

Aus dem Institut für Pathologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann)

**Expressionsanalyse von Cyr61 und CTGF in den Borderline-Tumoren und
Karzinomen des Ovars**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Katharina Balschun, geb. Zeng
geboren am 07.11.1980 in Mühlhausen/ Thüringen

Gutachter:

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei

Referat und bibliographische Beschreibung

Nach wie vor werden beim Ovarialkarzinom konventionelle klinische Parameter zur Prognoseabschätzung herangezogen. Desweiteren ist hinsichtlich der molekularen Pathogenese der Ovarialkarzinome und der Borderline-Tumoren (BOT) noch vieles unklar, so dass man stets auf der Suche nach neuen tumorbiologischen Markern ist, die sowohl diagnostisch als auch prognostisch relevant sein könnten.

Ziel dieser retrospektiven Studie war die immunhistochemische Evaluation der Proteinexpression von Cyr61 und CTGF sowohl im Ovarialkarzinom als auch in den BOT und deren Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern, sowie dem Gesamt- und progressionsfreien Überleben.

Methodik: Paraffinmaterial von zwei ausführlich charakterisierten Tumor-Kollektiven, einem BOT-Kollektiv (92 Patientinnen) und einem Ovarialkarzinom-Kollektiv (107 Patientinnen) wurden immunhistochemisch untersucht. Zur statistischen Analyse fanden der Mann-Whitney-U-Test, Kreuztabellen, der Spearman'sche Korrelationskoeffizient, Kaplan-Meier-Kurven, der Log-Rank-Test sowie die univariate und multivariate Regressionsanalyse nach Cox Anwendung.

Ergebnisse: Die Kollektive stimmen mit den in der Literatur beschriebenen klinisch-pathologischen Parametern, wie Histologie, Alter und Überlebensdaten überein. Cyr61 und CTGF zeigten insgesamt ein inverses Expressionsverhältnis. So konnte in den Karzinomen eine signifikant stärkere Cyr61-Expression, als in den BOT nachgewiesen werden. Dagegen konnte eine signifikant stärkere CTGF-Expression in den BOT als in den Karzinomen beobachtet werden. Die Cyr-61-Expression war weder für das rezidivfreie noch für das Gesamtüberleben statistisch signifikant. Patientinnen mit einem stark CTGF-exprimierenden Ovarialkarzinom hatten jedoch ein besseres rezidivfreies- und Gesamtüberleben, als jene ohne CTGF-Expression. Aus der multivariaten Analyse ging CTGF für das rezidivfreie Überleben als unabhängiger Prognosemarker hervor.

Schlussfolgerung: Cyr61 und CTGF zeigen in den BOT und den Karzinomen des Ovars ein inverses Expressionsverhältnis. Einzig CTGF hat im Kollektiv der Ovarialkarzinome einen prognostisch relevanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben. Cyr61 und CTGF sind tumorspezifisch aberrant exprimiert. Als Mitglieder der CCN-Proteinfamilie haben sie trotz ihrer strukturellen Homologien eine differente tumorbiologische Bedeutung (tumorprogressionsfördernd *versus* tumorsupprimierend).

Balschun, Katharina: Expressionsanalyse von Cyr61 und CTGF in den Borderline-Tumoren und Karzinomen des Ovars, Halle; Univ., Med.Fak, Diss., 80 Seiten, 2009

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Borderline-Tumoren und Karzinome des Ovars.....</i>	1
1.1.1	Klassifikation der Ovarialtumoren.....	1
1.1.2	Epidemiologie des Ovarialkarzinoms und der Borderline-Tumoren.....	1
1.1.3	Borderline-Tumoren des Ovars.....	2
1.1.4	Ätiologie und Risikofaktoren des Ovarialkarzinoms und der Borderline-Tumoren.....	3
1.1.5	Molekularpathologie der epithelialen Ovarialtumoren.....	4
1.1.6	Histologische Klassifizierung.....	5
1.1.7	Histologischer Malignitätsgrad.....	5
1.1.8	Stadieneinteilung, Tumorausbreitung und Therapie.....	5
1.1.9	Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms.....	7
1.1.10	Prognosefaktoren der Borderline-Tumoren.....	7
1.2	<i>Die CCN-Proteine.....</i>	8
1.2.1	Allgemeines.....	8
1.2.2	Strukturelle Organisation.....	8
1.3	<i>Cyr61.....</i>	9
1.3.1	Vorkommen und Expression.....	9
1.3.2	Cyr61 und Tumoren	11
1.4	<i>CTGF.....</i>	11
1.4.1	Vorkommen und Expression.....	11
1.4.2	CTGF und Tumoren.....	13
2	Zielstellungen.....	14
3	Material und Methoden.....	15
3.1	<i>Zusammensetzung des Patientenkollektivs</i>	15
3.1.1	Herkunft des Tumormaterials.....	16
3.1.2	Gesamtüberleben und progressfreies Überleben.....	17
3.2	<i>Histopathologische Untersuchung.....</i>	17
3.2.1	Anfertigung der Gewebeschnitte.....	17
3.2.2	Histologische Einteilung.....	17
3.3	<i>Charakterisierung des Ovarialkarzinomkollektivs.....</i>	18
3.3.1	Histologische Zusammensetzung der Ovarialkarzinome.....	18
3.3.2	Graduierung.....	18
3.3.3	Stadieneinteilung nach FIGO.....	18

3.3.4	Art der Operation.....	19
3.3.5	Ergebnis der Erstoperation – Tumorrest.....	20
3.3.6	Aszites.....	20
3.3.7	Lymphknotenbefall.....	21
3.3.8	Art der Chemotherapie.....	21
3.3.9	Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben.....	21
3.4	<i>Labormaterialien</i>	23
3.4.1	Chemikalien und Enzyme.....	23
3.4.2	Kits, Kultutmedien, Lösungen.....	24
3.4.3	Antikörper.....	24
3.4.4	Verbrauchsmaterialien.....	25
3.4.5	Geräte.....	25
3.5.	<i>Western Blot-Analyse/ Zelllinien</i>	26
3.5.1	Zellkultur – Anzucht.....	26
3.5.2	Proteinisolierung.....	27
3.5.3	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	27
3.5.4	Elektrophorese und Transfer.....	27
3.5.5	Antikörperbindung und Belichtung.....	27
3.6	<i>Immunhistochemie</i>	28
3.6.1	Positiv- und Negativkontrollen.....	29
3.6.2	Immunhistochemische Auswertung.....	31
3.7	Statistik	32
4	Ergebnisse	33
4.1	<i>Charakterisierung des Borderline-Tumoren-Kollektivs</i>	33
4.1.1	Altersverteilung der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnose.....	33
4.1.2	Stadieneinteilung nach FIGO.....	33
4.1.3	Art der Operation	34
4.1.4	Chemotherapie.....	35
4.1.5	Borderline-Tumoren–Implantate.....	35
4.1.6	Krankheitsverläufe	35
4.1.7	Rezidivfreies Überleben.....	38
4.1.8	Histologische Zusammensetzung der Borderline-Tumoren.....	40
4.1.9	Histologische Einteilung der Implantate.....	41
4.2	<i>Die Proteinexpression von Cyr61 und CTGF</i>	41
4.3	<i>Immunhistochemische Expression von Cyr61 und CTGF-Protein</i>	41
4.3.1	Cyr61.....	41
4.3.2	CTGF.....	42

4.4	<i>IRS -Vergleich von Cyr61 und CTGF in den BOT versus Karzinom.....</i>	44
4.4.1	Vergleich der Cyr61-Expression in den BOT und in den Ovarialkarzinomen.....	44
4.4.2	Vergleich der CTGF-Expression in den BOT und in den Ovarialkarzinomen.....	45
4.5	<i>Korrelation der Cyr61-Expression mit klinisch-pathologischen Daten.....</i>	45
4.5.1	Korrelation der Cyr61-Expression in den Borderline-Tumoren	45
4.5.2	Korrelation der Cyr61-Expression in den Ovarialkarzinomen.....	47
4.6	<i>Korrelation der CTGF-Expression mit klinisch-pathologischen Daten.....</i>	50
4.6.1	Korrelation der CTGF-Expression in den Borderline-Tumoren.....	50
4.6.2	Korrelation der CTGF-Expression in den Ovarialkarzinomen.....	51
4.7	<i>Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben.....</i>	53
4.7.1	Cyr61 in Beziehung zum Gesamtüberleben und zum rezidivfreien Überleben.....	53
4.7.2	CTGF in Beziehung zum Gesamtüberleben und zum rezidivfreien Überleben.....	54
4.7.3	Klinisch pathologische Parameter in Beziehung zum Gesamtüberleben.....	54
4.7.4	Klinisch pathologische Parameter in Beziehung zum rezidivfreien Überleben.....	56
4.8	<i>Multivariate Überlebensanalyse.....</i>	57
5	Diskussion.....	58
5.1	<i>Das Patientenkollektiv und prognostische Faktoren.....</i>	58
5.1.1	Alter der Patientinnen.....	58
5.1.2	Histologie.....	58
5.1.3	Tumorrest.....	59
5.1.4	FIGO-Stadium.....	60
5.1.5	Grading.....	60
5.1.6	Validität.....	61
5.2	<i>Cyr61.....</i>	61
5.3	<i>CTGF.....</i>	63
5.3.1	CTGF-Expression im Ovar.....	63
5.3.2	CTGF-Expression im Ovarialkarzinom.....	64
5.3.3	CTGF und andere Tumoren.....	65
5.4	<i>Cyr61 und CTGF in den Borderline-Tumoren und Karzinomen des Ovars.....</i>	67
6	Zusammenfassung.....	68
7	Literaturverzeichnis.....	69
8	Thesen.....	79
9	Selbständigkeitserklärung	
10	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
11	Lebenslauf	
12	Hinweise auf Veröffentlichung von Resultaten dieser Arbeit	
13	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
BOT	<i>Borderline-Tumor/en</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BRCA	<i>breast cancer antigen</i>
BTG-2	<i>BTG family member 2</i>
CCN	<u>C</u> yr-61, <u>C</u> TGF und <u>N</u> ov
COX	Cyclooxygenase
CRMP-1	<i>Collapsin response mediator protein 1</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor, CCN2</i>
Cyr-61	<i>cystein-rich 61, CCN 1</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FIGO	<i>Federation Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
gadd34	<i>Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein</i>
HE	Hämatoxylin – Eosin – Färbung
HNPPC	Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglykan
HPF	<i>high power field</i>
II	Invasives Implantat
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein</i>
IRS	<i>Immuno-Reactive-Score</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LRP 1	<i>Low-Density-Lipoproteinrezeptor related protein</i>
MBOT	Muzinöser Borderline Tumor
min	Minuten
MLH	Mut L homolog 1
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MSH	Mut S homolog
NIEI	Nicht-invasives epitheliales Implantat

NIDI	Nicht-invasives desmoplastisches Implantat
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NOV	<i>nephroblastoma overexpressed</i> , CCN 3
OVCA	<i>Ovarian carcinoma</i> , Ovarialkarzinom
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PP	<i>percent of expression</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
R0	operativ kein Tumorrest
RT	Raumtemperatur
SBOT	Seröser Borderline-Tumor
SI	<i>Staining Intensity</i>
SS	Schwangerschaft
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TSP1	<i>Trombospondin type 1 repeat</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VWC	<i>Von Willebrand Factor Type C repeat</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
UICC	<i>Union Internationale Contre Le Cancer</i>

1. Einleitung

Die histologische Abgrenzung der Borderline-Tumoren (BOT) von den Ovarialkarzinomen ist manchmal schwierig, klinisch aber für die exakte Therapieentscheidung wesentlich. Daher liegt ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Identifizierung von Unterscheidungskriterien auf Proteinebene. Desweiteren ist auch die stetige Suche nach neuen biologischen Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom wichtig.

1.1 Borderline-Tumoren und Karzinome des Ovars

1.1.1 Klassifikation der Ovarialtumoren

Das Ovar besteht aus drei wesentlichen Gewebskomponenten unterschiedlicher Histogenese und zeigt daher ein sehr breites Spektrum morphologisch und biologisch unterschiedlicher Tumorentitäten. Nach ihrer Herkunft werden die Tumoren entsprechend der aktualisierten Version der WHO-Klassifikation von 2003¹⁹⁵ in drei Gruppen aufgeteilt:

Tabelle 1-1: Allgemeine Klassifikation der Ovarialtumoren

Ursprungsgewebe	Tumore
Deck- oder Müller-Oberflächenepithel	Epitheliale Tumoren
Gonadal differenziertes Stroma	Keimstrang-Stroma-Tumoren
Keimzellen	Keimzelltumoren

Die epithelialen Neoplasien bilden mit 65-75 % die größte Gruppe der Ovarialtumoren und mit circa 90 % die bedeutsamste unter den Malignomen des Ovars in der westlichen Welt^{41, 155}. Etwa 60 % der epithelialen Tumoren sind benigne, 8 % sind BOT und 32 % maligne Tumoren^{16, 97}. Diese von der Dignität her unterschiedlichen Tumoren bedürfen entsprechend ihrer biologischen Wertigkeit differenter Behandlungsstrategien.

1.1.2 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms und der Borderline-Tumoren

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Institutes erkranken in Deutschland jährlich ca. 9.660 Frauen an einem Ovarialkarzinom. Es macht 4,7 % aller malignen Neoplasien der Frauen aus und steht nach dem Endometriumkarzinom an zweiter Stelle der gynäkologischen Malignome. Mit jährlich 5.500 Sterbefällen (5,6 % aller Krebs-Todesfälle) weist es jedoch die höchste Letalität aller gynäkologischen Tumorerkrankungen auf. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 67 Jahren, das mittlere Lebenszeitrisko zu erkranken bei 1,7 %¹.

Bei konstanten Neuerkrankungsraten sind Dank des radikal-chirurgischen Managements sowie optimierter adjuvanter Chemotherapien die Mortalitätsraten in Deutschland seit Ende der 1980er Jahre leicht rückläufig. Dennoch sind die Überlebenseaussichten nach wie vor schlecht und nur wenige Zentren erreichen eine 5-Jahresüberlebensrate von 47 %.

Aufgrund fehlender Frühsymptome weisen mindestens 75 % der Frauen zum Zeitpunkt der Diagnose ein fortgeschrittenes Tumorstadium (FIGO III und IV) auf. Neben den Ovarialkarzinomen und den Adenomen existiert im Ovar eine dritte Gruppe von Tumoren, die BOT, welche aufgrund genetischer, histomorphologischer, sowie klinischer Unterschiede eine Sonderstellung einnehmen. Bei einer Inzidenz von 1,8 - 4,8/100 000 Frauen^{4, 203, 204} sind sie seltener als die Ovarialkarzinome, die eine Neuerkrankungsrate von 14/100 000 Frauen aufweisen. Der Altersgipfel liegt mit ca. 40-52 Jahren mindestens 10 Jahre vor dem der Ovarialkarzinome^{4, 72}. Mit einer 10-Jahres-Gesamtüberlebensrate von ca. 90 %²⁰⁵ haben sie eine wesentlich bessere Prognose als die Karzinome. Nur in wenigen Fällen treten Rezidive auf⁹⁵. Einzig der Nachweis invasiver extraovarieller Implantate ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert.

1.1.3 Borderline-Tumoren des Ovars

Erstmals beschrieben durch Taylor¹⁹⁶ 1929, wurden Kliniker wie Pathologen auf diese spezielle Gruppe epithelialer Ovarialtumoren aufmerksam, welche trotz einer diffusen peritonealen Tumorausssaat eine überraschend gute Prognose hatten. Diese „semimaligen“ Tumoren grenzte Taylor¹⁹⁶ eindeutig von den Karzinomen ab. Sie enthalten *per definitionem* atypisch proliferierende Epithelien ohne destruierendes invasives Wachstum. Wegen der im Vergleich zu Ovarialkarzinomen geringeren Malignität wurden sie auch als Tumoren niedrig maligner Potenz (LMP, *low malignant potential*) bezeichnet¹⁵⁶. 1964 erstmals von der UICC gesondert aufgelistet, wurden sie 1971 von der FIGO und schließlich 1973 von der WHO in die Klassifikation aufgenommen und als Tumoren definiert¹⁸¹, die einige, aber nicht alle morphologischen Kriterien der Malignität aufweisen. Die Diagnose wird anhand histo- und zytomorphologischer Kriterien gestellt⁴⁰. Ein BOT liegt histologisch vor, wenn mindestens zwei der folgenden Merkmale zutreffen:

- **Papillenbildung:** Epitheliale Sprossung in Form von Papillen zum Zystenlumen hin, Brückenbildungen
- **Mehrreihigkeit** des Epithels (> 4 Zellagen)
- **Gesteigerte mitotische Aktivität** (gegenüber den benignen Tumoren)
- **Nukleäre Atypien:** Zunahme der Kern/-Zytoplasma-Relation (Kerngröße); Änderung im Chromatinmuster, Abnormität von Größe, Gestalt und Zahl der Nukleoli (Chromatindichte)¹⁶².

