel des in der Diagnostik etablierten Markers CA 125 sowie der potentiellen neuen Biomarker HE4, CA 72-4, Galektin-1 und Galektin-3 bestimmt.

Um mehr über die Rolle der Galektine in der Biologie maligner Ovarialtumore zu erfahren, wurden 111 histologische Präparate, ebenfalls von an malignen und benignen Adnextumoren erkrankten Patientinnen, auf die Expression von Galektin-1 und -3 hin untersucht.

Bei den Untersuchungen des Serums war CA 125 der beste Einzelmarker und zeigte mit einer Fläche unter der Kurve (AUC) von 0,944 eine gute Diskriminationsfähigkeit zwischen Karzinomen und benignen Erkrankungen.

Besonders gute Ergebnisse erzielten wir mit einer AUC von 0,897 auch mit dem neuen Marker HE4. Das Glykoprotein hat sich jedoch nicht nur bei unseren Untersuchungen, sondern auch in zahlreichen anderen Studien gegenüber dem etablierten Marker CA 125 als ebenbürtig erwiesen.

CA 72-4 zeigte mit einer AUC von 0,726 eine mittlere Genauigkeit bei der Bestimmung der Tumordignität. Es zeichnete sich aber durch eine hervorragende Spezifität von maximal 98,2 % aus, so dass bei positivem CA 72-4 mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem malignen Tumor ausgegangen werden muss.

Galektin-1 (AUC 0,609) und Galektin-3 (AUC 0,71) sind dem etablierten Marker CA 125 in der Diagnostik des Ovarialkarzinoms weit unterlegen und daher allenfalls als ergänzende Marker geeignet.

Um zusätzliches Differenzierungspotential zu erhalten haben wir unter Einbeziehung der in einer bereits veröffentlichten Arbeit unserer Forschungsgruppe untersuchten Marker jeweils zwei Biomarker miteinander kombiniert. Tatsächlich konnte die Vorhersagefähigkeit durch mehrere Kombinationen gegenüber der von CA 125 verbessert werden. Unsere beste Kombination war, mit einer AUC von 0,961, die aus

CA 125 und HE4. Das entspricht einem Zuwachs von immerhin 1,7 % gegenüber dem besten Einzelmarker CA 125 (AUC 0,944).

Bei auffälligem Sonographiebefund könnte die Bestimmung dieser beiden Marker in Zukunft helfen, Patientinnen mit hohem Risiko für ein Ovarialkarzinom präoperativ frühzeitig zu identifizieren.

Hinsichtlich der Expression der Galektine 1 und 3 im Gewebe fiel eine besonders starke Akkumulation von Galektin-1 im karzinomassoziierten Stroma auf. Dieses Expressionsmuster wird auch von anderen Arbeitsgruppen im Zusammenhang mit verschiedenen Malignomen beschrieben und oftmals als Zeichen maligner Progression gewertet.

Wir hoffen, dass die durch unsere Untersuchungen gewonnen Erkenntnisse über das Expressionsmuster der Galektine in Ovarialkarzinomen zur Durchführung weiterführender Studien anregen, da das Potential dieser Proteine gerade in einer möglichen Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze und der Gewinnung neuer Erkenntnisse über das Wechselspiel zwischen malignen Zellen und dem Immunsystem groß zu sein scheint.

6. Literaturverzeichnis

- ADAMS, L., SCOTT, G. K. & WEINBERG, C. S. (1996) Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. *Biochim Biophys Acta*, 1312, 137-44.
- ANASTASI, E., MARCHEI, G. G., VIGGIANI, V., GENNARINI, G., FRATI, L. & REALE, M. G. (2010) HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. *Tumour Biol*, 31, 113-9.
- ANDERSEN, M. R., GOFF, B. A., LOWE, K. A., SCHOLLER, N., BERGAN, L., DRESCHER, C. W., PALEY, P. & URBAN, N. (2010) Use of a Symptom Index, CA125, and HE4 to predict ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 116, 378-83.
- ANTON, C., CARVALHO, F. M., OLIVEIRA, E. I., MACIEL, G. A., BARACAT, E. C. & CARVALHO, J. P. (2012) A comparison of CA125, HE4, risk ovarian malignancy algorithm (ROMA), and risk malignancy index (RMI) for the classification of ovarian masses. *Clinics (Sao Paulo)*, 67, 437-41.
- BADGWELL, D. & BAST, R. C., JR. (2007) Early detection of ovarian cancer. *Dis Markers*, 23, 397-410.
- BAFNA, S., KAUR, S. & BATRA, S. K. (2010) Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene*, 29, 2893-904.
- BALZER, J., MEERPOHL, H.-G., BAHNSEN, J., SCHUTH, W., ULSSENHEIMER, K. & DELBRÜCK, H. (2000) Spezielle Krankheitsbilder. IN BALTZER, J., MEERPOHL, H.-G. & BAHNSEN, J. (Eds.) *Praxis der Frauenheilkunde, Band III: Praxis der gynäkologischen Onkologie*. Stuttgart; New York, Georg Thieme verlag.
- BAST, R. C., JR. (2004) Early detection of ovarian cancer: new technologies in pursuit of a disease that is neither common nor rare. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 115, 233-47; discussion 247-8.
- BAST, R. C., JR., BADGWELL, D., LU, Z., MARQUEZ, R., ROSEN, D., LIU, J., BAGGERLY, K. A., ATKINSON, E. N., SKATES, S., ZHANG, Z., LOKSHIN, A., MENON, U., JACOBS, I. & LU, K. (2005) New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer*, 15 Suppl 3, 274-81.
- BELISLE, J. A., GUBBELS, J. A., RAPHAEL, C. A., MIGNEAULT, M., RANCOURT, C., CONNOR, J. P. & PATANKAR, M. S. (2007) Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125). *Immunology*, 122, 418-29.
- BINGLE, L., SINGLETON, V. & BINGLE, C. D. (2002) The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene*, 21, 2768-73.
- BUCHWALOW, I., KÖHLER, G., BÖCKER, W. & DOMAGK, G. (2006) Labormethoden-Immunhistochemie für Forschung und diagnostische Pathologie. IN RAEM, A. M. & RAUCH, P. (Eds.) *Immunoassays*. Heidelberg, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.
- BURGES, A. & SCHMALFELDT, B. (2011) Ovarian Cancer: Diagnosis and Treatment. *Dtsch Arztebl*, 108, 635-41.
- CALIFICE, S., CASTRONOVO, V., BRACKE, M. & VAN DEN BRULE, F. (2004a) Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene*, 23, 7527-36.
- CALIFICE, S., CASTRONOVO, V. & VAN DEN BRULE, F. (2004b) Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol*, 25, 983-92.