1.1.4 Ätiologie und Risikofaktoren des Ovarialkarzinoms und der Borderline-Tumoren

Die Ätiologie des sporadischen Ovarialkarzinoms ist trotz der Fortschritte im Verständnis der Tumorbiologie noch weitgehend unklar. Neben genetischen und endokrinologischen Ursachen scheinen auch Umweltfaktoren eine Rolle zu spielen (Tabelle 1-2). Fathalla⁵³ postulierte einen kausalen Zusammenhang zwischen der wiederholten Ruptur des Oberflächenepithels im Rahmen der Ovulation und der Entstehung eines Ovarialkarzinoms. Die ovulationsinduzierten Mikrotraumen der ovariellen Oberfläche haben nach dieser Theorie fehlerhafte Reparaturprozesse zur Folge, die über eine reaktive Proliferation des Oberflächenepithel schließlich dessen maligne Entartung zur Folge haben. Diese Hypothese der *incessant ovulation* wird durch die epidemiologische Datenlage gestützt, dass Nulliparität und Frauen mit einer längeren Reproduktionsphase ein erhöhtes Risiko haben^{76, 194}. Insgesamt geht somit eine hohe Anzahl von Ovulationen mit einem gesteigerten Erkrankungsrisiko einher⁸³. Dagegen senken Stillen und die Einnahme oraler Kontrazeptiva das Risiko. Auch experimentelle Ergebnisse sprechen für die Ovulationshypothese^{63, 197}. Neben der Anzahl ovulatorischer Zyklen spielen erworbene oder angeborene genetische Anomalien und eventuell auch Umweltfaktoren (Kanzerogen-Exposition *via* Tuba uterina) als Kofaktoren für die Entstehung des Ovarialkarzinoms eine Rolle. Nach der Theorie von Cramer und Welch (1982, 1983) wirkt eine übermäßige Sekretion von Gonadotropinen (FSH, LH, DHEA) karzinogen^{37, 38}. Laut dieser „Gonadotropinhypothese“ führen die erhöhten Hormonspiegel durch eine pathologische Dauerstimulation des ovariellen Oberflächenepithels zu dessen Einstülpung in das Ovarialstroma und zur Bildung von Einschlusszysten, die als ersten Schritt der Malignomentwicklung angesehen werden. In einem zweiten Schritt werden die eingeschlossenen Epithelien durch mitogene Gonadotropine und Östrogene stimuliert, was zur weiteren malignen Transformation führen soll. Protektive Faktoren und Risikofaktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinomes und der BOT (kursiv) sind in der Tabelle 1-2 kurz zusammengefasst. 90 - 95 % der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf, ca. 5-10 % sind genetisch bedingt⁸³. In den sporadischen Tumoren sind eine Vielzahl somatischer Mutationen in verschiedenen Genen beschrieben worden¹⁶¹. Von einem hereditären Ovarialkarzinom bzw. „Ovarialkarzinom-Syndrom“ spricht man, wenn die Erkrankung bei mindestens 2 Verwandten 1. Grades aufgetreten ist. Hinweisend für weitere erblich bedingte Ovarialkarzinome ist auch ein gehäuftes Auftreten innerhalb der Familie, assoziiert mit dem Auftreten von Brustkrebs, seltener mit Darm- und Gebärmutterkrebs (HNPCC / Lynch II Syndrom) oder anderen Tumoren (Li-Fraumeni-Syndrom), sowie ein ungewöhnlich junges Erkrankungsalter. Bei diesen Syndromen, die mit Keimbahnmutation in den Genen BRCA 1- oder BRCA 2, MLH 1 und MSH 2 bzw. p53 assoziiert sind, liegt ein 3-50-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko vor⁹⁸. Multiparität, lange Stillzeiten, die Einnahme oraler Kontrazeptiva sowie eine prophylaktische Salpingo-Ovarektomie reduzieren im Falle der erblich bedingten Ovarialkarzinome das Erkrankungsrisiko^{76, 83, 160}.

Tabelle 1-2: Protektive Faktoren und Risikofaktoren für die Entstehung von Ovarialkarzinomen und Borderline-Tumoren (alle für Borderline-Tumoren geltende Faktoren *kursiv* geschrieben)¹⁵⁰

Endokrine Schutzfaktoren
<ul style="list-style-type: none"> • Ovulationshemmer (<i>Risikominderung je nach Dauer der Anwendung um 30-80 %</i>) • Anzahl der Schwangerschaften (<i>Risikominderung um 13-19 % pro ausgetragene SS</i>) • Lange Stillperiode
Sonstige Schutzfaktoren
<ul style="list-style-type: none"> • Hysterektomie oder Tubenligatur (kein retrograder Transport von Karzinogenen?) • Fenretinid (synthetisches Retinoid)
Risikofaktoren
<ul style="list-style-type: none"> • Alter • positive Familienanamnese (gehäuft Ovarialkarzinome) • Reproduktive Risikofaktoren: • Endokrine Risikofaktoren („natürlich“) <ul style="list-style-type: none"> - frühe Menarche (< 11 Jahre) - <i>primäre Sterilität</i> - polyzystische Ovarien • Endokrine Risikofaktoren (iatrogen) <ul style="list-style-type: none"> - <i>Clomifen-Anwendung / Reproduktionsmedizin</i> - reine Östrogensubstitution (Risikofaktor für endometrioides und klarzelliges Ovarialkarzinom) - Hormonsubstitution > 10 Jahre • Diätetische Risikofaktoren (?) <ul style="list-style-type: none"> - hoher Anteil an tierischen Fetten - hoher Fleischkonsum - <i>Adipositas</i> • Chronische Entzündungen • Umweltfaktoren <ul style="list-style-type: none"> - Asbest (?) - <i>Talkum-Puder</i> (?) - ionisierende Strahlen (?) - chemische Karzinogene (Spermizide, in die Vagina eingebrachte Chemikalien)

1.1.5 Molekularpathologie der epithelialen Ovarialtumoren

Molekulargenetische Erkenntnisse haben dazu geführt, dass innerhalb der serösen Karzinome zwei Gruppen voneinander unterschieden werden: die *low grade* Karzinome, die sich über die BOT entwickeln sollen und die *de-novo* entstehenden *high grade* Karzinome (s. Abb.1-1)^{111,184, 189}. Dieses dualistische Modell wurde auch auf die anderen histologischen Typen ausgedehnt und definiert als Typ-I-Tumoren, z.B. das muzinöse, endometrioides und klarzellige Karzinom, welche über Vorläuferläsionen entstehen, sowie die *de-novo* entstehenden Typ-II-Tumoren^{9, 180}. Die Typ-I-Tumoren sind genetisch stabil und zeigen erhöhte p21-Level bei gleichzeitiger Expression von Zellwachstumsuppressoren (BTG-2, gadd34). Darüberhinaus weisen sie im Gegensatz zu den *high grade* Karzinomen häufiger KRAS-, BRAF-, PTEN- oder β -Catenin-Mutationen auf^{9, 46, 78, 111, 129, 187, 189}. Für die sogenannten Typ-II-Tumoren (G2/3-serösen Ovarialkarzinome, Karzinosarkome) sind komplexe chromosomale Instabilitäten und Mutationen von p53 typisch^{28, 187}. Dabei ist die höhere Gesamtzahl der mittels CGH-Analysen nachgewiesenen chromosomalen Aberrationen mit einer kürzeren Überlebenszeit und einem höheren Malignitätsgrad assoziiert¹⁹³.

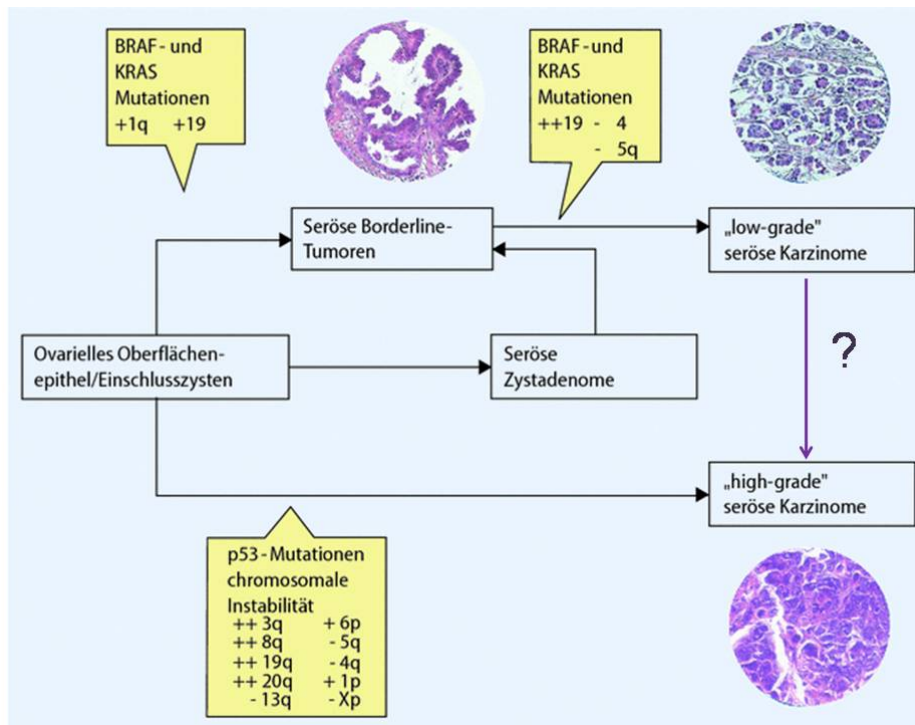


Abb. 1-1:
Mehrschrittmodell
der Pathogenese der
serösen Neoplasien
des Ovars
modifiziert nach
Stäbler *et al.*¹⁸⁹

1.1.6 Histologische Klassifizierung

Die BOT und die Ovarialkarzinome werden der WHO¹⁷³ entsprechend dem vorherrschenden Zelltyp der serösen, muzinösen (endozervix-ähnlichen oder intestinalen), endometrioiden, klarzelligen, transitionalzelligen, plattenepithelialen Differenzierung beziehungsweise der Subklasse der gemischten oder nicht klassifizierbaren Tumoren zugeordnet.

1.1.7 Histologischer Malignitätsgrad

Wesentliche Gradingssysteme sind das der WHO, sowie die Gradingklassifikation nach Silverberg¹⁸⁶. Beim *Silverberg-Grading* wird basierend auf histoarchitektonischen, zytologischen und proliferationskinetischen Parametern ein Score erfasst, dessen Aussage und Reproduzierbarkeit über dem der WHO-Schemata liegt und unabhängig vom histologischen Typ angewendet werden kann. Die UICC unterscheidet vier Differenzierungsgrade: G1 (hoch differenziert), G2 (mäßig differenziert) und G3 bis G4 (gering differenziert bis undifferenziert), wobei niedrig differenzierte und undifferenzierte Ovarialkarzinome in einer Gruppe zusammengefasst werden (G3/4).

1.1.8 Stadieneinteilung, Tumorausbreitung und Therapie

Die Stadieneinteilung der Ovarialkarzinome und der BOT nach der FIGO sowie nach der TNM-Klassifikation (Tabelle 1-3) sind international etablierte und prognostisch relevante Einteilungssysteme. In erster Linie erfolgt die Ausbreitung der Ovarialkarzinome intraabdominell sowie lymphogen in die regionären Lymphknoten.

Tabelle 1-3: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms nach UICC²²⁰

TNM	FIGO	Kriterien
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovar(ien)
T1a	Ia	Einseitig: Kapsel intakt, Oberfläche frei, kein Aszites
T1b	Ib	Beidseitig: Kapsel intakt, Oberfläche frei, kein Aszites
T1c	Ic	Kapselruptur; Tumor an Oberfläche; maligne Zellen im Aszites oder der Peritoneallavage
T2	II	Ausbreitung im kleinen Becken
T2a	Ila	Beteiligung von Uterus und/oder Tube(n)
T2b	Ilb	Weitere Lokalisationen im Becken
T2c	Ilc	Stadium Ila oder Ilb mit malignen Zellen im Aszites oder der Peritoneallavage
T3 und/oder N1	III	Ausbreitung über die Beckengrenzen hinaus; Peritonealkarzinose außerhalb des Beckens und/oder paraaortale/pelvine Lymphknotenmetastasen
T3a	IIla	Mikroskopische Lymphknotenmetastasen
T3b	IIlb	Makroskopische Peritonealkarzinose ≤ 2 cm
T3c	IIlc	Peritonealkarzinose > 2 cm und/oder Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen

Bei der intraabdominellen Tumordissemination wird zwischen dem Befall der Serosa des kleinen Beckens (Stadium II) und der jenseits des kleinen Beckens (Stadium III) mit möglichem Befall von Zwerchfell, Milz, Leber und der parakolischen Rinne differenziert. Die lymphogene Ausbreitung erfolgt über zwei Wege: (1) über das *Ligamentum infundibulopelvicum* zu den retroperitonealen (paraaortalen) Lymphknoten entlang der Aorta und Vena Cava und (2) über das *Ligamentum latum*, sowie die Parametrien zur Beckenwand mit Befall der iliakalen, hypogastrischen und obturatorischen (pelvinen) Lymphknoten. Im Stadium IV liegen Fernmetastasen, insbesondere in den Lungen und der Leber, seltener im Knochen und Gehirn vor. Insgesamt werden aufgrund der fehlenden sowie später unspezifischen Symptome die Mehrzahl der Ovarialkarzinome (ca. 70-80 %) bereits in den beschriebenen fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Klinisch sowie prognostisch wichtig ist daher die Unterscheidung des organbegrenzten (FIGO IA und IB) vom fortgeschrittenen Ovarialkarzinom⁷⁹. Zu der erstgenannten Gruppe gehören im Literaturmittel nur 27 % der Patientinnen, wobei einschränkend erwähnt werden muss, dass nur bei ca. 10 % der Frauen in den Studien ein optimales chirurgisches Staging mit peritonealem Sampling und Lymphonodektomie erfolgte. In der retrospektiven Studie von Sakurai wiesen 17 % (24/141) aller Patientinnen mit einem T1-Karzinom Lymphknotenmetastasen auf, wobei die über der *Arteria mesenterica superior* gelegenen paraaortalen Lymphknoten die erste befallene Etage darstellen¹⁶⁴. Dennoch ist die 5-Jahresüberlebensrate der organbegrenzten frühen Ovarialkarzinome mit 85 % wesentlich besser als die der fortgeschrittenen Karzinome mit ca. 35 %⁷⁹.

Generell besteht das Behandlungskonzept aus der primären chirurgischen Tumorreduktion mit konsekutiver adjuvanter Chemotherapie in Form von Platinanaloga und Taxanen. Dabei ist die Effektivität und die Ansprechrate der Chemotherapie von der Tumorbiologie und dem postoperativen Tumorrest abhängig. Einzige Ausnahme der postoperativen Chemotherapie sind hoch differenzierte Ovarialkarzinome der FIGO-Stadien IA und IB. Bei den BOT genügt die stadienspezifische chirurgische Therapie. Eine postoperative Chemotherapie ist nicht indiziert. Selbst die ca. 20-30 % der Patientinnen mit einem serösen BOT und nicht-invasiven peritonealen Implantaten und/oder Lymphknotenimplantaten profitieren nicht von einer adjuvanten Therapie. Kontrovers wird dagegen der Nutzen einer obligaten Chemotherapie beim Vorliegen prognostisch ungünstiger invasiver Implantate diskutiert.

1.1.9 Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms

Unter einem „Prognosefaktor“ versteht man *per definitionem* ein Merkmal eines malignen Tumors, das den zu erwartenden Verlauf der Erkrankung, unabhängig von der Therapie, voraussagt. Dagegen informieren sogenannte „Prädiktive Faktoren“ über das zu erwartende Ansprechen auf eine bestimmte Therapie. Für das Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen sind das Tumorstadium, der postoperative Tumorrest, das Alter und der Allgemeinzustand multivariat signifikante prognostische Parameter^{79, 176, 186}. Der histologische Typ, sowie das Tumorgrading zählen in niedrigen Tumorstadien zu den etablierten klinisch-pathologischen Prognosefaktoren. Ein hoher Malignitätsgrad sowie eine klarzellige Tumordifferenzierung gelten allgemein als ungünstige Prognosefaktoren⁷⁹. In den letzten Jahren sind, nicht zuletzt durch neue molekularbiologische Techniken, eine Vielzahl molekularer Prognosefaktoren identifiziert worden. Bezüglich ihres jeweiligen Stellenwertes werden sie in der Literatur kontrovers diskutiert. Zu diesen „tumorbiologischen“ Markern zählen: Her-2/Neu⁵¹, PAI-1 (Plasminogenaktivator Inhibitor)²⁷, MMP¹⁶⁸, VEGF^{25, 122}, p53^{8, 79}, Ezrin¹⁰¹, CD24¹⁰⁷, COX-2⁴⁴, verschiedene Zytokine (IL-6, IL-10, IL-12), intratumorale CD 3-, CD 4-, CD 8- Lymphozyten, Kallikreine 8,11,13^{45, 172} die DNA-Ploidie und der DNA-Index⁷⁹. Einschränkend muss für alle genannten molekularen Faktoren erwähnt werden, dass sie vorrangig bei den auf das Ovar begrenzten Tumoren eine Rolle spielen.

1.1.10 Prognosefaktoren der Borderline-Tumoren

Der Nachweis invasiver extraovarieller Implantate gilt als prognostisch entscheidender Faktor. Diese Patientinnen haben nach einer Metaanalyse von Seidman *et al.*¹⁷⁷ eine Gesamtüberlebensrate von nur 66 %, gegenüber den Patientinnen ohne invasive extraovarielle Foci mit 95 %. Auch der histologische Typ spielt eine Rolle. So haben die klarzelligen BOT die schlechteste und die endometrioid differenzierten die beste Prognose⁹⁵.

1.2 Die CCN-Proteine

1.2.1 Allgemeines

Die CCN-Proteine sind signal-vermittelnde Proteine, die verschiedene biologische Prozesse wie Adhäsion, Migration, Mitogenese, Differenzierung und Überleben regulieren. Darüber hinaus sind sie an Vorgängen wie Angiogenese, Plazentation, Implantation, Embryogenese, Tumorigenese, Wundheilung, fibrotischen und vaskulären Krankheiten beteiligt^{19, 115, 148}. Derzeit gehören zu der CCN-Genfamilie sechs Mitglieder: CCN1 (Cyr61- Cystein rich 61), CCN2 (CTGF- Connective Tissue Growth Factor), CCN3 (Nov- Nephroblastoma Overexpressed gene), CCN4-6 (WISP-1,2,3–Wnt-1 Induced Secreted Proteins)^{5, 6}. Das Akronym *CCN* steht für die ersten drei der in den frühen 90er Jahren entdeckten Familienmitglieder (Cyr61, CTGF und Nov), die aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten als eine Proteinfamilie zusammengefasst¹³ wurden. Zur Vereinfachung werden die CCN-Proteine heute in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert²⁰.

1.2.2 Strukturelle Organisation

Die Mitglieder dieser Familie weisen Strukturhomologien von durchschnittlich 46 % bei einer Gesamtlänge von 349-381 Aminosäuren (Präpeptide) auf⁸⁴, wobei sie besonders reich an der Aminosäure Cystein sind (10 % ihrer Masse)^{17, 115}. Die Tertiärstruktur der Proteine ist bislang unbekannt. Aufgrund ihres multimodularen Aufbaus besteht jedes dieser Proteine aus 4 konservierten, homologen Domänen, denen jeweils einzelne Exons auf Genebene zuzuordnen sind (Abb. 1-2):

- (1) Die erste, N-terminale Domäne enthält ein *Insulin-like growth factor* – Bindungsmotiv (IGFBP), welches jedoch eine geringere Bindungsaffinität als die klassischen IGFBPs zeigt.
- (2) Die zweite weist strukturelle Gemeinsamkeiten mit dem von Willebrand Faktor Typ 1C-Motiv (VWC), einem multimeren komplexen Plasmaprotein, auf. Die VWC-Domäne ermöglicht insbesondere CTGF die Interaktionen mit Proteinen der TGF- β (*transforming growth factor β*)-Superfamilie, wie BMP-4 oder TGF- β - 1². Zudem spielt die VWC-Domäne eine Rolle bei der Formation und Oligomerisierung von Proteinkomplexen¹³.
- (3) Die dritte Domäne ist identisch mit dem ursprünglich in Thrombospondin gefundenen Thrombospondin Typ 1 (TSP-1) Motiv und vermittelt adhäsive Eigenschaften durch Bindung an ECM - Proteine, Integrine und MMPs^{19, 153}.
- (4) In der vierten, Cystein-reichen Domäne am C-terminalen Ende liegt die Fähigkeit zur Bindung an Heparin begründet²¹. Dieses als Cysteinknoten bezeichnete Strukturmotiv ist weit verbreitet und findet sich z.B. bei den Proteinen der TGF- β - Familie, dem *nerve growth factor* (NGF) und dem *platelet derived growth factor* (PDGF).