- CAMBY, I., LE MERCIER, M., LEFRANC, F. & KISS, R. (2006) Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, 16, 137R-157R.
- CASTRONOVO, V., VAN DEN BRULE, F. A., JACKERS, P., CLAUSSE, N., LIU, F. T., GILLET, C. & SOBEL, M. E. (1996) Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol*, 179, 43-8.
- DE OLIVEIRA, J. T., DE MATOS, A. J., GOMES, J., VILANOVA, M., HESPANHOL, V., MANNINEN, A., RUTTEMAN, G., CHAMMAS, R., GARTNER, F. & BERNARDES, E. S. (2010) Coordinated expression of galectin-3 and galectin-3-binding sites in malignant mammary tumors: implications for tumor metastasis. *Glycobiology*, 20, 1341-52.
- DEMETRIOU, M., GRANOVSKY, M., QUAGGIN, S. & DENNIS, J. W. (2001) Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*, 409, 733-9.
- DEVINE, P. L. & MCKENZIE, I. F. (1992) Mucins: structure, function, and associations with malignancy. *Bioessays*, 14, 619-25.
- DEVOUASSOUX-SHISHEBORAN, M., DESCHILDRE, C., MAUDUIT, C., BERGER, G., MEJEAN-LEBRETON, F., BOUVIER, R., DROZ, J. P., FENICHEL, P. & BENAHMED, M. (2006) Expression of galectin-3 in gonads and gonadal sex cord stromal and germ cell tumors. *Oncol Rep*, 16, 335-40.
- DIEBOLD, J., DETTMAR, P. & NÄHRIG, J. (2007) Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung. IN TUMORZENTRUM-MÜNCHEN (Ed.) *MANUAL: Maligne Ovarialtumoren*. München, Zuckschwerdt Verlag.
- DRAPKIN, R., VON HORSTEN, H. H., LIN, Y., MOK, S. C., CRUM, C. P., WELCH, W. R. & HECHT, J. L. (2005) Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res*, 65, 2162-9.
- DUMONT, P., BERTON, A., NAGY, N., SANDRAS, F., TINTON, S., DEMETTER, P., MASCART, F., ALLAOUI, A., DECAESTECKER, C. & SALMON, I. (2008) Expression of galectin-3 in the tumor immune response in colon cancer. *Lab Invest*, 88, 896-906.
- DUNN, G. P., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21, 137-48.
- ENGEL, J., HÖLSCHER, G. & SCHUBERT-FRITSCHLE, G. (2007) Epidemiologie maligner Ovarialtumoren. IN TUMORZENTRUM-MÜNCHEN (Ed.) *MANUAL Maligne Ovarialtumoren*. München W Zuckschwerdt Verlag.
- FAYED, S. T., AHMAD, S. M., KASSIM, S. K. & KHALIFA, A. (1998) The value of CA 125 and CA72-4 in management of patients with epithelial ovarian cancer. *Dis Markers*, 14, 155-60.
- FISCHER, I., SCHULZE, S., KUHN, C., FRIESE, K., WALZEL, H., MARKERT, U. R. & JESCHKE, U. (2009) Inhibition of RET and JAK2 signals and upregulation of VEGFR3 phosphorylation in vitro by galectin-1 in trophoblast tumor cells BeWo. *Placenta*, 30, 1078-82.
- FITZGERALD, J. S., GERMAYER, A., HUPPERTZ, B., JESCHKE, U., KNOFLER, M., MOSER, G., SCHOLZ, C., SONDEREGGER, S., TOTH, B. & MARKERT, U. R. (2010) Governing the invasive trophoblast: current aspects on intra- and extracellular regulation. *Am J Reprod Immunol*, 63, 492-505.
- FRASER, C. K., BROWN, M. P., DIENER, K. R. & HAYBALL, J. D. (2010) Unravelling the complexity of cancer-immune system interplay. *Expert Rev Anticancer Ther*, 10, 917-34.

- GADDUCCI, A., COSIO, S., CARPI, A., NICOLINI, A. & GENAZZANI, A. R. (2004) Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomed Pharmacother*, 58, 24-38.
- GADDUCCI, A., FERDEGHINI, M., PRONTERA, C., MORETTI, L., MARIANI, G., BIANCHI, R. & FIORETTI, P. (1992) The concomitant determination of different tumor markers in patients with epithelial ovarian cancer and benign ovarian masses: relevance for differential diagnosis. *Gynecol Oncol*, 44, 147-54.
- GALGANO, M. T., HAMPTON, G. M. & FRIERSON, H. F., JR. (2006) Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol*, 19, 847-53.
- GALLUP, D. G. & TALLEDO, E. (1997) Management of the adnexal mass in the 1990s. *South Med J*, 90, 972-81.
- GENDLER, S. J. & SPICER, A. P. (1995) Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol*, 57, 607-34.
- GOODELL, C. A., BELISLE, J. A., GUBBELS, J. A., MIGNEAULT, M., RANCOURT, C., CONNOR, J., KUNNIMALAIYAAN, M., KRAVITZ, R., TUCKER, W., ZWICK, M. & PATANKAR, M. S. (2009) Characterization of the tumor marker muc16 (ca125) expressed by murine ovarian tumor cell lines and identification of a panel of cross-reactive monoclonal antibodies. *J Ovarian Res*, 2, 8.
- GRANATO, T., MIDULLA, C., LONGO, F., COLAPRISCA, B., FRATI, L. & ANASTASI, E. (2012) Role of HE4, CA72.4, and CA125 in monitoring ovarian cancer. *Tumour Biol*.
- GUADAGNI, F., ROSELLI, M., AMATO, T., COSIMELLI, M., PERRI, P., CASALE, V., CARLINI, M., SANTORO, E., CAVALIERE, R., GREINER, J. W. & ET AL. (1992) CA 72-4 measurement of tumor-associated glycoprotein 72 (TAG-72) as a serum marker in the management of gastric carcinoma. *Cancer Res*, 52, 1222-7.
- GUADAGNI, F., ROSELLI, M., COSIMELLI, M., FERRONI, P., SPILA, A., CAVALIERE, F., CASALDI, V., WAPPNER, G., ABBOLITO, M. R., GREINER, J. W. & ET AL. (1995) CA 72-4 serum marker-a new tool in the management of carcinoma patients. *Cancer Invest*, 13, 227-38.
- GUBBELS, J. A., FELDER, M., HORIBATA, S., BELISLE, J. A., KAPUR, A., HOLDEN, H., PETRIE, S., MIGNEAULT, M., RANCOURT, C., CONNOR, J. P. & PATANKAR, M. S. (2010) MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells. *Mol Cancer*, 9, 11.
- HAREYAMA, H., SAKURAGI, N., MAKINODA, S. & FUJIMOTO, S. (1996) Serum and tissue measurements of CA72-4 in patients with endometrial carcinoma. *J Clin Pathol*, 49, 967-70.
- HASHOLZNER, U., BAUMGARTNER, L., STIEBER, P., MEIER, W., REITER, W., PAHL, H. & FATEH-MOGHADAM, A. (1996) Clinical significance of the tumour markers CA 125 II and CA 72-4 in ovarian carcinoma. *Int J Cancer*, 69, 329-34.
- HAVRILESKY, L. J., WHITEHEAD, C. M., RUBATT, J. M., CHEEK, R. L., GROELKE, J., HE, Q., MALINOWSKI, D. P., FISCHER, T. J. & BERCHUCK, A. (2008) Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence. *Gynecol Oncol*, 110, 374-82.
- HELLSTROM, I., HEAGERTY, P. J., SWISHER, E. M., LIU, P., JAFFAR, J., AGNEW, K. & HELLSTROM, K. E. (2010) Detection of the HE4 protein in urine as a biomarker for ovarian neoplasms. *Cancer Lett*, 296, 43-8.
- HELLSTROM, I., RAYCRAFT, J., HAYDEN-LEDBETTER, M., LEDBETTER, J. A., SCHUMMER, M., MCINTOSH, M., DRESCHER, C., URBAN, N. &