Weiterhin existiert unter den CCN-Proteinen eine variable, zentral gelegene fünfte Domäne, deren Rolle noch unbekannt ist¹⁵³.

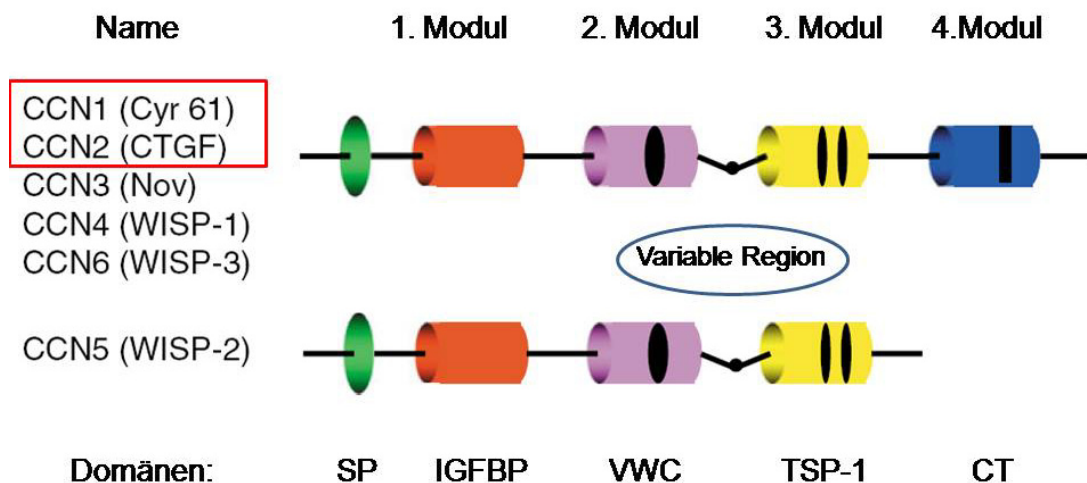


Abb. 1-2: Strukturhomologie der CCN-Familie / Multimodulare Struktur der CCN-Proteine: Die Mitglieder der CCN-Familie sind multimodular aus einem sekretorischen Signalpeptid (SP), der IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Protein)-Domäne (Modul 1), der VWC(von Willebrand Factor)-Domäne (Modul 2), der TSP-1(Thrombospondin 1)-Domäne (Modul 3), und der CT(Cysteine knot)-Domäne (Modul 4) zusammengesetzt. Interessant ist das Fehlen von Modul 4 in CCN5. Bioaktive Formen von CTGF/ CTGF weisen Varianten in den Modulen 1 und 2 oder 1-3 auf. Modifiziert nach Leask¹¹⁸ und Brigstock¹⁹

Zusammengefasst stellen die CCN-Proteine als sezernierte matrizelluläre Proteine eine neue Klasse von Signalmolekülen dar, die aufgrund ihrer multimodularen Mosaikstruktur mit diversen Molekülen der ECM, verschiedenen Rezeptortypen der Zellmembran, sowie auch mit regulatorischen Proteinen interagieren können, um deren Aktionen zu modulieren¹⁵³. Obwohl bislang nur einzelne Interaktionspartner und hochaffine Signal-Transduktions-Rezeptoren bekannt sind, lassen die konservierten Domänen auf eine wesentliche Integrationsfunktion von Cyr61 und CTGF bei zahlreichen Signalwegen schließen^{90, 115}. Beispielsweise ist bekannt, dass die Cyr61 getriggerte Induktion des antiapoptotischen Faktors XIAP durch β 1-Integrine vermittelt wird^{115, 124}. Die CCN-Proteine beeinflussen die Regulation der Zellproliferation, sowohl bei physiologischen, als auch bei pathologischen Prozessen. Die Produktion abnormer Level von normalen oder alterierten CCN-Proteinen könnte auch in Tumoren von Bedeutung sein.

1.3 Cyr61

1.3.1 Vorkommen und Expression

Cyr61(CCN1) wurde 1985 als erstes Gen der CCN-Familie, als sogenanntes „immediate early gene“, in BALB/c 3T3 Maus-Fibroblasten identifiziert¹¹⁶. Es wird innerhalb weniger Minuten nach Stimulation durch Serum, PDGF oder FGF in Fibroblasten transkribiert. Die höchsten mRNA-Level werden 60-90 Minuten nach der Stimulation erreicht¹¹⁶.

Nach der Sekretion bindet Cyr61 über die Heparin-Bindungsstelle an spezifische Oberflächenrezeptoren der ECM wie Heparansulfat-Proteoglykane^{100, 133, 227}. Zahlreiche, jedoch nicht alle Cyr61-Aktivitäten werden durch die Interaktion mit spezifischen Integrinen realisiert¹¹³, so sind bereits einige Integrine als Rezeptoren von Cyr61 identifiziert worden^{31, 67, 92, 100, 169, 199} (Tabelle 1-4).

Tabelle 1-4: Kurzdarstellung des Proteins Cyr61

Synonym	Cyr61 (Mensch, Maus, <i>Xenopus</i>), IGFBP-pP4 (Mensch), β IG-M1 (Maus), CTGF-2, IGFBP 10 (Mensch), angiopro ^{19, 20}
Chromosom	1p22.3
mRNA	2037 bp (NCBI Accessionnummer NM_001554) ⁹¹
Aminosäuren	381 aa (NCBI Accessionnummer NP_001545)
Gewicht	42 kDa
zelluläre Lokalisation	wird sezerniert
Expression im Gewebe	<i>epitheliale Zellen:</i> Mundhöhle, Ovar, Endometrium, Prostata <i>mesenchymale Zellen:</i> Fibroblasten, Endothelien, glatte Muskelzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Chondrozyten, sowie mesenchymale Stammzellen ¹⁷¹
Rezeptor/ Liganden	Cyr61-medierte Prozesse
$\alpha_6\beta_1$, HSPG	Adhäsion von Fibroblasten und Endothelzellen, Chemotaxis von Fibroblasten ¹⁰⁰
$\alpha_M\beta_2$, HSPG	Adhäsion von Monozyten ^{169, 170}
$\alpha_v\beta_3$	Wachstumsfaktor-stimulierte DNA-Synthese in Fibroblasten und Endothelzellen ^{6, 100, 106, 115} , Angiogenese (Zell-Adhesion und Chemotaxis von Endothelzellen) ⁶⁷
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Adhäsion von Thrombozyten ⁹²
$\alpha_6\beta_1$; $\alpha_v\beta_3$; $\alpha_v\beta_5$	ECM-Umbau (Adhesion, Migration, Proliferation von Fibroblasten) ⁶⁷

Während der Embryogenese ist Cyr61 essentiell für die Entwicklung der Plazenta, des embryonalen Gefäß-, sowie des Knochensystems^{120, 134, 140}. So haben Präeklampsie-Patientinnen im Serum und in der fehlerhaft vaskularisierten Plazenta reduzierte Cyr61-Protein-Level⁶⁰. *Cyr61-knock-out* Mäuse sterben in der frühen Embryonalphase aufgrund schwerwiegender vaskulärer Defekte, sowie an der placentaren Insuffizienz infolge der Mindervaskularisierung während der Plazentation¹³⁴. Insbesondere weisen Cyr61-defiziente Mäuse eine schwer beeinträchtigte kardiale, valvulo-septale Morphogenese mit konsekutiven atrioventrikulären Septumdefekten (AVSD) auf¹³³. Im Rahmen der kutanen Wundheilung ist Cyr61 entscheidend an der Angiogenese und dem ECM-Umbau beteiligt. Es wird von Fibroblasten exprimiert und induziert, vermittelt durch die Integrine $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ die Adhesion und Migration von Fibroblasten, sowie die Zell-Adhesion und Chemotaxis von Endothelzellen⁶⁷. Reparative Funktionen werden Cyr61 auch bei der Knochenheilung zugeschrieben¹⁷¹. Bei der Atherosklerose ist Cyr61 als multimodularer Faktor u.a. an der Adhäsion von Monozyten beteiligt^{169, 170}.

1.3.2 Cyr61 und Tumoren

Cyr61 vermittelt auch in Tumoren die Zellproliferation, -adhäsion und -migration. Darüber hinaus fördert es als proangiogener Faktor das Tumorwachstum.

In einen tumorprogressionsfördernden Kontext ist die Cyr61-Expression in Magenkarzinomen^{6, 125, 127}, Pankreaskarzinomen⁸², pädiatrischen Tumoren¹⁴⁷, Malignen Melanomen¹¹⁰, Gliomen²²³, Mammakarzinomen^{165, 166, 206-208, 222}, Nierenkarzinomen³⁵ sowie auch in Ovarialkarzinomen⁶² beschrieben worden. Dagegen ist die Cyr61-Expression in Rhabdomyosarkomen⁶¹, Prostatakarzinomen¹⁵¹, Lungenkarzinomen (NSCLC)^{32, 200}, Endometriumkarzinomen³³ und in uterinen Leiomyomen¹⁶⁶ mit einer Tumorsuppression assoziiert. Bis zum Beginn dieser Arbeit gibt es nur eine einzige Studie, die die Expression von Cyr61 in Ovarialkarzinomen beschreibt⁶². Gery *et al.* zeigten, dass die Cyr61-mRNA-Level im Ovarialkarzinom mit einer erhöhten Tumorzellproliferation, verminderter Apoptose und einer schlechteren Prognose korreliert.

1.4 CTGF

1.4.1 Vorkommen und Expression

Humanes CTGF wurde als zweites Protein der CCN-Familie (Tabelle 1-6) im Überstand kultivierter humaner venöser Nabelschnurendothelien (HUVECs) als sezernierter mitogener Faktor identifiziert¹⁴. Durch Wachstumsfaktoren im Serum, sowie durch TGF- β wird die Transkription von CTGF rasch aktiviert¹⁵³. Das gereinigte Protein ist ein Monomer mit einem Molekulargewicht von 36-38 kDa, welches mitogene sowie chemotaktische Aktivitäten in Fibroblasten zeigt⁸⁴ und daher *connective tissue growth factor* genannt wird. Bradham *et al.*¹⁴ zeigten, dass es an der Zelloberfläche von Endothelien bindet und kompetitiv durch PDGF verdrängbar ist. Weitere Studien demonstrierten, dass ein 10 kDa-schweres proteolytisches CTGF-Fragment, korrespondierend zu der CT-Domäne an Fibroblasten bindet und deren Zellproliferation induziert^{7, 21, 191}. Obwohl CTGF mit diversen Zelloberflächenmolekülen interagiert, konnte ein spezifischer Oberflächenrezeptor bis heute nicht bestimmt werden. Es ist bekannt, dass CTGF in Abhängigkeit vom Zelltyp an verschiedene Integrine, Heparansulfatproteoglykane (HSPG), *Low-Density-Lipoproteinrezeptor related proteins* (LRP 1) und an *nerve growth factor tyrosin kinase receptors* (TrkA) binden kann, um Kinasen, intrazelluläre Signalkaskaden oder die Gentranskription zu induzieren. Physiologisch wird CTGF als Target-Gen von Wachstumsfaktoren wie TGF- β , BMP, VEGF, während der enchondralen Ossifikation von humanen Chondrozyten exprimiert¹³⁹. Es spielt eine wichtige Rolle in der Skelettentwicklung, da es an der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Osteoblasten, an deren Proliferation, sowie am Umbau der ECM und der Angiogenese beteiligt ist³⁶. Die heterozygote Deletion des CTGF-Gens in Mäusen führt aufgrund schwerwiegender skelettaler Defekte zum Tod unmittelbar nach der Geburt⁹⁰. Auch für die Entwicklung des Herzens ist CTGF essentiell³⁶.

In *in vitro*-Experimenten agiert CTGF als *downstream*-Mediator von TGF- β an Fibroblasten, stimuliert die Zellproliferation und induziert die ECM-Synthese⁶⁶, sowie deren Umbau im Rahmen der Wundheilung⁸⁷ und der assoziierten Fibrose⁵⁶. Dabei fördert CTGF die für fibrotische Erkrankungen typische exzessive Deposition der ECM sowohl durch Stimulation der Synthese von ECM-Komponenten (Kollagen Typ 1, Fibronectin), als auch durch Modulation der Expression ECM-modifizierender Proteine (Hochregulierung der *tissue inhibitor metalloproteinase 1* (TIMP 1), TIMP 3, der *Matrixmetalloprotease 2* (MMP 2), Inhibition der TIMP 2-Expression)^{42, 56, 226}. So ist CTGF in zahlreichen fibroproliferativen Erkrankungen, wie z.B. der Lungenfibrose^{112, 144}, der systemischer Sklerose^{80, 86, 117, 119}, der Nierenfibrose⁸⁹, insbesondere der diabetischen Nephropathie²¹⁵, der Leberfibrose¹⁴⁵, der Gallenblasenwandfibrose¹⁰⁵, der Arteriosklerose¹⁴¹ sowie in Myokardinfarkt Narben³⁶ konstitutiv überexprimiert und im direkten Zusammenhang mit TGF- β -assoziierten Signalwegen beschrieben worden. CTGF gilt allgemein als Mediator und Marker von Fibrosen. Laut Mukudai *et al.*¹³⁸ wird CTGF beim Menschen in Herz, Gehirn, Leber, Niere, Lunge, Muskel, Uterus und in der Plazenta exprimiert und hat angiogene sowie ECM-modulierende Eigenschaften. Es wird von Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Myofibroblasten⁹⁶ und von Ovarialepithelien⁹⁹ sezerniert. Im normalen Ovar reguliert CTGF insbesondere den Erhalt bzw. die Integrität des Corpus luteum^{69-71, 126, 188, 217}. Im Uterus fördert CTGF die Angiogenese, den ECM-Umbau bei der Dezidualisierung¹⁹², sowie im Rahmen der Plazentation^{136, 137, 211}.

Tabelle 1-6: Kurzdarstellung des Proteins CTGF

Synonym	CTGF (Mensch, Huhn, Maus, <i>Xenopus laevis</i>), IGFBP-rP2 (Mensch), Hcs24 (Mensch), IGFBP 8 (Mensch), HBGF-0.8, ecogenin (Mensch) ²⁰
Chromosom	6q23.1
mRNA	2358 bp (NCBI Accessionnummer NM_001901)
Aminosäuren	349 aa (NCBI Accessionnummer NP_001892)
Gewicht	36-38 KDa - anfällig für Proteolyse
zelluläre Lokalisation	Zytoplasma, Endosomen, Golgi-Apparat, Plasmamembran, in nukleären Fraktionen (<i>vorrangig im Golgi-Apparat gelegen, wird sekretiert, rasch in den Endosomen degradiert</i>) ³⁰
Expression im Gewebe	mesenchymale Zellen: Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Myofibroblasten, renale Mesangiumzellen, Osteoblasten, Chondrozyten ^{47, 48, 52, 149} epitheliale Zellen: Granulosa- und Thekazellen, ovariell Oberflächenepithel, Nebenniereninzenzellen, Testes - steroidabhängige Zellen, Endometrium-epithelial sowie stromal ^{69-71, 126}
Rezeptor/ Liganden	CTGF-medierte Prozesse
$\alpha_6\beta_1$	Adhäsion von Fibroblasten ¹²¹ und hepatischer Sternzellen ²⁰⁰
$\alpha_M\beta_2$	Adhäsion von Monozyten ^{169, 170}
$\alpha_v\beta_3$	Adhäsion von Endothelzellen ⁵ und hepatischer Sternzellen ⁵⁸
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Adhäsion von Thrombozyten ⁹²
$\alpha_5\beta_1$	Migration und Adhäsion pankreatischer Sternzellen ⁵⁹
HSPG, LRP 1	Adhäsion von hepatischen Sternzellen ^{58, 175}
TrkA	Aktivierung, Proliferation von Mesangiumzellen ²¹⁶

1.4.2 CTGF und Tumoren

CTGF ist als ein multifunktionales wachstumsfaktorähnliches Protein in verschiedensten Neoplasien von Bedeutung. Im Einklang mit den profibrotischen Eigenschaften ist CTGF in Tumoren überexprimiert, die ein desmoplastisches Stroma aufweisen, wie z.B. im invasiv duktalem Mammakarzinom^{57, 222}, im desmoplastischen malignen Melanom¹⁰⁸, im Pankreaskarzinom²¹⁹ und im desmoplastischen klein- und rundzelligen Tumor¹⁵⁴. Desweiteren ist eine CTGF-Expression in Dermatofibromen, pyogenen Granulomen, in Angiolipomen und Angioleiomyomen⁸⁵ beschrieben worden. In Glioblastomen wird CTGF in Tumorzellen und in proliferierenden Endothelien exprimiert, mediert die Adhäsion und Migration *via* $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und stimuliert so die Angiogenese¹⁴³. Tumorprogressionsfördernde Eigenschaften werden CTGF in folgenden Tumorentitäten zugeschrieben: Chondrosarkomen¹⁸³, Rhabdomyosarkomen³⁹, Mammakarzinomen^{57, 222, 225}, Glioblastomen^{143, 223}, Prostatakarzinomen²²⁶, Akuten lymphoblastischen Leukämien²¹⁴ und Ösophaguskarzinomen¹⁰². Hingegen supprimiert CTGF in Lungenkarzinomen (NSCLC)^{29, 32, 34}, oralen Plattenepithelkarzinomen¹³⁵ und Pankreaskarzinomen⁷³ das Tumorwachstum. Die Rolle von CTGF im Ovarialkarzinom war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht untersucht worden.

2. Zielstellungen

In der vorliegenden retrospektiven Studie sollte die Expression zweier Proteine der CCN-Familie, Cyr61 und CTGF im Ovarialkarzinom sowie in den Borderline-Tumoren untersucht werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf der prognostischen Bedeutung dieser Proteine. Folgende Fragen sollten in einer immunhistologischen Studie beantwortet werden:

1. Wie wird das Cyr61- und CTGF-Protein in den Ovarialkarzinomen/ Borderline-Tumoren exprimiert?
2. Welche Korrelationen ergeben sich zu klinisch-pathologischen Parametern beider Tumorentitäten?
3. Welche prognostische Relevanz hat die Expression der Proteine jeweils für das rezidivfreie- sowie das Gesamtüberleben ?