- HELLSTROM, K. E. (2003) The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 63, 3695-700.
- HENDERSON, N. C. & SETHI, T. (2009) The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev*, 230, 160-71.
- HENNESSY, B. T., COLEMAN, R. L. & MARKMAN, M. (2009) Ovarian cancer. *Lancet*, 374, 1371-82.
- HILPERT, F., KRAUSE, G., VENHOFF, L., KUHNLE, E., SCHEM, C. & MAASS, N. (2007) [Epithelial ovarian cancer]. *Ther Umsch*, 64, 375-80.
- HITTELET, A., LEGENDRE, H., NAGY, N., BRONCKART, Y., PECTOR, J. C., SALMON, I., YEATON, P., GABIUS, H. J., KISS, R. & CAMBY, I. (2003) Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. *Int J Cancer*, 103, 370-9.
- HUSSEINZADEH, N. (2010) Status of tumor markers in epithelial ovarian cancer has there been any progress? A review. *Gynecol Oncol*.
- INOHARA, H., SEGAWA, T., MIYAUCHI, A., YOSHII, T., NAKAHARA, S., RAZ, A., MAEDA, M., MIYOSHI, E., KINOSHITA, N., YOSHIDA, H., FURUKAWA, M., TAKENAKA, Y., TAKAMURA, Y., ITO, Y. & TANIGUCHI, N. (2008) Cytoplasmic and serum galectin-3 in diagnosis of thyroid malignancies. *Biochem Biophys Res Commun*, 376, 605-10.
- IURISCI, I., TINARI, N., NATOLI, C., ANGELUCCI, D., CIANCHETTI, E. & IACOBELLI, S. (2000) Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res*, 6, 1389-93.
- JACOBS, I., ORAM, D., FAIRBANKS, J., TURNER, J., FROST, C. & GRUDZINSKAS, J. G. (1990) A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol*, 97, 922-9.
- JUNG, E. J., MOON, H. G., CHO, B. I., JEONG, C. Y., JOO, Y. T., LEE, Y. J., HONG, S. C., CHOI, S. K., HA, W. S., KIM, J. W., LEE, C. W., LEE, J. S. & PARK, S. T. (2007) Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer*, 120, 2331-8.
- KEY, G. (2006) Labormethoden-ELISA/EIA/FIA. IN RAEM, A. M. & RAUCH, P. (Eds.) *Immunoassays*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- KIM, H. J., JEON, H. K., CHO, Y. J., PARK, Y. A., CHOI, J. J., DO, I. G., SONG, S. Y., LEE, Y. Y., CHOI, C. H., KIM, T. J., BAE, D. S., LEE, J. W. & KIM, B. G. (2012) High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion. *Eur J Cancer*.
- KIM, M. K., SUNG, C. O., DO, I. G., JEON, H. K., SONG, T. J., PARK, H. S., LEE, Y. Y., KIM, B. G., LEE, J. W. & BAE, D. S. (2011) Overexpression of Galectin-3 and its clinical significance in ovarian carcinoma. *Int J Clin Oncol*, 16, 352-8.
- KIRCHHOFF, C., HABBEN, I., IVELL, R. & KRULL, N. (1991) A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod*, 45, 350-7.
- KOBEL, M., KALLOGER, S. E., BOYD, N., MCKINNEY, S., MEHL, E., PALMER, C., LEUNG, S., BOWEN, N. J., IONESCU, D. N., RAJPUT, A., PRENTICE, L. M., MILLER, D., SANTOS, J., SWENERTON, K., GILKS, C. B. & HUNTSMAN, D. (2008) Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med*, 5, e232.
- KOHNENHAGEN, N., VOELKER, H. U., KAPP, M., DIETL, J. & KAMMERER, U. (2010) The expression of galectin-1 in vulvar neoplasia. *Anticancer Res*, 30, 1547-52.

- KOHRENHAGEN, N., VOLKER, H. U., KAPP, M., DIETL, J. & KAMMERER, U. (2006) Increased expression of galectin-1 during the progression of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*, 16, 2018-22.
- KOMMOSS, F. (2009) Pathologie. IN DU BOIS, A., PFISTERER, J., SCHINDELMANN, S. & SCHMALFELDT, B. (Eds.) *Management des Ovarialkarzinoms*. Heidelberg, Springer Verlag.
- KRAMER, M. W., KUCZYK, M. A., HENNENLOTTER, J., SERTH, J., SCHILLING, D., STENZL, A. & MERSEBURGER, A. S. (2008) Decreased expression of galectin-3 predicts tumour recurrence in pTa bladder cancer. *Oncol Rep*, 20, 1403-8.
- KREIENBERG, R. (2009) Allgemeine Therapiekonzepte, Indikationsstellungen. IN DU BOIS, A., PFISTERER, J., SCHINDELMANN, S. & SCHMALFELDT, B. (Eds.) *Management des Ovarialkarzinoms*. Heidelberg, Springer verlag.
- KREIENBERG, R., CROMBACH, G. & MEIER, W. (1999) Tumormarker: Auswahl, Grenzen, Relevanz und sinnvoller Einsatz in der Klinik. IN BENDER, H. G. (Ed.) *Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Band 10: Allgemeine gynäkologische Onkologie*. München, Urban und Schwarzenberg.
- KRZESLAK, A. & LIPINSKA, A. (2004) Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett*, 9, 305-28.
- KUNDT, G., KRENTZ, H. & GLASS, Ä. (2010) *Epidemiologie und Medizinische Biometrie*, Aachen, Shaker Verlag.
- KUSCHEL, B., PFEIFER, K., ANTHUBER, C. & KIECHLE, M. (2007) Hereditäres Ovarialkarzinom. IN TUMORZENTRUM-MÜNCHEN (Ed.) *MANUAL: Maligne Ovarialtumoren*. München, Zuckschwerdt Verlag
- LIU, F. T. & RABINOVICH, G. A. (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 5, 29-41.
- LIU, F. T. & RABINOVICH, G. A. (2010) Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 1183, 158-82.
- LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M. & MYRTEK, D. (2006) *Der Experimentator: Immunologie*, München, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.
- MAHNER, S., SCHWARZ, J. & JÄNICKE, F. (2009a) Früherkennung, Vorsorge und Prophylaxe. IN DU BOIS, A., PFISTERER, J., SCHINDELMANN, S. & SCHMALFELDT, B. (Eds.) *Management des Ovarialkarzinoms*. Heidelberg, Springer Verlag.
- MAHNER, S., SCHWARZ, J. & JÄNICKE, F. (2009b) Prognosefaktoren. IN DU BOIS, A., PFISTERER, J., SCHINDELMANN, S. & SCHMALFELDT, B. (Eds.) *Management des Ovarialkarzinoms*. Heidelberg, Springer Verlag.
- MAYR, D. & DIEBOLD, J. (2000) Grading of ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol*, 19, 348-53.
- MEIER, W. (1997) Sinnvoller Einsatz der Tumormarker bei Ovarialkarzinomen. *Der Gynäkologe*, 30, 133-40.
- MENON, U., GENTRY-MAHARAJ, A., HALLETT, R., RYAN, A., BURNELL, M., SHARMA, A., LEWIS, S., DAVIES, S., PHILPOTT, S., LOPES, A., GODFREY, K., ORAM, D., HEROD, J., WILLIAMSON, K., SEIF, M. W., SCOTT, I., MOULD, T., WOOLAS, R., MURDOCH, J., DOBBS, S., AMSO, N. N., LEESON, S., CRUICKSHANK, D., MCGUIRE, A., CAMPBELL, S., FALLOWFIELD, L., SINGH, N., DAWNAY, A., SKATES, S. J., PARMAR, M. & JACOBS, I. (2009) Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Lancet Oncol*, 10, 327-40.

- MENON, U. & JACOBS, I. J. (2000) Recent developments in ovarian cancer screening. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 12, 39-42.
- MERSEBURGER, A. S., KRAMER, M. W., HENNENLOTTER, J., SERTH, J., KRUCK, S., GRACIA, A., STENZL, A. & KUCZYK, M. A. (2008a) Loss of galectin-3 expression correlates with clear cell renal carcinoma progression and reduced survival. *World J Urol*, 26, 637-42.
- MERSEBURGER, A. S., KRAMER, M. W., HENNENLOTTER, J., SIMON, P., KNAPP, J., HARTMANN, J. T., STENZL, A., SERTH, J. & KUCZYK, M. A. (2008b) Involvement of decreased Galectin-3 expression in the pathogenesis and progression of prostate cancer. *Prostate*, 68, 72-7.
- MILOJKOVIC, M., HRGOVIC, Z., HRGOVIC, I., JONAT, W., MAASS, N. & BUKOVIC, D. (2004) Significance of CA 125 serum level in discrimination between benign and malignant masses in the pelvis. *Arch Gynecol Obstet*, 269, 176-80.
- MOLINA, R., ESCUDERO, J. M., AUGÉ, J. M., FILELLA, X., FOJ, L., TORNE, A., LEJARCEGUI, J. & PAHISA, J. HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases. *Tumour Biol*, 32, 1087-95.
- MONTAGNANA, M., LIPPI, G., RUZZENENTE, O., BRESCIANI, V., DANESE, E., SCEVAROLLI, S., SALVAGNO, G. L., GIUDICI, S., FRANCHI, M. & GUIDI, G. C. (2009) The utility of serum human epididymis protein 4 (HE4) in patients with a pelvic mass. *J Clin Lab Anal*, 23, 331-5.
- MOORE, R. G., BROWN, A. K., MILLER, M. C., SKATES, S., ALLARD, W. J., VERCH, T., STEINHOFF, M., MESSERLIAN, G., DISILVESTRO, P., GRANAI, C. O. & BAST, R. C., JR. (2008) The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol*, 108, 402-8.
- MOORE, R. G., JABRE-RAUGHLEY, M., BROWN, A. K., ROBISON, K. M., MILLER, M. C., ALLARD, W. J., KURMAN, R. J., BAST, R. C. & SKATES, S. J. (2010a) Comparison of a novel multiple marker assay vs the Risk of Malignancy Index for the prediction of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Am J Obstet Gynecol*.
- MOORE, R. G., MACLAUGHLAN, S. & BAST, R. C., JR. (2010b) Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 116, 240-5.
- MOORE, R. G., MCMEEKIN, D. S., BROWN, A. K., DISILVESTRO, P., MILLER, M. C., ALLARD, W. J., GAJEWSKI, W., KURMAN, R., BAST, R. C., JR. & SKATES, S. J. (2009) A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol*, 112, 40-6.
- MOTRAN, C. C., MOLINDER, K. M., LIU, S. D., POIRIER, F. & MICELI, M. C. (2008) Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function. *Eur J Immunol*, 38, 3015-27.
- NAKAHARA, S., OKA, N. & RAZ, A. (2005) On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*, 10, 267-75.
- NEGISHI, Y., IWABUCHI, H., SAKUNAGA, H., SAKAMOTO, M., OKABE, K., SATO, H. & ASANO, G. (1993) Serum and tissue measurements of CA72-4 in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol*, 48, 148-54.
- NOLEN, B., VELIKOKHATNAYA, L., MARRANGONI, A., DE GEEST, K., LOMAKIN, A., BAST, R. C., JR. & LOKSHIN, A. (2010) Serum biomarker panels for the discrimination of benign from malignant cases in patients with an adnexal mass. *Gynecol Oncol*, 117, 440-5.