3. Material und Methoden

3.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Das verwendete Untersuchungsmaterial und die erhobenen retrospektiven Daten stammen von 199 Patientinnen, bei denen in den Jahren 1996 bis 2005 im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg ein Ovarialtumor diagnostiziert wurde. Insgesamt handelt es sich um 107 Ovarialkarzinome und 92 BOT. Weiterhin wurden auch 5 Fälle mit normalem ovariellen Oberflächenepithel untersucht. Die Krankengeschichte sowie das Überleben der Patientinnen wurden bis Oktober 2005 bei den Ovarialkarzinomen und bis Februar 2008 bei den BOT auf Basis der Krankenhausakten, der Tumorregister sowie der Einwohnermeldeämter verfolgt. Die klinischen Daten wurden aus den Krankenakten der Patientinnen mit einem dafür erstellten, standardisierten Erhebungsbogen erfasst. Alle Daten wurden nach den Richtlinien des Datenschutzes behandelt. Die Patientinnen waren mit der wissenschaftlichen Nutzung des Gewebes einverstanden.

Folgende Parameter wurden in beiden Kollektiven dokumentiert:

- Name und Geburtsdatum
- TNM–Stadium
- FIGO-Stadium
- Histologie
- Art der Operation
- Überlebensstatus nach Bell et al.¹¹ und Gesamtüberleben (Monate nach Operation)
- Auftreten eines Rezidives, Zeitpunkt eines Rezidives (Monate nach Operation)

Im Kollektiv der Ovarialkarzinome wurden folgende weitere klinisch-pathologische Daten erfasst:

- Grading
- Postoperativ verbliebener Tumorrest (optimal: Tumorrest < 1 cm, nicht optimal >1 cm)
- Nodalstatus
- Aszites
- First-line Chemotherapie (Taxol und Carboplatin *versus* andere *versus* keine Chemotherapie)
- Anzahl der Zyklen einer Chemotherapie

Bei den BOT lagen folgende zusätzliche Informationen vor:

- Chemotherapie (ja/ nein)
- Implantate
- Histologie der Implantate
- Lokalisation der Implantate

3.1.1 Herkunft des Tumormaterials

A) Herkunft der Borderline-Tumoren

Die BOT stammen aus den gynäkologischen Abteilungen der in der Tabelle 3-1 aufgelisteten Krankenhäuser. 64,4 % (50/92) der BOT des Kollektiv sind primär im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität diagnostiziert worden und sind aus den ortsansässigen Kliniken (Gynäkologische Klinik der MLU, Allgemeinchirurgische Klinik der MLU, Elisabeth Krankenhaus Halle und Carl-von-Basedow-Klinikum in Merseburg) eingesandt worden. Bei den übrigen 36,6 % (42/92) der BOT des Kollektivs handelt es sich um Konsultationsfälle aus den Instituten für Pathologie in Dessau und Schwerin, sowie der Charité, die Prof. Dr. Hauptmann referenzpathologisch begutachtete. Je Fall verblieb, nach Einverständnis der Einsender, repräsentatives Tumorgewebe zur wissenschaftlichen Nutzung im Institut für Pathologie der MLU. Dieser Sachverhalt erklärt die im BOT-Kollektiv zum Teil uneinheitliche klinische Datenlage. Bei 22,8 % der Patientinnen (21/92) sind die klinischen Angaben lückenhaft und unvollständig.

Tabelle 3-1: Herkunft der BOT

Krankenhaus	Häufigkeit	Prozent
Gynäkologie – MLU	24	26,1
Elisabeth Krankenhaus Halle	16	17,4
Carl-von-Basedow-Klinikum Merseburg	9	9,8
Allgemeinchirurgie – MLU	1	1,1
Dessau	9	9,8
Schwerin	10	10,9
Charité	18	19,6
Andere	5	5,4
Gesamt	92	100

B) Herkunft der Ovarialkarzinome

Alle Ovarialkarzinome wurden aus den ortsansässigen Kliniken eingesandt und sind primär im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität diagnostiziert worden (Tabelle 3-2). 48,6 % (52/107) und damit der Hauptanteil stammt aus der Gynäkologischen Klinik der Martin-Luther-Universität in Halle, 32,7 % (35/107) aus der Gynäkologischen Klinik des Elisabeth-Krankenhauses in Halle, 15,0 % (16/107) aus der Carl-von-Basedow-Klinik in Merseburg und 3,7 % (4/107) aus der Klinik für Allgemeinchirurgie der Martin-Luther-Universität.

Tabelle 3-2: Herkunft der Ovarialkarzinome

Krankenhaus	Häufigkeit	Prozent
Gynäkologie – MLU	52	48,6
Elisabeth Krankenhaus Halle	35	32,7
Carl-von-Basedow-Klinikum Merseburg	16	15,0
Allgemeinchirurgie – MLU	4	3,7
Gesamt	107	100

3.1.2 Gesamtüberleben und progressfreies Überleben

Das rezidivfreie Überleben sowie der Überlebensstatus wurden durch Anschreiben der zuständigen Einwohnermeldeämter und der jeweiligen lokalen Tumorregister bis zum Februar 2008 verfolgt. Ergänzend konnte der Rezidivstatus anhand des Eingangsmaterials des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität stetig aktualisiert werden. Das Gesamtüberleben wird durch den Zeitpunkt der Operation bis zum Tod der Patientin oder durch das Ende des Erfassungszeitraumes (Ovarialkarzinome: Oktober 2005, BOT: Februar 2008) bestimmt. Die Einteilung des Überlebensstatus erfolgte in beiden Kollektiven nach Bell *et al.*¹¹, um nur die am Tumorleiden verstorbenen Patientinnen in die Überlebensanalysen einzubeziehen. Das Ereignis „Tod infolge des Tumorleidens“ (DOD - *Dead of Disease*), sowie der „Tod aus unsicherem Grund“ (DUC - *Dead of Uncertain Cause*) gelten in den Berechnungen zum Gesamtüberleben als Endpunkte. Für die statistischen Analysen des rezidivfreien Überlebens (Zeit in Monaten von Diagnose des Primärtumors bis zur Diagnose des Rezidivs) ist das Auftreten eines Tumorezidivs als Endpunkt definiert. Alle anderen Patientinnen, die in beiden Analysen diese Ereignisse nicht erreichten, wurden zensiert.

3.2 Histopathologische Untersuchung

3.2.1 Anfertigung der Gewebeschnitte

Das Tumormaterial wurde nach der operativen Entnahme mindestens 24 Stunden in 4 %iger gepufferter Formaldehydlösung fixiert, dann in Paraffin (Schmelzpunkt 56°C) eingebettet. Anschließend wurden mit dem Mikrotom 2-5 µm dünne Schnitte angefertigt und diese auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen.

3.2.2 Histologische Einteilung

Anhand konventioneller HE-Schnitte wurden die Tumoren durch zwei Pathologen (Prof. Dr. S. Hauptmann, Dr. M. Köbel), sowie durch zwei Assistenzärztinnen (Dr. E. Gradhand, K. Balschun) gemäß den aktuellen WHO-Richtlinien¹⁷³ an einem Multihead-Mikroskop histopathologisch reevaluiert. Bei diagnostisch unsicheren Fällen erfolgten immunhistologische Zusatzuntersuchungen, um mögliche ovarielle Metastasen auszuschließen⁷⁷.

3.3 Charakterisierung des Ovarialkarzinomkollektivs

Die vorliegende immunhistochemische Studie erfolgte unter Nutzung eines bereits im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität vorhandenen Ovarialkarzinom-Kollektivs⁶⁵. Dieses wurde in Hinblick auf die Überlebensdaten, das Auftreten von Rezidiven oder das Versterben von Patientinnen aktualisiert. Desweiteren wurden Angaben zum Aszites ergänzt.

3.3.1 Histologische Zusammensetzung der Ovarialkarzinome

Die häufigste histologische Differenzierung im Ovarialkarzinom-Kollektiv war mit 57,9 % (62/107) die seröse. An zweiter Stelle standen mit 13,1 % (14/107) die endometrioid differenzierten, gefolgt von 10,3 % (11/107) als gemischt klassifizierte Karzinome (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Histologische Einteilung der Ovarialkarzinome (nach den WHO-Richtlinien¹⁷³)

	Häufigkeit	Prozent
Serös	62	57,9
Muzinös	2	1,9
Endometrioid	14	13,1
Klarzellig	9	8,4
Transitional	1	0,9
Gemischt	11	10,3
Undifferenziert	8	7,5
Gesamt	107	100

3.3.2 Graduierung

28 % der Ovarialkarzinome (30/107) sind nach dem Silverberg–Grading-System¹⁸⁶ hoch differenzierte (G1), 41 % (44/107) mäßig differenzierte (G2) und 31 % (34/107) schlecht differenzierte (G3) Karzinome (Tabelle 3-4).

3.3.3 Stadieneinteilung nach FIGO

Bei den Ovarialkarzinompatientinnen lagen die Informationen zum FIGO-Stadium vollständig vor. Die genaue Verteilung der einzelnen FIGO-Stadien im Kollektiv ist Tabelle 3-5 zu entnehmen.

Für die statistischen Berechnungen erfolgte die Einteilung der FIGO-Stadien in drei Gruppen: Bei 11,2 % (12/107) der Patientinnen ist das Tumorwachstum auf ein Ovar oder beide Ovarien ohne Oberflächenbeteiligung beschränkt (FIGO IA und IB). Bei 25,2 % (27/107) breitete sich der Tumor bereits im kleinen Becken bzw. auf der ovariellen Oberfläche aus (FIGO IC, II). 63,6 % (68/107) der Patientinnen wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein fortgeschrittenes Ovarialkarzinom entsprechend einem FIGO-Stadium III-IV auf.

Tabelle 3-4: Grading der Ovarialkarzinome nach Silverberg¹⁸⁶

			Häufigkeit	Prozent
Tumorarchitektur	glandulär	1	21	19
	papillär	2	41	38
	solide	3	46	43
Kernpleomorphie	< 2	1	15	14
	< 4	2	55	51
	> 4	3	38	35
Mitosen	Bis 9/10 HPF	1	30	28
	10-24/10 HPF	2	37	34
	>24/10 HPF	3	41	38
Score	3 - 5 Punkte	Grad 1	30	28
	6 - 7 Punkte	Grad 2	44	41
	8 - 9 Punkte	Grad 3	34	31

Tabelle 3-5: Stadieneinteilung nach FIGO in den Ovarialkarzinomen

FIGO-Stadium	Häufigkeit	Prozente
IA	10	9,3
IB	2	1,9
IC	18	16,8
IIA	4	3,7
IIB	3	2,8
IIC	2	1,9
IIIB	9	8,4
IIIC	54	50,5
IV	5	4,7
Gesamt	107	100,0

3.3.4 Art der Operation

Im Kollektiv der Ovarialkarzinome konnte mithilfe der eingesehenen Krankenakten und der enthaltenen Operationsberichte die Art der Operation genau dokumentiert werden (Tabelle 3-6). An dieser Stelle sei bereits auf die zu geringe Anzahl der durchgeführten Lymphnodektomien hingewiesen. Bei nur 35,5 % des Kollektivs (38/107) erfolgte die Resektion der paraaortalen sowie pelvinen Lymphknoten, neben der totalen abdominalen Hysterektomie, der bilateralen Salpingo-Oophorektomie und der Omentektomie. 23,4 % (25/107) der Patientinnen erhielten eine totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie und Omentektomie. In 16,8 % der Fälle (18/107) erfolgte interdisziplinär eine gleichzeitige partielle Kolektomie und in 10,3 % (11/107) ein peritoneales Sampling. Bei 4,7 % der Fälle (5/107) bedurfte es einer ausgedehnten Tumor-Debulking-Operation.

Tabelle 3-6: Art der Operation bei den Ovarialkarzinomen

Art der Operation	Häufigkeit	Prozent
Explorativ	1	0,9
Bilaterale Salpingo-Oophorektomie	3	2,8
Totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie	6	5,6
Totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie und Omentektomie	25	23,4
Totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie und peritonealem Sampling	11	10,3
Totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie und Kolektomie	18	16,8
Totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie und Lymphnodektomie	27	25,2
Totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie, Lymphnodektomie und peritonealem Sampling	11	10,3
Tumordebulking	5	4,7
Gesamt	107	100

3.3.5 Ergebnis der Erstoperation – Tumorrest

Bei 88,8 % (95/107) der Frauen mit einem Ovarialkarzinom waren Informationen zum Tumorrest verfügbar. In 36,4 % (39/107) dieser Fälle konnte eine komplette Tumorreduktion erreicht werden, 52,4 % (56/107) der Patientinnen im Kollektiv wiesen einen Tumorrest auf (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Angaben zum Tumorrest im Ovarialkarzinom-Kollektiv

Tumorrest	Häufigkeit	Prozent
kein Rest	39	36,4
<1cm	22	20,6
>=1cm	34	31,8
Fehlend	12	11,2
Gesamt	107	100

3.3.6 Aszites

Bei 79 von 107 Ovarialkarzinompatientinnen (73,8 %) ist intraoperativ Aszites nachgewiesen worden. Von diesen Aszites-positiven Fällen wiesen 44 Patientinnen (55,7 %) < 500ml und 35 Patientinnen (44,3 %) > 500 ml Flüssigkeit in der freien Bauchhöhle auf.

3.3.7 Lymphknotenbefall

Eine Lymphnodektomie wurde nur bei 38 von 107 Patientinnen (35,5 %) durchgeführt. Davon hatten bereits 16 Patientinnen (42 %) Lymphknotenmetastasen (N1) und 22 Patientinnen (58 %) sind als N0 klassifiziert.

3.3.8 Art der Chemotherapie

Mithilfe der Krankenakten konnten Informationen zur Art der Chemotherapie eingeholt werden (Tabelle 3-8). 83 von 107 Patientinnen (77,6 %) erhielten 6 Zyklen einer platinhaltigen Chemotherapie, davon 62 Cisplatin plus Paclitaxel. 2 Patientinnen (1,9 %) wurden andere Chemotherapietypen verabreicht. 6 Patientinnen (5,6 %) lehnten eine Chemotherapie ab. 7 Patientinnen (6,5 %) verstarben vor Beginn der Chemotherapie. Von 4 Patientinnen (3,7 %) fehlten die Angaben bezüglich einer Chemotherapie. 5 FIGO IA-Patientinnen (4,7 %) erhielten keine Chemotherapie.

Tabelle 3-8: Art der Chemotherapie bei den Ovarialkarzinomen

Chemotherapie	Häufigkeit	Prozent
Carboplatin und Taxol	62	57,9
Andere platinhaltige Therapie	16	15
Platin - Monotherapie	5	4,7
Andere Chemotherapie	2	1,9
Keine Chemotherapie wegen FIGO IA	5	4,7
Chemotherapie verweigert	6	5,6
Vor Chemotherapie verstorben	7	6,5
Fehlende Angaben	4	3,7
Gesamt	107	100

3.3.9 Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben

Für 105 Frauen von 107 (98,1 %) lagen Informationen zum Überleben vor (Abb. 3-1). Insgesamt waren 42 Patientinnen am Ovarialkarzinom verstorben (DOD) und bei 7 Frauen war unklar, ob sie ihrem Tumorleiden erlagen (DUC). 6 Patientinnen verstarben nicht an ihrem Tumor, sondern aufgrund anderer Ursachen (DOC). In die statistischen Analysen des Gesamtüberlebens wurden 49 Todesfälle (DOD und DUC) berücksichtigt, die übrigen wurden zensiert. Von den 50 Patientinnen, die zum Ende des Beobachtungszeitraumes noch am Leben waren, wiesen 17 Frauen einen Krankheitsprogress auf (AWPD), 12 Frauen zeigten einen stabilen Krankheitszustand (AWS) und bei 21 Patientinnen war das Tumorleiden nicht mehr nachweisbar.

Die mediane Überlebenszeit betrug 56 Monate (0-102,0 Monate) und die 5-Jahresüberlebensrate 47,2 %. Diese Ergebnisse entsprechen dem bundesdeutschen Durchschnitt der Jahre 1980-2004¹.

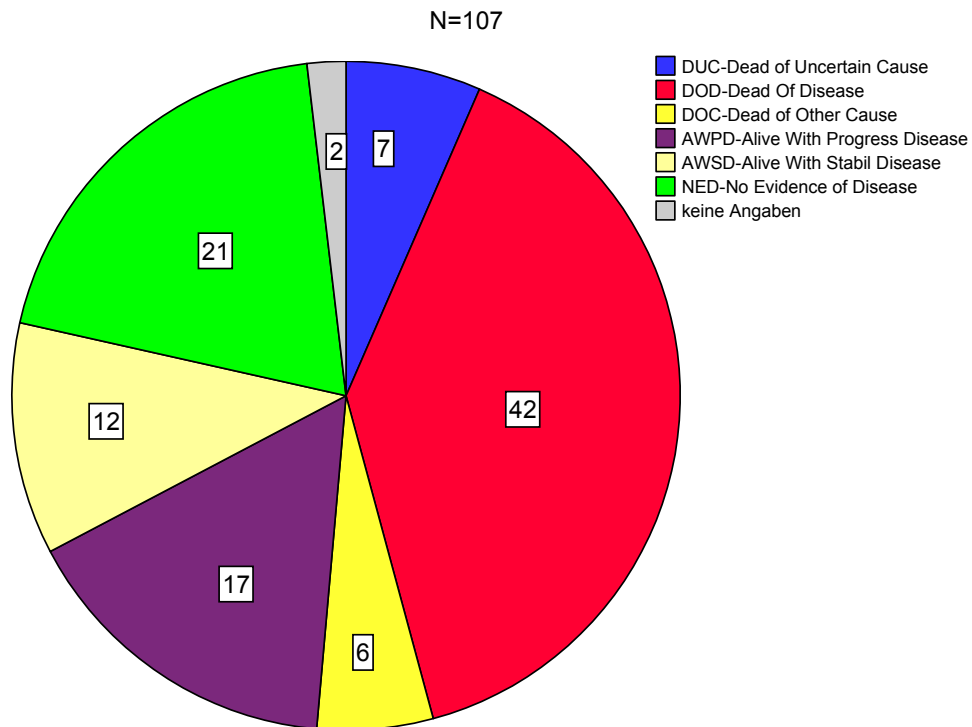


Abb. 3-1: Überlebensstatus der Ovarialkarzinompatientinnen, Einteilung des Überlebensstatus nach Bell *et al.*¹¹

Der Rezidivstatus der Patientinnen des Ovarialkarzinomkollektivs wurde anhand des Eingangsmaterials des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität bis zum Februar 2008 stetig aktualisiert. Von 87 der 107 Ovarialkarzinompatientinnen (81,3 %) existieren Informationen über den Rezidivstatus (Abb. 3-2). 73,6 % (64/87) dieser Frauen wiesen zum Ende des Beobachtungszeitraum ein Rezidiv auf. 21,5 % (23/87) konnten als rezidivfrei klassifiziert werden. Die mediane rezidivfreie Zeit liegt bei 15,5 Monate (2,4-101,1 Monate). Die 5-Jahres-Rezidivfreie-Zeit-Rate beträgt 9,1 %.