- NOLL, S. & SCHAUB-KUHNEN, S. (2002) *Praxis der Immunhistochemie*, München, Jena, Urban & Fischer.
- PATANKAR, M. S., JING, Y., MORRISON, J. C., BELISLE, J. A., LATTANZIO, F. A., DENG, Y., WONG, N. K., MORRIS, H. R., DELL, A. & CLARK, G. F. (2005) Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecol Oncol*, 99, 704-13.
- PERILLO, N. L., MARCUS, M. E. & BAUM, L. G. (1998) Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med*, 76, 402-12.
- PERILLO, N. L., PACE, K. E., SEILHAMER, J. J. & BAUM, L. G. (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378, 736-9.
- PONNUSAMY, M. P., VENKATRAMAN, G., SINGH, A. P., CHAUHAN, S. C., JOHANSSON, S. L., JAIN, M., SMITH, L., DAVIS, J. S., REMMENGA, S. W. & BATRA, S. K. (2007) Expression of TAG-72 in ovarian cancer and its correlation with tumor stage and patient prognosis. *Cancer Lett*, 251, 247-57.
- REMMELE, W. & STEGNER, H. E. (1987) [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8, 138-40.
- RODRIGUEZ-VITA, J. & LAWRENCE, T. (2010) The resolution of inflammation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21, 61-5.
- ROSEN, D. G., WANG, L., ATKINSON, J. N., YU, Y., LU, K. H., DIAMANDIS, E. P., HELLSTROM, I., MOK, S. C., LIU, J. & BAST, R. C., JR. (2005) Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 99, 267-77.
- RUNNEBAUM, I. B. (2009) Molekularbiologie und Tumorenstehung. IN DU BOIS, A., PFISTERER, J., SCHINDELMANN, S. & SCHMALFELDT, B. (Eds.) *Management des Ovarialkarzinoms*. Heidelberg, Springer Verlag.
- SAKAKI, M., OKA, N., NAKANISHI, R., YAMAGUCHI, K., FUKUMORI, T. & KANAYAMA, H. O. (2008) Serum level of galectin-3 in human bladder cancer. *J Med Invest*, 55, 127-32.
- SANJUAN, X., FERNANDEZ, P. L., CASTELLS, A., CASTRONOVO, V., VAN DEN BRULE, F., LIU, F. T., CARDESA, A. & CAMPO, E. (1997) Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology*, 113, 1906-15.
- SAUSSEZ, S., GLINOER, D., CHANTRAIN, G., PATTOU, F., CARNAILLE, B., ANDRE, S., GABIUS, H. J. & LAURENT, G. (2008a) Serum galectin-1 and galectin-3 levels in benign and malignant nodular thyroid disease. *Thyroid*, 18, 705-12.
- SAUSSEZ, S., LORFEVRE, F., LEQUEUX, T., LAURENT, G., CHANTRAIN, G., VERTONGEN, F., TOUBEAU, G., DECAESTECKER, C. & KISS, R. (2008b) The determination of the levels of circulating galectin-1 and -3 in HNSCC patients could be used to monitor tumor progression and/or responses to therapy. *Oral Oncol*, 44, 86-93.
- SCHELLING, M., ANTHUBER, C., BURGESS, A., GRISCHKE, E. M., REIF, J., STIEBER, P. & STRAUSS, A. (2007) Früherkennung und Diagnostik. IN TUMORZENTRUM-MÜNCHEN (Ed.) *MANUAL: Maligne Ovarialtumoren*. München, Zuckschwerdt Verlag.
- SCHMALFELDT, B., BURGESS, A., DIEBOLD, J. & HARBECK, N. (2007) Prognostische und prädiktive Faktoren. IN SCHMALFELDT, B. & MÜNCHEN, T. (Eds.) *MANUAL Maligne Ovarialtumoren*. 8 ed. München, W. Zuckschwerdt Verlag.
- SCHNEIDER, P., MEYR, M., SCHMUTZER, R. & THAMM, P. (2006) Troubleshooting bei der professionellen Entwicklung und Durchführung von ELISAs. IN RAEM, A. M.

- & RAUCH, P. (Eds.) *Immunoassays*. Heidelberg, Elsevier-Spektrum Akademischer Verlag
- SCHOLLER, N., CRAWFORD, M., SATO, A., DRESCHER, C. W., O'BRIANT, K. C., KIVIAT, N., ANDERSON, G. L. & URBAN, N. (2006) Bead-based ELISA for validation of ovarian cancer early detection markers. *Clin Cancer Res*, 12, 2117-24.
- SCHOLLER, N. & URBAN, N. (2007) CA125 in ovarian cancer. *Biomark Med*, 1, 513-23.
- SCHORGE, J. O., MODESITT, S. C., COLEMAN, R. L., COHN, D. E., KAUFF, N. D., DUSKA, L. R. & HERZOG, T. J. (2010) SGO White Paper on ovarian cancer: etiology, screening and surveillance. *Gynecol Oncol*, 119, 7-17.
- SCHUHMACHER, A. L. (2008) Nachweis von bekannten und neuen Tumormarkern im Serum von Patientinnen mit Ovarialkarzinom und benignen Erkrankungen des Ovars. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- SCHUTTER, E. M., DAVELAAR, E. M., VAN KAMP, G. J., VERSTRAETEN, R. A., KENEMANS, P. & VERHEIJEN, R. H. (2002) The differential diagnostic potential of a panel of tumor markers (CA 125, CA 15-3, and CA 72-4 antigens) in patients with a pelvic mass. *Am J Obstet Gynecol*, 187, 385-92.
- SEELLENMEYER, C., WEGEHINGEL, S., LECHNER, J. & NICKEL, W. (2003) The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for galectin-1. *J Cell Sci*, 116, 1305-18.
- SKATES, S. J., MENON, U., MACDONALD, N., ROSENTHAL, A. N., ORAM, D. H., KNAPP, R. C. & JACOBS, I. J. (2003) Calculation of the risk of ovarian cancer from serial CA-125 values for preclinical detection in postmenopausal women. *J Clin Oncol*, 21, 206s-210s.
- SPANO, D., RUSSO, R., DI MASO, V., ROSSO, N., TERRACCIANO, L. M., RONCALLI, M., TORNILLO, L., CAPASSO, M., TIRIBELLI, C. & IOLASCON, A. (2009) Galectin-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma aggressiveness. *Mol Med*, 16, 102-15.
- STIEBER, P. (2010) Tumormarker in der Diagnostik. IN HIDDEMANN, W. & BARTRAM, C. (Eds.) *Die Onkologie Teil 1*. Heidelberg, Springer Verlag.
- STRICKER, T. & KUMAR, V. (2010) Neoplasia. IN KUMAR, V., A., A., FAUSTO, N. & ASTER, J. (Eds.) *Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia, Saunders Elsevier.
- VAN DEN BRULE, F., CALIFICE, S. & CASTRONOVO, V. (2004) Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J*, 19, 537-42.
- VAN DEN BRULE, F., CALIFICE, S., GARNIER, F., FERNANDEZ, P. L., BERCHUCK, A. & CASTRONOVO, V. (2003) Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. *Lab Invest*, 83, 377-86.
- VAN DEN BRULE, F. A., BERCHUCK, A., BAST, R. C., LIU, F. T., GILLET, C., SOBEL, M. E. & CASTRONOVO, V. (1994) Differential expression of the 67-kD laminin receptor and 31-kD human laminin-binding protein in human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer*, 30A, 1096-9.
- VAN DEN BRULE, F. A., BUICU, C., BERCHUCK, A., BAST, R. C., DEPREZ, M., LIU, F. T., COOPER, D. N., PIETERS, C., SOBEL, M. E. & CASTRONOVO, V. (1996) Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. *Hum Pathol*, 27, 1185-91.
- VAN DEN BRULE, F. A., WALTREGNY, D. & CASTRONOVO, V. (2001) Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J Pathol*, 193, 80-7.

- VEREECKEN, P. & HEENEN, M. (2006) Serum galectin-3 in advanced melanoma patients: a hypothesis on a possible role in melanoma progression and inflammation. *J Int Med Res*, 34, 119-20.
- VEREECKEN, P., ZOUAOUI BOUDJELTIA, K., DEBRAY, C., AWADA, A., LEGSSYER, I., SALES, F., PETEIN, M., VANHAEVERBEEK, M., GHANEM, G. & HEENEN, M. (2006) High serum galectin-3 in advanced melanoma: preliminary results. *Clin Exp Dermatol*, 31, 105-9.
- VERNOOIJ, F., HEINTZ, P., WITTEVEEN, E. & VAN DER GRAAF, Y. (2007) The outcomes of ovarian cancer treatment are better when provided by gynecologic oncologists and in specialized hospitals: a systematic review. *Gynecol Oncol*, 105, 801-12.
- WAALKES, S., MERSEBURGER, A. S., SIMON, A., SERTH, J. & KUCZYK, M. A. (2010) [Galectin expression in urological cancer. Diagnostic, prognostic and therapeutic potential]. *Urologe A*, 49, 387-91.
- WANG, Y., NANGIA-MAKKER, P., TAIT, L., BALAN, V., HOGAN, V., PIENTA, K. J. & RAZ, A. (2009) Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. *Am J Pathol*, 174, 1515-23.
- WEIß, C. (2010) Basiswissen Medizinische Statistik. Springer Verlag, Heidelberg.
- WU, M. H., HONG, T. M., CHENG, H. W., PAN, S. H., LIANG, Y. R., HONG, H. C., CHIANG, W. F., WONG, T. Y., SHIEH, D. B., SHIAU, A. L., JIN, Y. T. & CHEN, Y. L. (2009) Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res*, 7, 311-8.
- XIE, L., NI, W. K., CHEN, X. D., XIAO, M. B., CHEN, B. Y., HE, S., LU, C. H., LI, X. Y., JIANG, F. & NI, R. Z. (2012) The expressions and clinical significances of tissue and serum galectin-3 in pancreatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138, 1035-43.
- YIN, B. W. & LLOYD, K. O. (2001) Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*, 276, 27371-5.
- ZEIMET, A. G., GUADAGNI, F., MARTH, C., AMATO, T., MULLER-HOLZNER, E., HUTER, O., DAXENBICHLER, G. & DAPUNT, O. (1995) [Value of the TAG-72 (CA 72-4) tumor marker in primary diagnosis of ovarian carcinoma. A comparison with the established CA-125 marker]. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 55, 195-9.
- ZHAO, Q., GUO, X., NASH, G. B., STONE, P. C., HILKENS, J., RHODES, J. M. & YU, L. G. (2009) Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface. *Cancer Res*, 69, 6799-806.

7. Verwendete Abkürzungen

Arg	die Aminosäure Arginin
Asn	die Aminosäure Asparagin
AUC	Area Under Curve, Fläche unter einer ROC- Kurve
Bcl2	Das proto-Onkogen B-cell-lymphoma-2
BRCA1/BRACA2	„Breast Cancer 1/Breast Cancer 2 susceptibility protein“
BSA	Bovines Serumalbumin
CA 125	Cancer Antigen 125
CA 72-4	Cancer Antigen 72-4
CA-19-9	Cancer Antigen 19-9
CD z.B. CD45	Cluster of Differentiation („Unterscheidungsgruppen“) 45
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
CRD	Carbohydrate Recognition Domain („Kohlenhydrat Erkennungsdomäne“)
DAB	3,3 Diaminobenzidin
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme linked immunosorbend Assay
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique („Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde“)
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gly	die Aminosäure Glycin
HAMA	humane-Anti-Maus-Antikörper
HE4	Human Epididymis Specific Protein 4
HNPCC	„Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer“, deutsch hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HRP	horseradish peroxidase („Meerrettich-Peroxidase“)
IRS-Score	Immunoreactive Score („Immunreaktiver Score“)
kD	kiloDalton