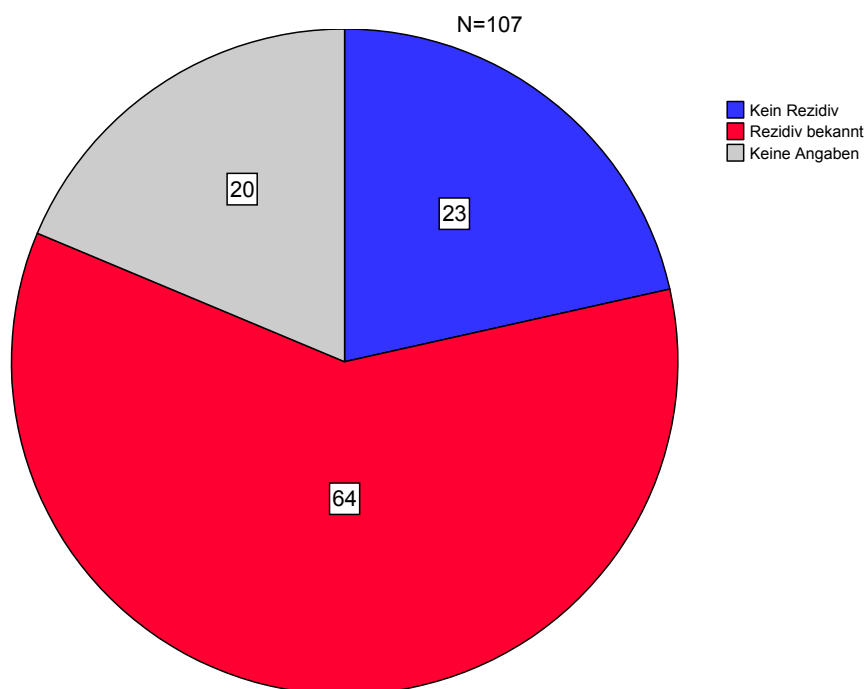


Abb. 3-2: Rezidivstatus der Ovarialkarzinompatientinnen

3.4 Labormaterialien

3.4.1 Chemikalien und Enzyme

AEC-Chromogen-Substratlösung	Zytomed®
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM)	BioWhittaker, Verviers, Niederlande, cat#BE12-707F
Essigsäure p.a.	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol absolut	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Fetales Kälberserum (FCS), cat#3402-P992203	PAN Biotech, Aidenbach
Formaldehydlösung 37 %	Merck, Darmstadt
MCDB 105 Medium, cat# M-6395	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Medium 199, cat# M-2154	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumcitrat (pH 6,0)	Zytomed®, Berlin, Deutschland
NuPage LDS Probenpuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPage MES SDS Laufpuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPage Transfer- Puffer 20x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPageSample Reducing Agent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Horseradish Peroxidase (HRP)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Propan-2-ol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
RPMI-1640 Medium	PAA, Cölbe
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)- aminomethan (Tris-Base)	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck, Darmstadt
TRS-Puffer	DAKO® high pH, 10x Konzentrat, S 3307

Trypsin / EDTA – Lösung 0,5 % / 0,2 % (w/v) in PBS (10-fach konzentriert)	Biochrom KG, Berlin
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tween 20	Serva, Heidelberg
Western Blot Recycling Kit	Alpha Diagnostic International, San Antonio, USA
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

3.4.2 Kits, Kulturmedien, Lösungen

Immunhistochemie-KIT	Zytomed®, Berlin, Deutschland
AEC-Chromogen-Substratlösung	Zytomed®
DMEM, serumhaltig:	500 ml DMEM 10 ml L-Glutamin 50 ml FCS
DMEM, serumfrei:	500 ml DMEM 10 ml L-Glutamin
Hämalaun nach Mayer	1 g Hämatoxylin 0,2 g Natriumjodat 50 g Aluminiumkaliumsulfat 50 g Chloraldehyd 1 g Zitronensäure
10 x PBS:	82,3 g Di-Natriumhydrogenphosphat 23,5 g Natriumdihydrogenphosphat 40,0 g Natriumchlorid
WB- Blocking-Puffer:	100 ml 1xPBS 100 µl Tween 20 5 g Magermilchpulver
WB-Transferpuffer : (nach Verdünnung 20 Vol% Methanol frisch zugeben):	25 ml NuPage Trans-ferpuffer (20x) 250 µl NuPage Antioxidant Ad 500 ml H ₂ O
Western Blot Recycling Kit	Alpha Diagnostic International, San Antonio, USA

3.4.3 Antikörper

Antikörper	Klon	Spezies	Hersteller	Verd.	Zeit	Temp.
Cyr61 (CCN 1)	Polyklonal (H-78)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1: 50	30 min	RT
CTGF (CCN2)	Monoklonal (clone 88430)	Maus	R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA)	1: 200	30 min	RT
Östrogen Rezeptor	Monoklonal (Clone SP1)	Kaninchen	Lab Vision Corporation, (Fremont, CA, USA)	1:500	30 min	RT

3.4.4 Verbrauchsmaterialien

Chromatographiepapier, 3MM CHR	Whatman, Maidstone, England
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger SuperFrostPlus®	Menzel-Gläser, Braunschweig
Filter	Schleicher & Schuell
Microtest Zellkulturplatten 96-well	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Nu Page Bis Tris Gel 10 %	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Parafilm	American National Can, Menasha, USA
Petrischalen für Zellkultur	Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Röntgenfilme Biomax MS	Eastman Kodak, Rochester, USA
Serologische Pipetten	Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
6-well Zellkulturplatten	Bio- Rad Laboratories, Hercules, USA
Zellschaber	Costar, Corning, USA

3.4.5 Geräte

Abzug	Trox Technik, Neukirchen-Vluyn
Autoklav	Systec, Wetzlar
Dampfgarer Multi-Gourmet Braun®	Braun GmbH, Kronberg/ Taunus
Digitalkamera Coolpix 990	Nikon GmbH, Düsseldorf
Elektrophoresekammern (Agarosegele) Cell Gt	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektrophoresenetzgerät Power Pac HC	Bio-Rad, Hercules, USA
Heizblock 100°C	Roth, Karlsruhe
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments, Schwabach
pH-Meter ph211	Hanna Instruments Deutschland, Kehl am Rhein
Photometer Smart Spec 3000	Bio-Rad, Hercules, USA
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Schlittenmikrotom „Histoschnitt 2000“	Fa. Reichert-Jung, Nußloch
Schüttelinkubator Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttler KL2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Shandon Coverplates™	Shandon, Deutschland
Spektrophotometer UV160A	Shimadzu Deutschland, Duisburg
Thermocycler, Mastercycler- Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Transblot Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Ultrazentrifuge Optima L90K	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Zellkulturbrutschrank BB16	Heraeus, Hanau
Zellkulturwerkbank	Kojair, Vilppula, Finland
Zellkulturmikroskop Eclipse TS100F mit Epifluoreszenzeinrichtung	Nikon GmbH, Geschäftsbereich Mikroskope, Düsseldorf

3.5 Western Blot-Analyse / Zelllinien

Um die beiden kommerziell erworbenen Antikörper Cyr61 und CTGF vor den immunhistochemischen Analysen auszutesten, erfolgte zunächst eine Western-Blot-Analyse an im Institut etablierten Zelllinien.

3.5.1 Zellkultur - Anzucht

Die Ovariakarzinomzelllinien (Übersicht s. Tabelle 3-3) wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % FCS kultiviert. Für HOSE wurde MCDB 105 Medium und Medium 199 in gleichen Anteilen mit 15 %igem FCS-Zusatz verwendet. Die Kultivierung der Kolonkarzinomzelllinien HT-29, HRT-18 und CX-2 erfolgte in RPMI-Medium und 10 % FCS.

Tabelle 3-9: Übersicht der verwendeten humanen Zelllinien

Name	Herkunft	Referenzen
HOSE	Oberflächenepithel des Ovars, durch HPV-Transfektion immortalisiert	Tsao et al., 1995 ²¹⁰
Caov-42	Seröses Cystadenokarzinom des Ovars (Aszites), G2	J Nat Cancer Inst 1984;72:513; Br J Cancer 1989;59:527
ES-2	Klarzelliges Ovariakarzinom	Lau et al., 1991 ¹¹⁴
OAW-42	Cystadenokarzinom	Wilson, 1984
OVCAR-3	Seröses Karzinom des Ovars	Hamilton et al., 1983 ⁶⁸
SKOV-3	Adenokarzinom	Fogh et al., 1977 ⁵⁴
HT-29	Kolorektales Adenokarzinom	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK
HRT-18	Kolorektales Adenokarzinom	J Gen Virol 1981;56:451
CX-2	Kolorektales Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg, TZB 61005

Inkubiert wurde im Zellkulturschrank in wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C und einem 5 %igem Volumenanteil CO₂. Alle 3-4 Tage wurde das Kulturmedium unter sterilen Bedingungen gewechselt. Bei ca. 80 %iger Konfluenz erfolgte die Passage der Zellen folgendermaßen: Verbrauchtes Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS-Puffer gespült. Nach erneuter Absaugung wurde 1 ml frisches Trypsin über den Flaschenboden verteilt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C, bis sich alle Zellen vom Untergrund gelöst und vereinzelt hatten. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 5 ml RPMI-Medium mit 10 % FCS gestoppt. Von der Zellsuspension wurden in Abhängigkeit von der Zelllinie 0,25 ml bis 5 ml in der Kulturflasche belassen und diese mit Medium auf 10 ml aufgefüllt.

3.5.2 Proteinisolierung

Nach Erreichen einer hohen Zelldichte wurden im Rahmen einer Passage die Zellen mit Trypsin abgelöst und danach die Trypsinwirkung mit frischem Medium gestoppt. Das durch 7-minütige Zentrifugation bei 300x g gewonnene Zellpellet wurde je nach Größe in 100 bis 200 µl Laemmli-Puffer (zzgl. 5 % β-Mercaptoethanol) inkubiert, mit Hilfe einer Insulinspritze homogenisiert und für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.5.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Im Anschluss wurde die BRADFORD-Methode angewandt, um die Proteinmengen der einzelnen Zelllinien direkt zu vergleichen. Grundlage dieses Verfahrens ist die Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G 250 nach Bindung an Proteine (von 465 nm ohne Protein, 595 nm nach Proteinbindung). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist das Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die detaillierte Durchführung erfolgte nach der Anleitung des Protein-Assays der Firma Bio-Rad.

3.5.4 Elektrophorese und Transfer

Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung 1mm starker 10 %-Acrylamid-Gele NuPAGE® der Firma Invitrogen. Es ergaben sich folgende Probenzusätze, die das Laufverhalten der Proteine in der Gelelektrophorese beeinflussten: die Zugabe von 5µl NuPAGE® LDS Sample Buffer und 2µl NuPAGE® Reducing Agent beschwerte und markierte die Probe. Der komplette Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

50 µg Protein

5 µl LDS Sample Buffer

2 µl NuPAGE® Reducing Agent

ad 20 µl Aqua dest.

Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 70 °C gekocht und gemeinsam mit dem Größenmarker Standard See Blue Plus2 (Invitrogen) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V. Vor dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden Gel, Membran und Whatman-Papier für 30 Minuten in Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte im Semi-Dry-Verfahren bei 18 V. Durch Inkubation der Membran über Nacht in Blocking-Puffer wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert.

3.5.5 Antikörperbindung und Belichtung

Der Cyr61- und der CTGF-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt und dazu entsprechend mit Blocking-Puffer verdünnt. Beim Aktin-Antikörper betrug die Verdünnung 1:1000 (in Blocking-Puffer). Die Primärantikörper-Inkubation erfolgte über 2 Stunden bei Raumtemperatur.

Danach wurde 2-mal mit Aqua dest. und 1-mal mit PBS, 0,1 % Tween 20 für jeweils 5 Minuten gewaschen. Der Sekundärantikörper, Meerrettichperoxidase-gebunden und 1:5000 in Blocking-Puffer verdünnt, wurde 90 Minuten mit der Membran inkubiert. Dann wurde wiederum, wie oben beschrieben, gewaschen. Für die Chemolumineszenzreaktion wurde das ECL Western blotting detection reagent and analysis system von Amersham Biosciences nach den Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend konnten hierdurch ECL-Hyperfilme belichtet werden. Da das Molekulargewicht von β -Aktin bei 42 kD liegt, mussten für die Auftragskontrolle die gebundenen Antikörper von den Membranen gewaschen werden, da sich sonst die Aktin- und die Cyr61- bzw. die CTGF-Bande überlagern würden. Hierzu wurde das Western Blot Recycling Kit der Firma Alpha Diagnostic International verwendet.

3.6 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Analysen dieser Studie basieren auf der indirekten Avidin–Biotin-Komplex-Methode. Sie erfolgten manuell mit konventionellen Shandon Coverplates™ und dem Immunhistochemie KIT der Firma Zytomed®.

Je Patientin standen 1 bis 17 Paraffinblöcke Tumormaterial zur Verfügung (Median=5). Davon wurde ein repräsentativer Tumorblock ausgewählt und mit einem Schlittenmikrotom serielle 2-5 μ m dünne Schnittpräparate erstellt. Dabei wurden speziell beschichtete Starfrost®-Objektträger zur besseren Oberflächenhaftung verwendet. Jeweils ein Schnitt wurde konventionell mit HE zur Kontrolle des noch vorhandenen Tumorgewebes und zur topologischen Orientierung gefärbt.

Nachdem die Leerschnitte über Nacht bei 58 °C im Brutschrank trockneten, wurden sie anschließend im Tauchbecken mit Xylol (2 x 10 min), einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100 %, 2 x 96 %, 80 %, 70 % Ethanol für jeweils 5 min) und Wasser entparaffiniert.

Die Demaskierung der Antigene erlangte man bei der Cyr61-Färbung durch 40-minütiges Erhitzen der Objektträger in Natriumzitat bei pH 6 im 94 °C Wasserbad. Bei der CTGF-Färbung konnte eine stärkere Farbeintensität durch 30-minütige Erhitzung der mit TRS-Puffer (Target Retrieval Solution, pH 9, DAKO®) bedeckten Objektträger in einem handelsüblichen Dampfgerät unterhalb des Siedepunktes bei 99 °C erreicht werden.

Nach 20-minütigem Abkühlen und einem kurzen Aqua dest. – Tauchbad wurde mit 3 % H₂O₂ „geblockt“. Daraufhin wurden die Objektträger in die Shandon Coverplates™ luftblasenfrei aufgelegt, in der Halterung eingespannt und mit Aqua dest. gespült. Zwischen den folgenden standardisierten Reaktionsschritten der ABC-Methode wurde bei der Cyr61-Färbung jeweils für 5 min mit PBS- und bei der CTGF-Färbung jeweils für 5 min mit TRS-Puffer (Target Retrieval Solution, pH 9, DAKO®) gespült. Die Primärantikörper wurden 1:50 (Cyr61) und 1:200 (CTGF) jeweils entsprechend mit PBS bzw. TRS-Puffer verdünnt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Danach wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus) hinzugegeben (4 Tropfen, 10 min). Als drittes Reagens wirkte an Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin ebenfalls für 10 min (4 Tropfen) ein. Nach einem letzten Waschen der eingespannten Objektträger in den jeweiligen Puffern wurden sie aus den Shandon Coverplates™ ausgespannt und von der schräg-vertikalen in eine horizontale Lage transferiert. Auf der ebenen Fläche erfolgte dann die 10- minütige Färbung mit dem AEC–Chromogen-Substrat (Aminoethylcarbazol; Zytomed®, Berlin, Deutschland). Anschließend Abstoppen der Reaktion und Spülen mit Aqua dest. Die Gegenfärbung erfolgte für sechs Minuten mit Hämalun und abschließendes Abspülen der Präparate unter fließendem Wasser. Alle Präparate wurden nach Routineprotokoll eingedeckt. Um die täglichen sowie interexperimentellen Schwankungen gering zu halten, wurden die Präparate nach entsprechender Austestung der idealen Antigenmaskierung und Titration der optimalen Primärantikörper-Konzentration an vier aufeinanderfolgenden Tagen immunhistochemisch gefärbt. Zu jeder Reaktion erfolgten Positiv- und Negativkontrollen.

3.6.1 Positiv- und Negativkontrollen

In jeder der Färbereihen wurde zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse eine Negativkontrolle und zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse eine Positivkontrolle mitgeführt. Positivkontrollen dienen der Überprüfung der Sensitivität des verwendeten Antikörpers. Bei jeder Versuchsreihe wurde mindestens ein Präparat mitgeführt, das sicher das Antigen enthielt. Als Positivkontrollen für Cyr61 und CTGF wurde je ein Objektträger mit Querschnitten der Tuba uterina genutzt (Abb. 3-12 und 3-13). Daneben wurde für CTGF als weitere Positivkontrolle ein Präparateschnitt mit einer Corpus luteum-Zyste mitgefärbt, um wie bereits von Liu *et al.*¹²⁶ beschrieben, eine starke Expression in der Granulosaluteinzellschicht nachzuweisen (Abb. 3-14 und 3-15). Durch mitgeführte Negativkontrollen wird die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion überprüft. Für die Negativkontrollen wurde je Färbereihe ein doppelt vertretener Objektträger mitgeführt, der das Antigen sicher enthielt. Bei einem der gleichen Präparate wurde der primäre Antikörper durch eine Negativkontrolllösung substituiert. Hätte das Kontrollpräparat eine positive Färbereaktion aufgewiesen, so würde dies auf eine unspezifische Proteinbinung durch andere Antikörperreagenzien oder eine fehlerhafte Probenaufbereitung hinweisen. Darüberhinaus zeigen diese Kontrollen auch methodisch bedingte Schwankungen der Färbeintensität von Färbeserie zu Färbeserie auf.

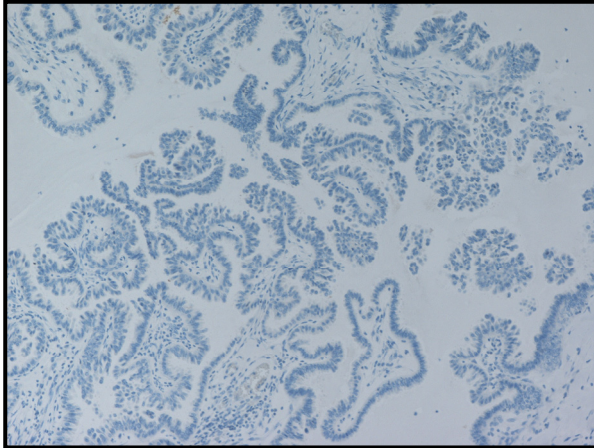


Abb. 3-3: Negativkontrolle, seröser BOT (SBOT) ohne Primärantikörper, 100fach vergrößert

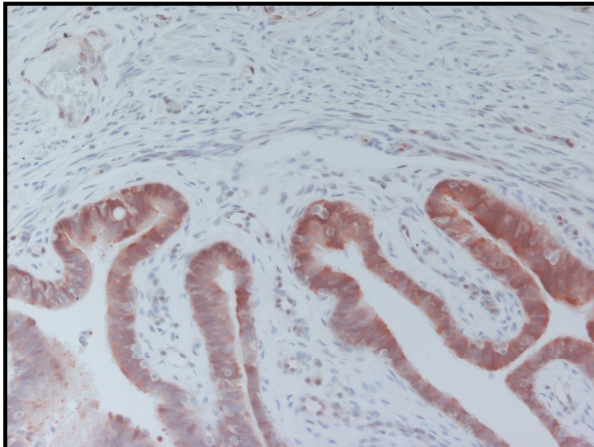


Abb. 3-4: Cyr61-Positivkontrolle - Tubenepithel, 200fach vergrößert, daneben schwach Cyr61-positive Gefäßendothelien

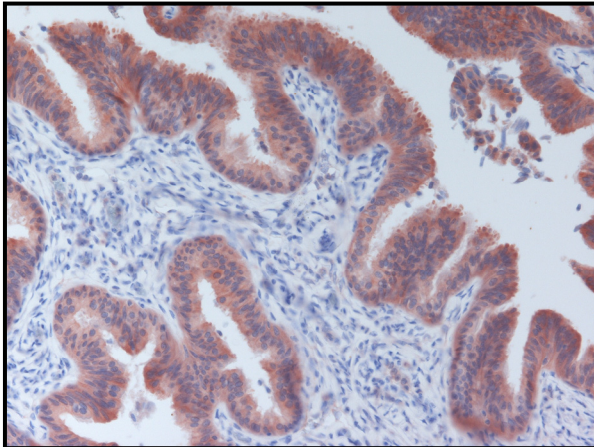


Abb. 3-5: CTGF-Positivkontrolle: Tubenepithel, 200fach vergrößert

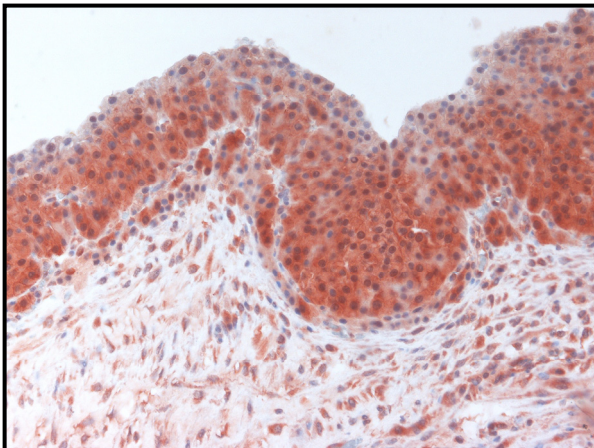


Abb. 3-6: Weitere CTGF-Positivkontrolle, Granulosaluteinzellen einer Corpus luteum Zyste, sowie CTGF-exprimierende Endothelien und Stromazellen, 200fach vergrößert

3.6.2 Immunhistochemische Auswertung

Alle Präparate wurden nach immunhistochemischer Färbung durch zwei Untersucher (M.K. und K.B.) unabhängig voneinander und ohne Kenntnis der klinischen Daten an einem Lichtmikroskop der Firma Zeiss ausgewertet. Eine erste Gewebeschnittkontrolle sowie die Orientierung nach der Tumorzellregion erfolgten dabei anhand der HE-Schnitte. Die tumorangrenzenden nicht-neoplastischen Gewebeanteile wurden mitbeurteilt, um unspezifische Reaktionen nicht zu übersehen. Bei stark voneinander abweichenden Ergebnissen erfolgte der Konsens am Multi-head-Mikroskop. In der vorliegenden Arbeit fand die semiquantitative Abschätzung nach Remmele und Stegner¹⁵⁶ in Anlehnung an die immunhistochemische Rezeptorenbestimmung beim Mammakarzinom, Anwendung. Dabei wird ein sogenannter immunreaktiver Score (IRS) verwendet, der sich aus dem Prozentsatz positiver Zellen und der Intensität der Färbung zusammensetzt, um eine Standardisierung zu ermöglichen. Nach der Formel $IRS = PP \times SI$ ergeben sich Werte von 0 – 12. Ein $IRS > 3$ gilt allgemein als positive Proteinexpression.

Tabelle 3-10: SI (Staining Intensity) semiquantifiziert die Färbeintensität, wobei die vorherrschende Färbeintensität maßgebend ist.

0	negatives Färbeergebnis
1	schwaches Färbeergebnis
2	mäßiges Färbeergebnis
3	starkes Färbeergebnis

Tabelle 3-11: Die Abschätzung des Prozentsatzes positiver Zellen (PP) erfolgte nach dem Verhältnis positiver zu negativer Tumorzellen:

0	< 5 %
1	<10 %
2	11 -50 %
3	51 -80 %
4	>80 %

In der vorliegenden Arbeit wurde für die beiden CCN-Proteine ein IRS von 0 – 3 als keine bzw. nur schwache (negativ); ein IRS zwischen 4 – 6 als moderate und ein IRS zwischen 8 -12 als starke Proteinexpression (positiv) definiert (Tabelle 3-12). Zusätzlich zur Cyr61/CTGF-Proteinexpression in den Tumorzellen wurde auch ein positives Färbeergebnis im Stroma und in den Gefäßendothelien protokolliert.

Tabelle 3-12: Cyr61-/ CTGF-Protein-Expressions-Score

IRS	Expression
0 – 3	keine/ schwach
4 – 6	mäßig
8 – 12	stark

3.7 Statistik

Für alle statistischen Datenanalysen wurde die SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Software Version 15.0 genutzt.

Die Korrelationen zwischen der Expression von Cyr61 und CTGF mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern erfolgte mit Hilfe des Chi²-Tests nach Pearson. Der Vergleich der Cyr61- und CTGF-Expressionslevel in den BOT versus Ovarialkarzinomen erfolgte durch den Mann-Whitney-U-Test, da es sich um zwei unabhängige Gruppen handelt. Die Ergebnisse für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben resultierten aus der Kaplan-Meier Methode für die univariate Überlebensanalyse. Mittels Log-Rank-Test konnten die verschiedenen Überlebenskurven verglichen werden. Alle in dieser Analyse signifikant mit dem Überleben korrelierten Variablen wurden nach der univariaten Cox-Regression, in der multivariaten Analyse nach dem Cox proportional hazard regression model auf ihre Unabhängigkeit überprüft. p-Werte < 0,05 gelten als signifikant, Werte < 0,01 als sehr signifikant und Werte <0,001 als hoch signifikant. Lag das Signifikanzniveau im Bereich von 5 bis 10 % ($p > 0,05$ bis $p = 0,10$), wird der gefundene Zusammenhang bzw. Unterschied im Sinne eines Trends interpretiert. Zur besseren Kennzeichnung wird in der vorliegenden Arbeit jeder signifikante p-Wert „**fett**“ gedruckt. Für Patientinnen, die im Ovarialkarzinomkollektiv bis zum Oktober 2005 und im BOT-Kollektiv bis zum Februar 2008 verstorben waren, konnte die echte Überlebenszeit berechnet werden. Die übrigen Fälle wurden zu den jeweiligen Terminen zensiert.

4. ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Erstellung eines BOT-Kollektivs. Daran schloss sich die immunhistochemische Evaluation der Proteinexpression von Cyr61 und CTGF sowohl im bereits vorhandenen Ovarialkarzinomkollektiv als auch bei den BOT an. Weiterhin erfolgte die Korrelation der immunhistochemischen Daten mit klinisch-pathologischen Parametern, sowie dem Gesamtüberleben und dem rezidivfreien Überleben, um die Frage nach einer möglichen diagnostischen oder prognostischen Bedeutung dieser Proteine zu klären.

4.1 Charakterisierung des BOT-Kollektivs

4.1.1 Altersverteilung der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnose

Das Alter aller in die Untersuchungen eingegangenen Patientinnen mit einem BOT lag zum Diagnosezeitpunkt im Mittel bei 48,0 Jahren. Die jüngste Patientin war 15,4 Jahre alt, die älteste 95,6 Jahre. Damit waren sie im Vergleich zu den Ovarialkarzinompatientinnen mit einem Durchschnittsalter von 64,4 Jahren (41 bis 89 Jahre) 16,4 Jahre jünger.

4.1.2 Stadieneinteilung nach FIGO

77,2 % der Patientinnen mit einem BOT (71/92) konnten rückwirkend anhand der Krankenhausakten sowie des im pathologischen Institut eingegangenen Materials einem FIGO-Stadium zugeordnet werden. Bei 22,8 % der Patientinnen (21/92), fast ausschließlich von externen Instituten eingesandte referenzpathologische Konsultationsfälle, fehlten die Angaben zum intraabdominalen Befund. Die einzelnen FIGO-Stadien der BOT können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Tabelle 4-1: Stadieneinteilung nach FIGO in den BOT

FIGO-Stadium	Häufigkeit	Prozent
IA	22	31,0
IB	3	4,2
IC	12	16,9
IIB	1	1,4
IIC	1	1,4
IIIA	26	36,6
IIIB	2	2,8
IIIC	4	5,6
Gesamt	71	100,0

Zur statistischen Auswertung wurden die FIGO-Stadien in drei Gruppen eingeteilt:

- (1) 35,2 % der Patientinnen (25/71) sind als FIGO Ia und Ib klassifiziert worden. Bei ihnen ist der BOT-Tumor auf das Ovar ohne Oberflächenbeteiligung beschränkt.

- (2) 19,7 % der Frauen (14/71) bilden eine zweite Gruppe, in der die Tumorausdehnung die ovarielle Oberfläche bzw. das kleine Becken einbezieht.
- (3) Der Hauptteil der Patientinnen, 45,1 % (32/71) ist dem FIGO-Stadium III, mit nachweisbarer peritonealer Tumorausbreitung jenseits des kleinen Beckens bzw. mit lymphonodalen Implants zuzuordnen.

4.1.3 Art der Operation

Zu 64,2 % (59/92) der BOT des Kollektivs lagen Angaben zur chirurgisch durchgeführten Operationsart vor. Zu den übrigen 35,8 % (33/92) konnten diesbezüglich keine Informationen eingeholt werden, da es sich um Referenzfälle handelte. Die detaillierte Darstellung der vielfältigen Operationsmodi ist in Tabelle 4-2 aufgeführt. Am häufigsten (13 Fälle) erfolgte die totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie, Omentektomie und peritonealem Sampling sowie die alleinige totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie (10 Fälle). Bei insgesamt 7 Patientinnen wurde die Operation, Salpingo-Oophorektomie inklusive Hysterektomie und Omentektomie, durch die Lymphnodektomie und bei 32 Patientinnen durch ein peritoneales Sampling komplettiert.

Tabelle 4-2: Art der Operation bei den BOT

Art der Operation	Häufigkeit	Prozent
Explorativ	4	4,3
Unilaterale Salpingo-Oophorektomie	8	8,7
Bilaterale Salpingo-Oophorektomie	1	1,1
Totale abdominale Hysterektomie mit unilateraler Salpingo-Oophorektomie	4	4,3
Totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie	10	10,9
Totale abdominale Hysterektomie mit unilateraler Salpingo-Oophorektomie, Omentektomie und peritoneales Sampling	3	3,3
Totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie, Omentektomie und peritoneales Sampling	13	14,1
Totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie, Omentektomie, peritoneales Sampling und Appendektomie	9	9,8
Totale abdominale Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie, Omentektomie, peritoneales Sampling und Lymphnodektomie	7	7,6
Fehlende Angaben	33	35,8
Gesamt	92	100

4.1.4 Chemotherapie

Bei 15 Patientinnen (16,3 %) erfolgte aufgrund der initialen Fehldiagnose eines Ovarialkarzinoms eine Chemotherapie. Darunter waren 4 Patientinnen, die 6 Zyklen Carboplatin und Taxol, 3 Patientinnen, die eine andere platinhaltige, und 8 weitere Frauen, die eine andere nicht platinhaltige (Cyclophosphamid) Chemotherapie erhielten. Bei 28 Patientinnen (30,4 %) mit einem BOT-Tumor erfolgte keine adjuvante Chemotherapie. Von 49 Patientinnen (53,3 %) fehlten die Angaben.

4.1.5 Borderline-Tumoren - Implantate

Bei 94,6 % (86/92) der Patientinnen existierten Daten zum Vorkommen von Implantaten. 62,8 % (54/86) der BOT-Patientinnen wiesen keine peritonealen Implantate auf. 37,2 % (32/86) der Patientinnen hatten mindestens 1 bis maximal 9 Implantate (Abb. 4-1). Von 30 Patientinnen konnten die Implants histopathologisch reklassifiziert werden.

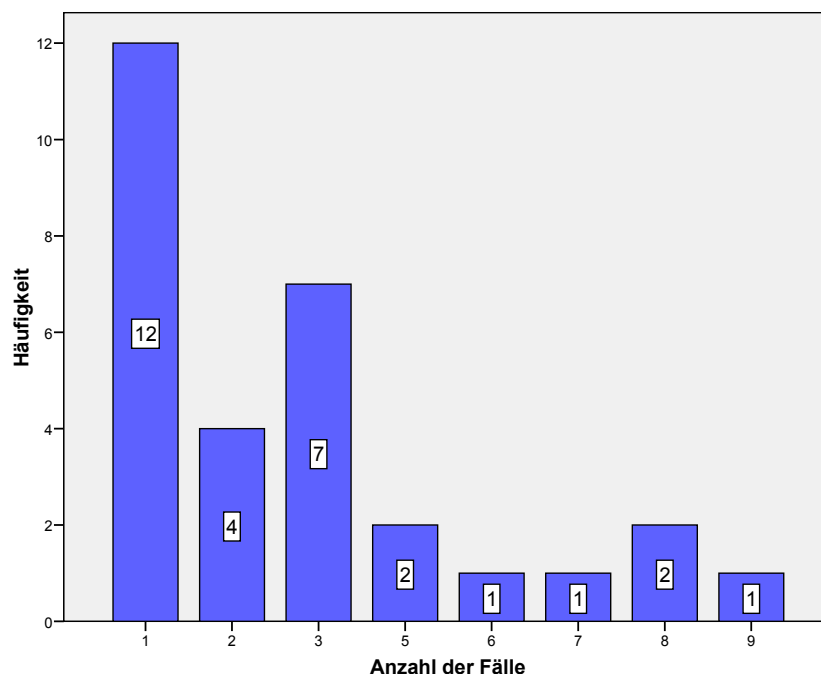


Abb. 4-1: Anzahl der Implantate je Fall

4.1.6 Krankheitsverläufe

Über die Einwohnermeldeämter konnten die Informationen zum Überleben der BOT-Patientinnen bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes im Februar 2008 zusammengetragen werden. In 86 % (62/72) war das Tumorleiden nicht mehr nachweisbar (NED - *No Evidence of Disease*). 3 Frauen (4,2 %) wiesen einen stabilen Krankheitszustand (AWS - *Alive With Stable Disease*) auf. 7 Frauen verstarben im Beobachtungszeitraum. Darunter 4 (sehr alte) Patientinnen (5,6 %), welche aufgrund vorliegender anderer Todesursachen (DOC - *Dead of Other Cause*) für die Überlebensanalysen zensiert wurden (Abb 4-2). 2 Frauen (2,8 %) verstarben infolge ihres Tumorleidens (DOD - *Dead of Disease*), eine (1,4 %) verstarb nicht sicher am Tumor (DUC - *Dead of Uncertain Cause*).

Die letztgenannte, nicht sicher am BOT verstorbene Patientin war bei Diagnosestellung des linksseitig lokalisierten, mikropapillär wachsenden serösen BOT 81 Jahre alt und bedurfte bei einem FIGO Ia-Stadium keiner weiteren Therapie. Operativ erfolgte bei der Patientin eine Hysterektomie, die bilaterale Salpingo-Oophorektomie, jedoch kein adäquates peritoneales Sampling. Sie verstarb nach 115,16 Monaten mit unklarer Ursache.

Eine der beiden sicher an den Folgen des BOT verstorbenen Patientinnen (BOT-Kollektivnummer 28) war zum Zeitpunkt der Diagnose eines zystischen, rechtsseitig lokalisierten, muzinösen Borderline-Tumor vom intestinalen Typ, 30 Jahre alt (FIGO Ia). 22,4 Monate später zeigte die Patientin ausgedehnte pulmonale Infiltrate eines muzinösen zytischen Tumors, mit identer Histomorphologie zum diagnostizierten BOT des Ovar. Trotz subtotaler Einbettung und histologischer Untersuchung des Tumormaterials (Ovar und Lunge) konnte keine Invasivität nachgewiesen werden. Die Patientin verstarb im respiratorischen Versagen.

Die zweite Patientin (BOT-Kollektivnummer 29) war bei Diagnosestellung eines bilateralen serösen BOT 38 Jahre alt. Als Ausgangssituation lag nach adäquater Erstoperation (abdominale Hysterektomie, bilaterale Salpingo-Oophorektomie, Omentektomie, peritoneales Sampling und Appendektomie) ein FIGO IIIa-Stadium mit 8 peritonealen nicht invasiven Implantaten (1 NIEI, 7 NIDI) vor. Bereits nach 6,28 Monaten erlitt die Patientin ein Rezidiv im Restovar rechts und im Peritoneum. Histologisch lag das klassische Bild eines Psammomkarzinoms vor. Es erfolgte eine Chemotherapie (8 Zyklen ohne weitere Angaben). Die Patientin verstarb nach 45,16 Monaten.

Die mediane Überlebenszeit beträgt für die drei in der Überlebensstatistik unzensierten Todesfälle (DOD, DUC) 60,9 Monate.