KI	Konfidenzintervall
LacNac	N-Acetylactosamine
LAMP	Lysosom-assoziierten Membranproteine
LH	Luteinisierendes Hormon
LMP-Tumor	Low-malignant-Potency-Tumoren, auch Borderline-Tumoren
MUC 16	Muzin 16
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
OD	optische Dichte
PCOS	Polycystisches Ovarsyndrom
PIA	Partikel-Immunoassay
pM	picoMol
PMP	Photo multiplier Tube
RMI	Risk-of-Malignancy-Index
ROC-Algorithmus	Risk-of-Ovarian-Malignancy-Algorithm
ROC-Kurve	Receiver Operating Statistics-Kurve
ROMA	Risk-of-Ovarian-Malignancy-Algorithm
siRNA	Small interfering RNA
SRP	Signalerkennungspartikel
TAG 72	Tumor-Assoziiertes Glykoprotein 72, andere Bezeichnung für CA 72-4
TCR	T Cell Receptor („T-Zell-Rezeptor“)
Th ₁ -Zellen/Th ₂ -Zellen	T-Helfer-1-Zellen/T-Helfer-2-Zellen
TMB	Tetramethylbenzidin
TNM-System	System zur Klassifikation maligner Tumoren, wobei T für Tumor, N für Nodus (Lymphknoten) und M für Metastasen steht
Trp	die Aminosäure Tryptophan
U/l	Units pro Liter
Wap	Whey acidic protein
WFDC 2	Wap four disulfide core 2, andere Bezeichnung für HE4

8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

8.1 Abbildungen

Abbildung	Inhalt
2.1	Überblick zur Verteilung des histologischen Typs aller ermittelten malignen histologischen Befunde des Kollektivs I
2.2	Überblick zur Verteilung des histologischen Typs aller ermittelten benignen histologischen Befunde des Kollektivs I
2.3	Überblick zur Verteilung des histologischen Typs aller ermittelten malignen histologischen Befunde des Kollektivs II
2.4	Überblick zur Verteilung des histologischen Typs aller ermittelten benignen histologischen Befunde des Kollektivs II
2.5	Anordnung der in den verschiedenen Schritten aufgetragenen Komponenten beim Sandwich-Assay, verändert nach Key, 2006, S. 54
2.6	Schema der ABC-Methode. Aus: Noll and Schaub-Kuhnen, 2002, S. 17-18
3.1	BoxPlot Diagramm (logarithmiert) zur Darstellung der CA 125 Konzentration (U/ml) im Serum von Patientinnen mit benignen und malignen Erkrankungen der Ovarien
3.2	ROC-Kurve für CA 125
3.3	BoxPlot Diagramm (logarithmiert) zur Darstellung der CA 72-4 Konzentration (U/ml) im Serum von Patientinnen mit benignen und malignen Erkrankungen der Ovarien
3.4	ROC-Kurve für CA 72-4
3.5	BoxPlot Diagramm zur Darstellung der HE4-Konzentration (pM) im Serum von Patientinnen mit benignen und malignen Erkrankungen der Ovarien
3.6	ROC-Kurve für HE4

3.7	BoxPlot Diagramm zur Darstellung der Mouse-Galektin-1 Konzentration (pg/ml) im Serum von Patientinnen mit benignen und malignen Erkrankungen der Ovarien
3.8	ROC-Kurve für Mouse-Galektin-1
3.9	BoxPlot Diagramm (logarithmiert) zur Darstellung der Galektin-3-Konzentration (ng/ml) im Serum von Patientinnen mit benignen und malignen Erkrankungen der Ovarien
3.10	ROC-Kurve für Galektin-3
3.11	BoxPlot Diagramm zur Darstellung der Konzentrationen der Marker CA 125 (U/ml), CA 72-4 (U/ml), Galektin-3 (ng/ml), Mouse-Galektin-1 (pg/ml) und HE4 (pM) im Serum von Patientinnen und malignen und benignen Erkrankungen des Ovars
3.12	Übersicht über die ROC-Kurven aller ermittelten Biomarker
3.13	Zweierkombination von Biomarkern und ihre Flächen unter ROC-Kurve (AUC)
3.14	BoxPlot Diagramm zur Darstellung der Galektin-1 Expression im tumorösen Teil kanzerös und benigne veränderter Ovarien
3.15	BoxPlot Diagramm zur Darstellung der Galektin-1 Expression im Stroma von Ovarien mit einer kanzerösen bzw. mit einer benignen Veränderung.
3.16	Expression von Galektin-1 in einem rezidierten epithelialen Ovarialkarzinom bei 100facher Vergrößerung
3.17	Expression von Galektin-1 in einem serös-papillären Adenokarzinom bei 200facher Vergrößerung
3.18	Boxplot Diagramm zur Darstellung der Galektin-3-Expression im Tumor der teils kanzerös, teils benigne veränderten Ovarien
3.19	Boxplot Diagramm zur Darstellung der Galektin-3-Expression im Stroma von Ovarien mit einer kanzerösen

	bzw. mit einer benignen Veränderung.
3.20	Expression von Galektin-3 in einem in einem serös-papillären Adenokarzinom bei 200facher Vergrößerung
3.21	Expression von Galektin-3 in einem muzinösen Zystadenom bei 200facher Vergrößerung
3.22	Boxplot Diagramm zur Darstellung der Expression von Galektin-1 und Galektin-3 im Tumor bzw. im peritumoralen Stroma

8.2 Tabellen

Tabelle	Inhalt
1.1	Übersicht über die Histologie der Ovarialtumoren nach Balzer et al., 2000, Diebold et al., 2007
2.1	Details der malignen Untersuchungsgruppe aus Kollektiv I
2.2	Details der benignen Untersuchungsgruppe aus Kollektiv I
2.3	Details der malignen Untersuchungsgruppe aus Kollektiv II
2.4	Details der benignen Untersuchungsgruppe aus Kollektiv II
3.1	Mittelwert und Median der CA 125-Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe
3.2	Mittlerer Rang der CA 125-Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe
3.3	Mittelwert und Median der CA 72-4-Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe
3.4	Mittlerer Rang der CA 72-4-Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe
3.5	Mittelwert und Median der HE4-Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe
3.6	Mittlerer Rang der HE4-Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe