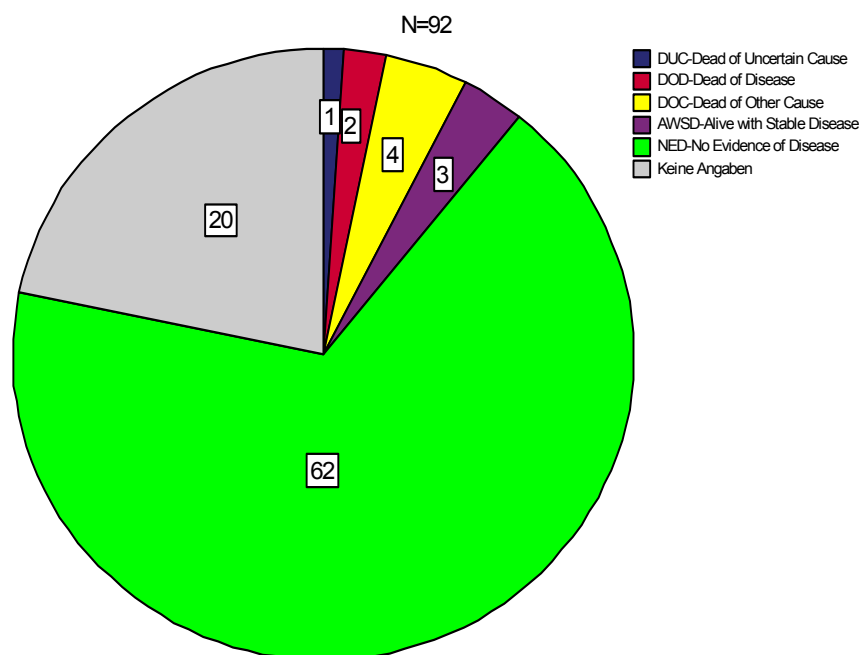


Abb. 4-2: Überleben der BOT-Patientinnen

In Abb. 4-3 sind die Überlebenskurven der BOT-Patientinnen (linkes Diagramm) denen der Ovarialkarzinom-Patientinnen (rechtes Diagramm) gegenübergestellt. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben der 72 BOT-Patientinnen lag mit 96,2 % weit über dem der 105 Ovarialkarzinompatientinnen (47,2 %). Insgesamt verstarben 3 von 72 BOT-Patientinnen (4,2 %) an den Folgen ihres Tumorleidens. Dagegen waren im Kollektiv der Ovarialkarzinome mit 47 % (49/105) deutlich mehr Todesfälle zu verzeichnen. Die mittlere Überlebenszeit war für die 3 verstorbenen BOT-Patientinnen insignifikant länger, als die für die Ovarialkarzinompatientinnen mit 56 (0-102,0) Monaten. Aufgrund der seltenen Todesereignisse erfolgten im BOT-Kollektiv keine statistischen Analysen bezüglich der prognostischen Bedeutung von Cyr61 und CTGF (Abb. 4-3).

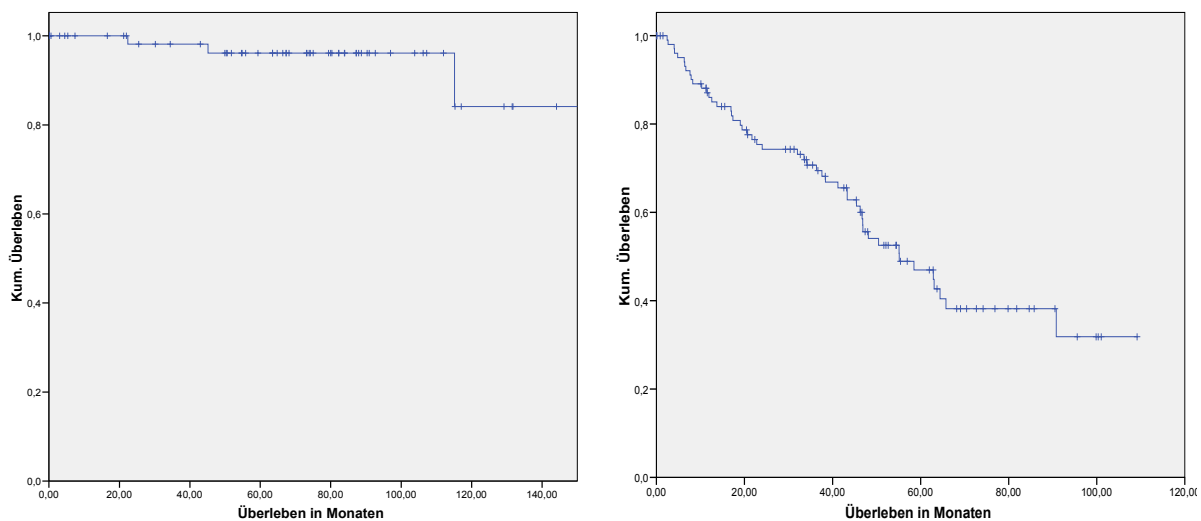


Abb. 4-3: Überlebenskurve für das Gesamtüberleben der n=72 BOT-Patientinnen (linkes Diagramm) und n=105 Ovarialkarzinompatientinnen (rechtes Diagramm)

4.1.7 Rezidivfreies Überleben

Von 65,2 % (60/92) der BOT-Patientinnen lagen Angaben zum Rezidiv-Status vor. Von diesen 60 blieben 91,7 % rezidivfrei und bei 8,3 % (5/60) der Patientinnen trat ein Rezidiv auf (Abb.4-4).

Die wichtigsten Fakten der Patientinnen, die ein Rezidiv erlitten, sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst. Bei allen 5 Fällen wurde ein seröser BOT (SBOT) diagnostiziert. 4 davon wiesen schon zum Zeitpunkt der Diagnose nicht-invasive peritoneale Implantate auf, welche operativ entfernt wurden. Diese Patientinnen waren im Mittel 28,5 Monate rezidivfrei. Es ist anzumerken, dass einer der 5 Rezidivfälle (BOT 78) auf einer inkompletten Erstoperation basierte. Bei dieser Patientin erfolgte initial eine Hysterektomie, die bilaterale Salpingo-Oophorektomie, die Appendektomie und ein peritoneales Sampling, aber keine Omentektomie. Letztlich waren jedoch die beiden Rezidivimplantate im Omentum majus lokalisiert.

Tabelle 4-3: Die 5 BOT des Kollektivs mit einem Rezidiv; *laut auswertiger Histologie

BOT	Pat.-Alter in Jahren	Histo SBOT	FIGO-Stadium	Histologie Implantate	Chemotherapie	Rezidiv	Rezidivfreie Zeit in Monaten	Verlauf
29	38	SBOT	III a	1 NIEI, 7 NIDI	ja (8 Zyklen)	NIEI (Peritoneum, Restovar rechts)	6,28	DOD (45 Monate später)
51	19	SBOT	III a	1 NIDI	Keine Angaben	NIDI (Krankenblatt-Schwerin)	15,86	AWSD
64	27	SBOT	I c	0	ja - initiale OVCA-Dg.	Seröse peritoneale Adenokarzinominfiltrate*	45,89	NED
78	48	SBOT	III b	2 NIEI	ja (CP, Taxol)	NIEI (Omentum, Diaphragma)	20,92	NED
81	47	SBOT	III b	3 NIEI	ja (CP, CPA)	NIDI (Peritoneum)	53,75	AWSD

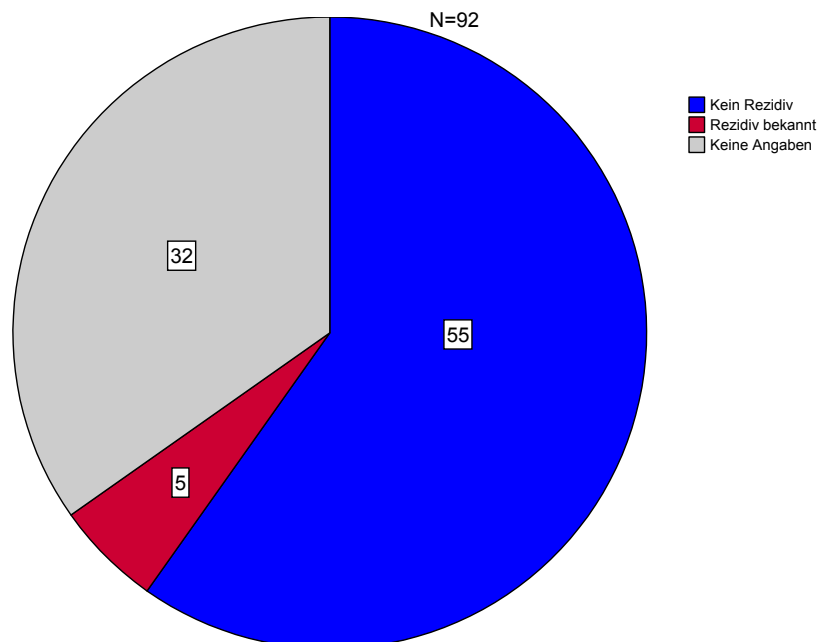


Abb. 4-4: Rezidivstatus der BOT-Patientinnen

Die Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben der 87 Ovarialkarzinompatientinnen (87/107; 81,3 %), (Abb. 4-5, rechtes Diagramm) zeigte im Vergleich mit dem der 60 BOT-Patientinnen (Abb. 4-5, linkes Diagramm) einen wesentlich steileren Verlauf. 73,6 % (64/87) Ovarialkarzinom-Patientinnen wiesen nach einer medianen Zeit von 17,7 Monaten (2,4-101,1 Monate) ein Rezidiv auf. Die 5-Jahres-rezidivfreie-Zeit betrug bei den Karzinomen 9,1 %. Dagegen traten im Kollektiv der BOT weniger Rezidive auf. Die 5-Jahres-rezidivfreie-Zeit lag im Gegensatz zu den Karzinomen mit 61,7 % sehr viel höher. Bei den 5 Patientinnen mit einem BOT-Rezidiv betrug die mediane rezidivfreie Zeit 28,5 (0-144.11) Monate.

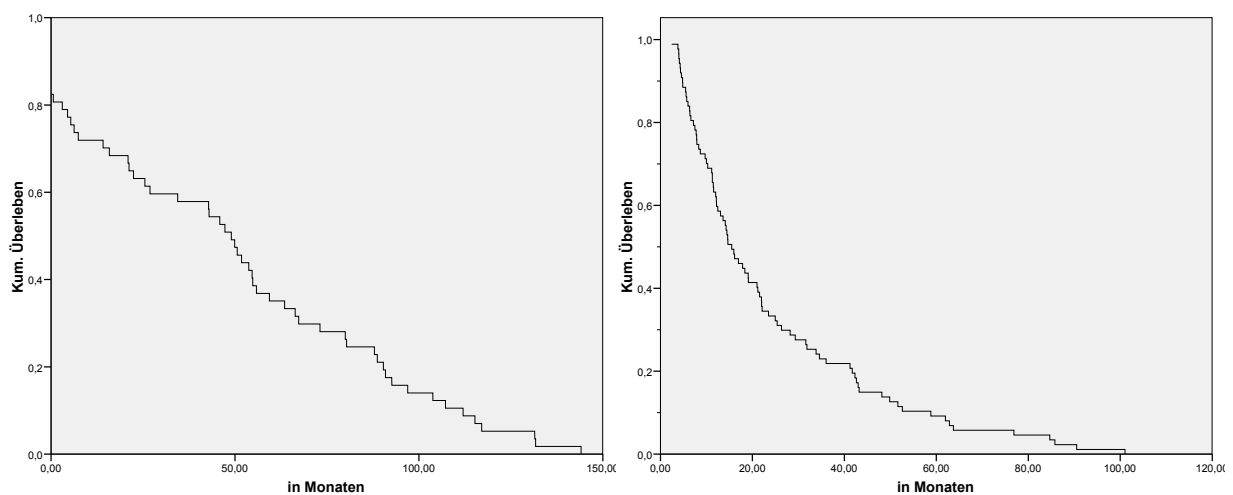


Abb. 4-5: Überlebenskurve für das rezidivfreie Überleben von n=60 BOT-Patientinnen (linkes Diagramm) und n=87 Ovarialkarzinompatientinnen (rechtes Diagramm)

4.1.8 Histologische Zusammensetzung der BOT

Die detaillierte Zusammensetzung der Histologie der BOT ist in Tabelle 4-4 dargestellt. Die Mehrzahl, 50,4 % (55/92), der BOT waren serös differenziert. Die muzinösen BOT bildeten mit insgesamt 22,9 % (25/92) die zweitgrößte histologische Gruppe, wobei 20 Fälle als muzinös - intestinal und 5 Fälle als muzinös - endozervikal subklassifiziert wurden. 5,5 % der Fälle (6/92) waren endometrioid, 2,8 % (3/92) transitionalzellig differenziert und weitere 2,8 % (3/92) wurden der gemischten histologischen Kategorie zugeordnet. 2 Fälle des letztgenannten histologischen Typs enthielten ausschließlich serös und endometrioid differenzierte Anteile, der dritte zusätzlich noch eine muzinös-endozervikale Komponente.

Tabelle 4-4: Histologische Einteilung der BOT nach den WHO- Richtlinien¹⁷³

	Häufigkeit	Prozent
Serös	55	50,4
Muzinös-intestinal	20	18,3
Muzinös-endozervikal	5	4,6
Endometrioid	6	5,5
Transitional	3	2,8
Gemischt	3	2,8
Gesamt	92	100

4.1.9 Histologische Einteilung der Implantate

Die Zusammensetzung der Histologie der Implantate ist in Abb. 4-5 dargestellt. Bei 10 % (3/30) der Implantate handelte es sich um invasive Implantate, die übrigen 90 % waren als nicht-invasive Implantate klassifiziert worden. Darunter 36,7 % (11/30) nicht-invasive epitheliale, 26,7 % (8/30) nicht-invasive desmoplastische Implantate und 13,3 % (4/30) nicht-invasive Implantate in Kombination. Bei den letztgenannten handelt es sich um 4 Patientinnen, die synchron sowohl nicht-invasive epitheliale, als auch desmoplastische Implantate aufwiesen.

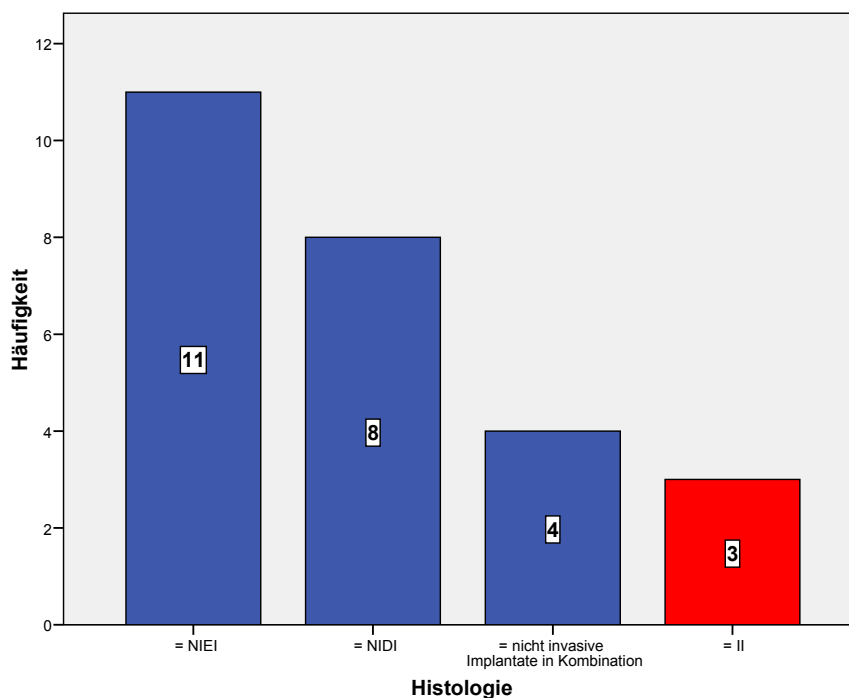


Abb. 4-5:
Histologie der 30
Implantate:
NIEI: Nicht-invasives
epitheliales Implantat,
NIDI: Nicht-invasives
desmoplastisches
Implantat,
II: Invasives Implantat.

4.2 Die Proteinexpression von Cyr61 und CTGF

Zunächst wurde die Expression der beiden Proteine in diversen Karzinomzelllinien ovariellen Ursprungs im Western-Blot untersucht. Entsprechend der in der Literatur beschriebenen Proteingrößen lag die Bande von Cyr61 bei 48 kDa, für CTGF bei 38 kDa. Die normale Oberflächenepithel-Zelllinie HOSE, sowie die Ovarialkarzinomzelllinien ES-2, OAW-42, SKOV-3 exprimierten Cyr61 kräftig, OVCAR-3 nur schwach. Bei Caov-42 war kein Cyr61-Protein detektierbar.

Die CTGF-Expression war im Vergleich zur Cyr61-, sowie zur Aktin-Bande insgesamt nur sehr schwach. CTGF-Protein war in allen Karzinomzelllinien, aber nicht in HOSE nachweisbar. Zusammenfassend deutet sich ein inverses Expressionsmuster von Cyr61 und CTGF in den Zelllinien an (Abb. 4-7).

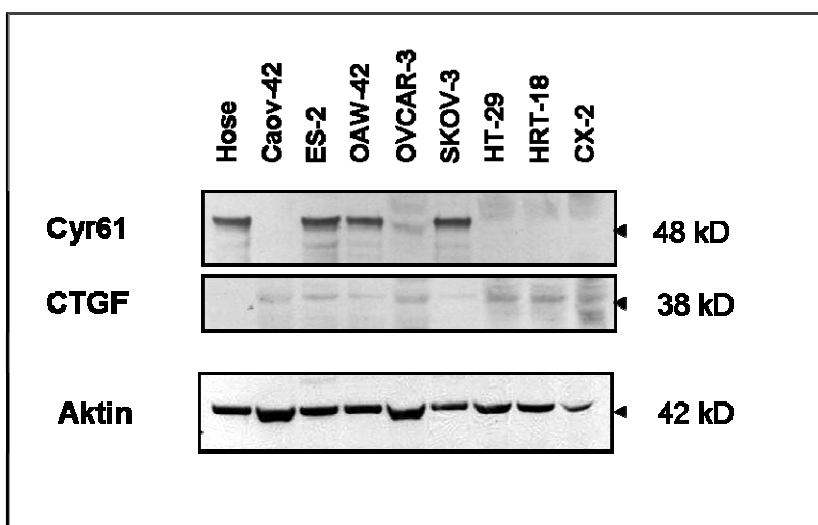


Abb. 4-7: Western Blot – Inverse Korrelation der Cyr61- und der CTGF-Expression

4.3 Immunhistochemische Expression von Cyr61 und CTGF-Protein

4.3.1 Cyr61

Das normale Oberflächenepithel des Ovar exprimierte in den 5 untersuchten Referenzproben nur sehr schwach zytoplasmatisch Cyr61 (Abb. 4-10, A, kleines Fenster). Alle 3 Zellarten des Tubenepithels, die zilientragenden, die sezernierenden und die Stiftzellen zeigten eine starke zytoplasmatische Cyr61-Expression. Außerdem war Cyr61 diffus im ovariellen Stroma nachweisbar.