3.7	Mittelwert und Median der Mouse-Galektin-1-Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe
3.8	Mittlerer Rang der Mouse-Galektin-1-Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe
3.9	Mittelwert und Median der Galektin-3-Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe
3.10	Mittlerer Rang der Galektin-3-Serumspiegel der benignen und malignen Patientinnengruppe
3.11	Sensitivitäten und Spezifitäten für die untersuchten Biomarker, bei maximaler Zahl richtig diagnostizierter Patientinnen
3.12	Sensitivitäten und der untersuchten Biomarker bei einer Spezifität von 95%, sowie AUCs
3.13	Korrelationen - alle ermittelten Werte (maligne und benigne) - des Patientinnenkollektivs I
3.14	Korrelationen - nur maligne Befunde - des Patientinnenkollektivs I
3.15	Mittelwert und Median der IRS-Scores der Galektin-1-Expression im tumorösen Anteil der benignen und malignen Veränderungen
3.16	Mittlerer Rang der IRS-Scores der Galektin-1-Expression im tumorösen Anteil der benignen und malignen Veränderungen
3.17	Mittelwert und Median der IRS-Scores der Galektin-1-Expression im peritumoralen Stroma
3.18	Mittlerer Rang der IRS-Scores der Galektin-1-Expression im peritumoralen Stroma
3.19	Mittelwert und Median der IRS-Scores der Galektin-3-Expression im tumorösen Anteil benignen und malignen Veränderungen
3.20	Mittlerer Rang der IRS-Scores der Galektin-3-Expression im tumorösen Anteil benignen und malignen

	Veränderungen
3.21	Mittelwert und Median der IRS-Scores der Galektin-3-Expression im peritumoralen Stroma
3.22	Mittlerer Rang der IRS-Scores der Galektin-3-Expression im peritumoralen Stroma
3.23	Korrelationen aller ermittelten Werte (maligne und benigne) des Patientinnenkollektiv II
3.24	Korrelation der benignen Befunde des Patientinnenkollektivs II

9. Danksagung

Es ist mir ein tiefes Bedürfnis, mich bei allen Menschen zu bedanken, die durch ihre großzügige Hilfe und ihren unermüdlichen Einsatz das Gelingen dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

An erster Stelle möchte ich hier meinen Betreuer, Herrn PD Dr. Christoph Scholz, nennen. Er hat mich an das vorliegende Thema herangeführt und es hervorragend verstanden, mich dafür zu begeistern. Meine Fortschritte hat er sowohl lobend als auch konstruktiv-kritisch begleitet. Ferner hat er mir während der unvermeidlichen Frustrationsphasen mit seiner freundlichen und professionellen Art zur Seite gestanden und dafür gesorgt, dass ich den Mut nicht habe sinken lassen. Ohne seine herausragende Betreuung wäre diese Arbeit nicht fertig gestellt worden. Dafür bin ich ihm sehr dankbar.

Zu größtem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke, meinem Doktorvater und Leiter des wissenschaftlichen Labors der Frauenklinik-Innenstadt der LMU. Er hat meine wissenschaftlichen Untersuchungen bestens begleitet und mir die Infrastruktur seines Labors zur Verfügung gestellt. Ohne seine Hilfe hätte die vorliegende Arbeit nicht entstehen können.

Im Zusammenhang mit meinen Labortätigkeiten gilt mein Dank auch Frau Christina Kuhn, die mich mit unermüdlicher Geduld in die Techniken des ELISA eingeführt hat, sowie Frau Susanne Kunze für die Färbung der histologischen Präparate. Ferner schulde ich allen Menschen, die diese einzigartige Abteilung geprägt sowie die gemeinschaftliche, konstruktive und aufrichtige Art des Arbeitens möglich gemacht haben, ganz besonderen Dank. Sie haben mich auf ihre ganz besondere Art und Weise immer wieder neu motiviert.

Herrn Rüdiger Laubender vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz bei der Auswertung meiner Daten. Seine Kompetenz hat meine Arbeit in herausragender Weise beeinflusst und erheblich zu ihrem Gelingen beigetragen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. Petra Stieber vom Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern für ihre Anregungen und konstruktive Kritik.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. Tobias Weissenbacher für seine konstruktive Kongressbegleitung.

In besonderer Weise dankbar bin ich ferner Frau Silvana Lauf für ihre zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen im Entstehungsprozess dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, meiner Schwester, Herrn Dr. Matthias Dominok und meinen Freunden, die mich immer wieder motiviert haben, diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

10. Vorabpublikationen

- 6/2009 Freydanck MK, Scholz C, Jeschke U, Kuhn C, Friese K. Quantifizierung von CA 125, CA 72-4, Galektin-3, HE4 und Galektin-1 in Seren von Patientinnen mit benignen und malignen Erkrankungen des Ovars. *Geburtsh Frauenheilk* 2009; 69: p.459
- Vorstellung eines Posters auf der Jahrestagung der OEGGG gemeinsam mit der Jahrestagung der BGGF in Wien.
- 9/2009 Exploratory analyses of two marker combinations for preoperative discrimination of benign and malignant ovarian diseases.
- Vorstellung eines gemeinsamen Posters durch R. Laubender auf dem 37th Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers ISOBM in Amsterdam.
- 6/2010 Zweier-Kombination von Biomarkern und ihre Relevanz für die Diagnostik und Früherkennung von Ovarialkarzinomen
- Vorstellung eines Posters auf der Jahrestagung der Bayerischen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe in Erlangen. Posterpreis in Silber.
- 10/2010 Maj Kristin Freydanck, Rüdiger Laubender, Christoph Scholz, Lan Schuhmacher, Klaus Friese. Relevance of two-marker combinations for discrimination of benign and malignant ovarian diseases. *Arch Gynecol Obstet* (2010) 282 (Suppl 1), p.202
- Vorstellung eines Posters auf dem 58. Kongress der DGGG in München.
- 5/2011 M. K. Freydanck, R. P. Laubender, P. Stieber, U. Jeschke and C. Scholz. Exploratory analyses of two marker combinations for preoperative discrimination of benign and malignant ovarian diseases. *Anticancer Res* 31:1957-2016 (2011), p.1972
- Vortrag auf dem 15. Internationalen Tumormarker-Symposium in Hamburg.
- 5/2012 Freydanck, MK, Laubender RP, Rack, B, Schuhmacher, L, Jeschke, U, Scholz, C. (2012). Two-marker Combinations for Preoperative Discrimination of Benign and Malignant Ovarian Masses. *Anticancer Res* 32(5): 2003-8.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

München, den 20.10.2013

Maj Kristin Freydanck