Das Epithel der BOT war in 82,6 % (76/92) schwach, in 16,3 % (15/92) mäßig und in nur einem Fall (1/92) stark Cyr61-positiv (Abb. 4-8). Die Psammomkörper färbten sich dagegen intensiv (SI=3). Die Epithelien der SBOT exprimierten in 78,2 % (43/55) schwach zytoplasmatisch Cyr61 (Abb. 4-10, A).

Von den 107 Ovarialkarzinomen (Abb. 4-9) wiesen 31 % (33/107) eine schwache, herdförmige Cyr61-Expression auf (Abb. 4-10, B) und 56 % (60/107) zeigten eine moderate Expression (Abb. 4-10, C). 13 % (14/107) exprimierten Cyr61 stark (Abb. 4-10, D).

Die Färbeintensität war insbesondere in den apikalen Partien der Epithelien verstärkt und sezerniertes Cyr61-Protein war im Lumen nachweisbar. In einigen Fällen konnte Cyr61 schwach und fleckförmig im Tumorstroma, sowie in peritumoral gelegenen Endothelien nachgewiesen werden.

4.3.2 CTGF

Im normalen ovariellen Oberflächenepithel sowie im Tubenepithel, in den zilientragenden und den sezernierenden Epithelzellen, war eine kräftige zytoplasmatische CTGF-Expression in allen 5 Referenzproben nachweisbar (Abb. 4-10, E; kleines Fenster). Darüberhinaus konnte auch im ovariellen Stroma eine diffuse zytoplasmatische CTGF-Positivität beobachtet werden. 59,8 % (55/92) der untersuchten BOT exprimierten CTGF stark zytoplasmatisch (Abb. 4-10, E), 37 % (34/92) mäßig stark und nur 3,3 % (3/92) waren schwach CTGF-positiv (Abb. 4-8).

Wie in Abb. 4-9 dargestellt, zeigten 22,5 % (24/107) der Ovarialkarzinome eine starke (Abb. 4-10, F) und 40 % (43/107) eine mäßige (Abb. 4-10, G) CTGF-Expression auf. 37,5 % (40/107) wurden der Gruppe der schwachen CTGF-Expression zugeordnet (Abb. 4-10, H). In den Gefäßendothelien sowie im Tumorstroma konnte eine diskrete, heterogene CTGF-Expression nachgewiesen werden.

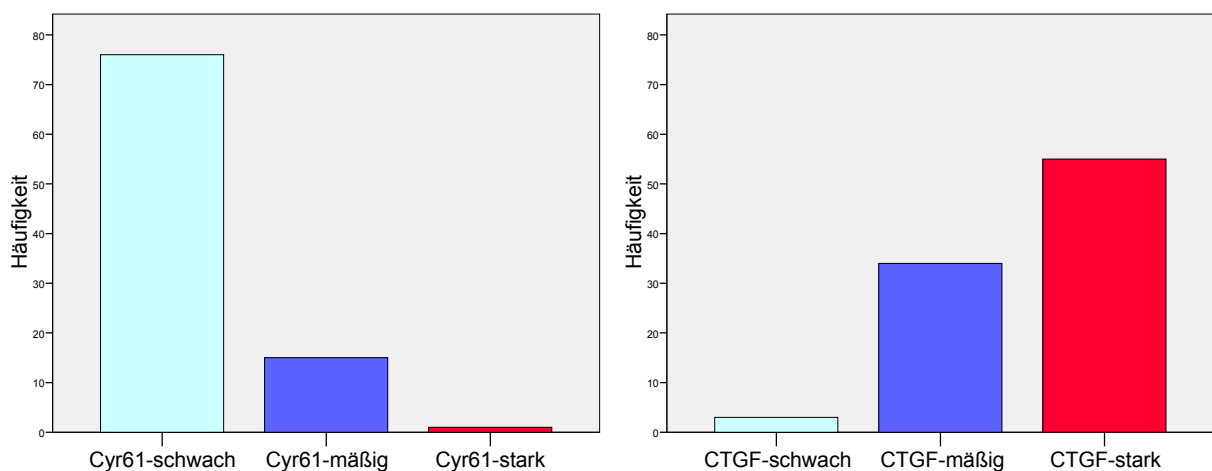


Abb. 4-8: Cyr61- und CTGF-Expression in 92 BOT

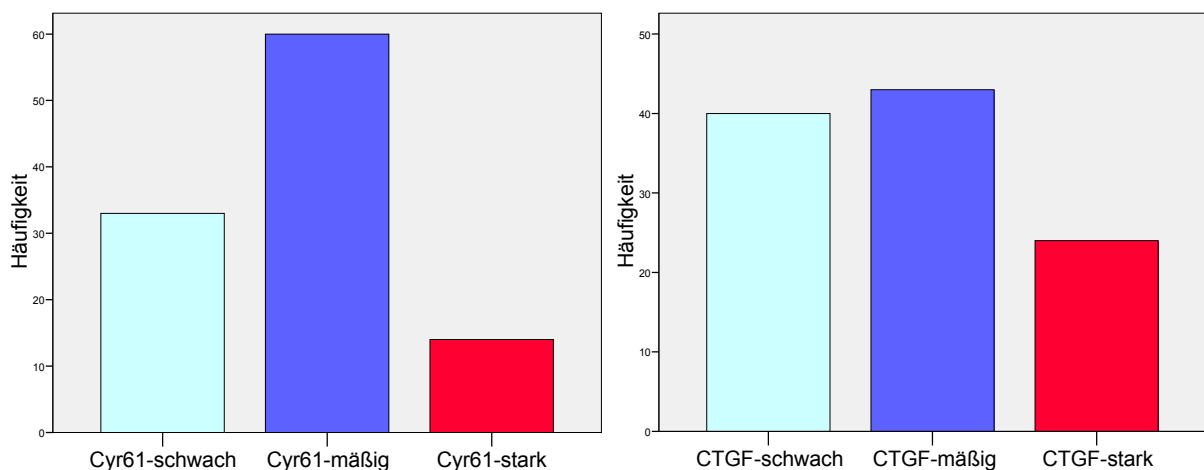


Abb. 4-9: Cyr61- und CTGF-Expression in 107 Ovarialkarzinomen

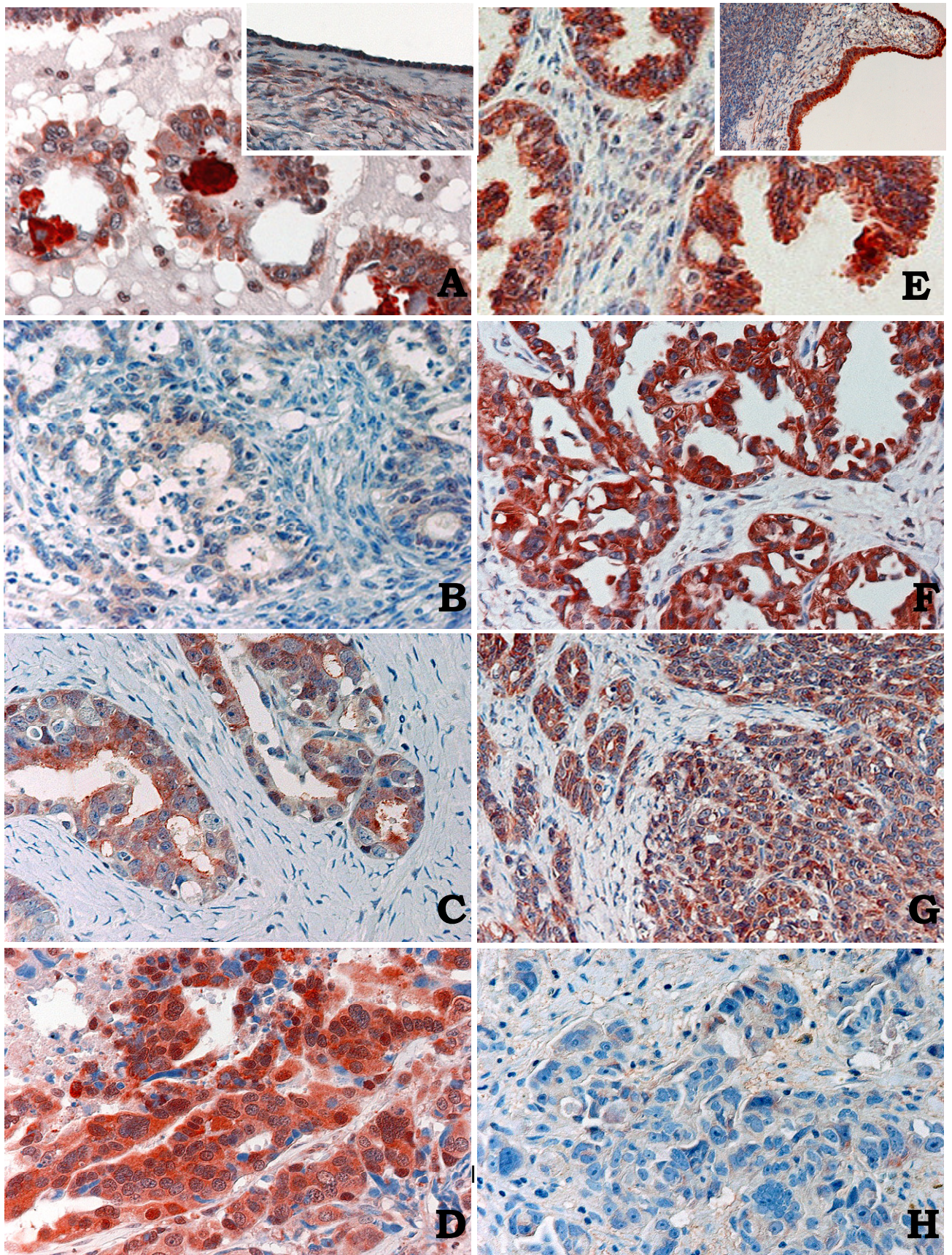


Abb. 4-10: Exemplarische Abbildungen der Expression von Cyr61 (A-D) und CTGF (E-H) jeweils in normalen ovariellen Gewebe (kleines Feld in A und E, jeweils 200fach vergrößert), in serös differenzierten BOT (A und E) und Ovarialkarzinomen (B-D, F-H – jeweils 400fach vergrößert; weitere Erläuterungen siehe nächste Seite).

Erläuterungen zu Abb. 4-10:

- A- Cyr61-Expression im BOT; kleines Feld: normales ovarielles Oberflächenepithel und Stroma
- B- keine/ schwache Cyr61-Expression in Ovarialkarzinomen
- C- mäßige Cyr61-Expression in Ovarialkarzinomen
- D- starke Cyr61-Expression in Ovarialkarzinomen
- E- CTGF-Expression im BOT; kleines Feld: normales ovarielles Oberflächenepithel und Stroma
- F- starke CTGF-Expression in Ovarialkarzinomen
- G- mäßige CTGF-Expression in Ovarialkarzinomen
- H- keine/ schwache CTGF-Expression in Ovarialkarzinomen

4.4 IRS - Vergleich von Cyr61 und CTGF in BOT versus Karzinom

4.4.1 Vergleich der Cyr61-Expression in den BOT und in den Ovarialkarzinomen

Der Median der IRS-Werte war, wie in Abbildung 4-11 dargestellt, bei den Ovarialkarzinomen mit einem Wert von 4 doppelt so hoch wie bei den BOT (Median =2). Die Spannweite der Cyr61-IRS-Werte reichte in der Gruppe der BOT von 0 bis 9, in der Karzinomgruppe bis 12. Bei den BOT wiesen 75 % der Patientinnen eine schwache (IRS =2-3) bzw. im Einzelfall keine Cyr61-Expression (IRS=0) auf. Die Ovarialkarzinome zeigten in 75 % der Fälle eine schwache bis mäßige Cyr61-Expression (IRS=2-6). Insgesamt wiesen die Ovarialkarzinome eine signifikant höhere Cyr61- Expression auf als die BOT ($p < 0,0001$, Mann-Whitney-U-Test).

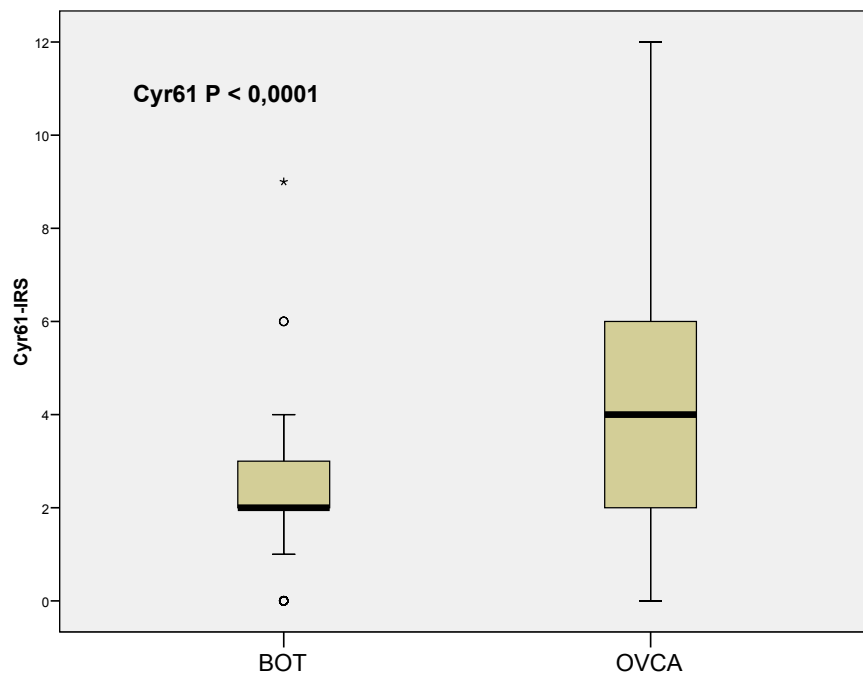


Abb. 4-11: Boxplot, Vergleich der IRS-Werte der Cyr61-Expression in den BOT und in den Ovarialkarzinomen, p-Wert jeweils mittels Mann-Whitney-U-Test.

4.4.2 Vergleich der CTGF-Expression in den BOT und in den Ovarialkarzinomen

Im Gegensatz zu Cyr61 lag die CTGF-Expression in den BOT signifikant höher als in den Ovarialkarzinomen ($p < 0,0001$, Mann-Whitney-U-Test; Abb. 4-12). Der Median der IRS-Werte betrug für CTGF in den BOT 9 und in den Ovarialkarzinomen 4, entsprechend einer mäßiggradigen bzw. starken CTGF-Expression. 75 % der BOT wiesen eine mäßige bis starke CTGF Expression auf (IRS = 6-12). Dagegen zeigten 75 % der Karzinome eine schwache bis mäßige CTGF-Expression (IRS = 3-6).

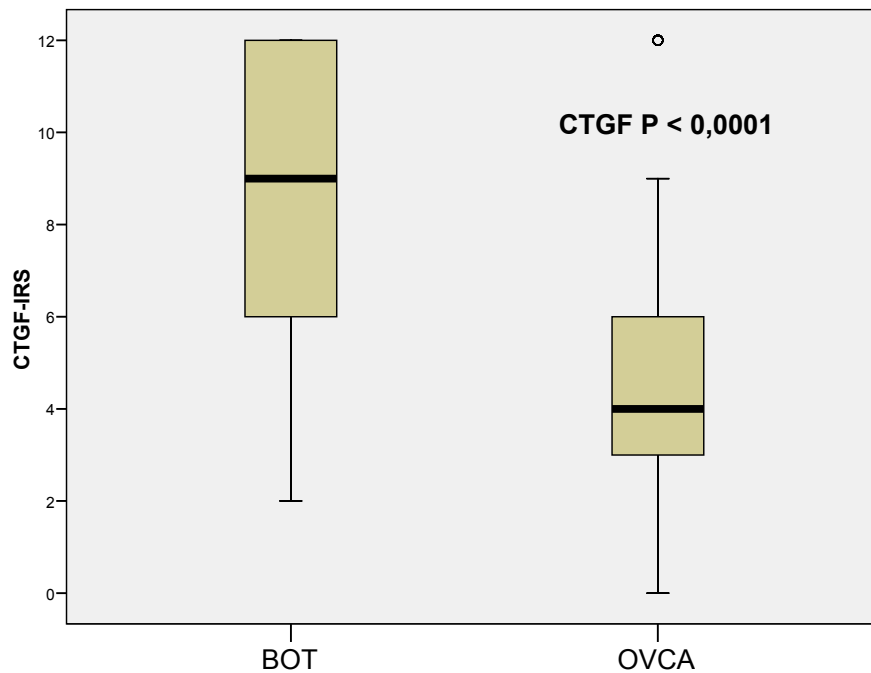


Abb. 4-12: Boxplot, Vergleich der IRS-Werte der CTGF-Expression in den BOT und in den Ovarialkarzinomen, P-Wert mittels Mann-Whitney-U-Test.

4.5 Korrelation der Cyr61-Expression mit klinisch-pathologischen Daten

4.5.1 Korrelation der Cyr61-Expression in den BOT

Von den in Tabelle 4-5 aufgelisteten klinisch-pathologischen Parametern korrelierte nur die histologische Differenzierung der BOT signifikant mit der Cyr61-Protein-Expression ($p=0,018$). Die SBOT, die endometrioiden BOT und ein muzinöser BOT wiesen im Vergleich zu den anderen histologischen Subtypen eine mäßige bzw. starke Cyr61-Expression (positiv) auf (Abb. 4-13).

Tabelle 4-5: Kreuztabelle Cyr61-Expression - BOT

Parameter		Cyr61 schwach	Cyr61 mäßig	Cyr61 stark	Fälle	p-Wert Chi-Quadrat- Test
Alle Fälle		76	15	1	92	
FIGO	IA, IB	20	4	1	25	0,373
	IC, II	13	1	0	14	
	III	27	5	0	32	
Implantate	Nein	44	8	1	53	0,736
	Ja	27	5	0	32	
Implantate- Histologie	NIEI	8	3	0	11	0,526
	NIDI	7	1	0	8	
	NI-gemischt	4	0	0	4	
	II	2	1	0	3	
Histologie	serös	43	12	0	55	0,018
	muzinös-intestinal	19	1	0	20	
	muzinös-endoz.	5	0	0	5	
	endometrioid	3	2	1	6	
	transitionalzellig	3	0	0	3	
	gemischt	3	0	0	3	
Serös vs. Nicht serös	serös	43	12	0	55	0,113
	nicht-serös	33	3	1	37	
CTGF- Expression	schwach	3	0	0	3	0,176
	mäßig	31	2	1	34	
	stark	42	12	0	54	

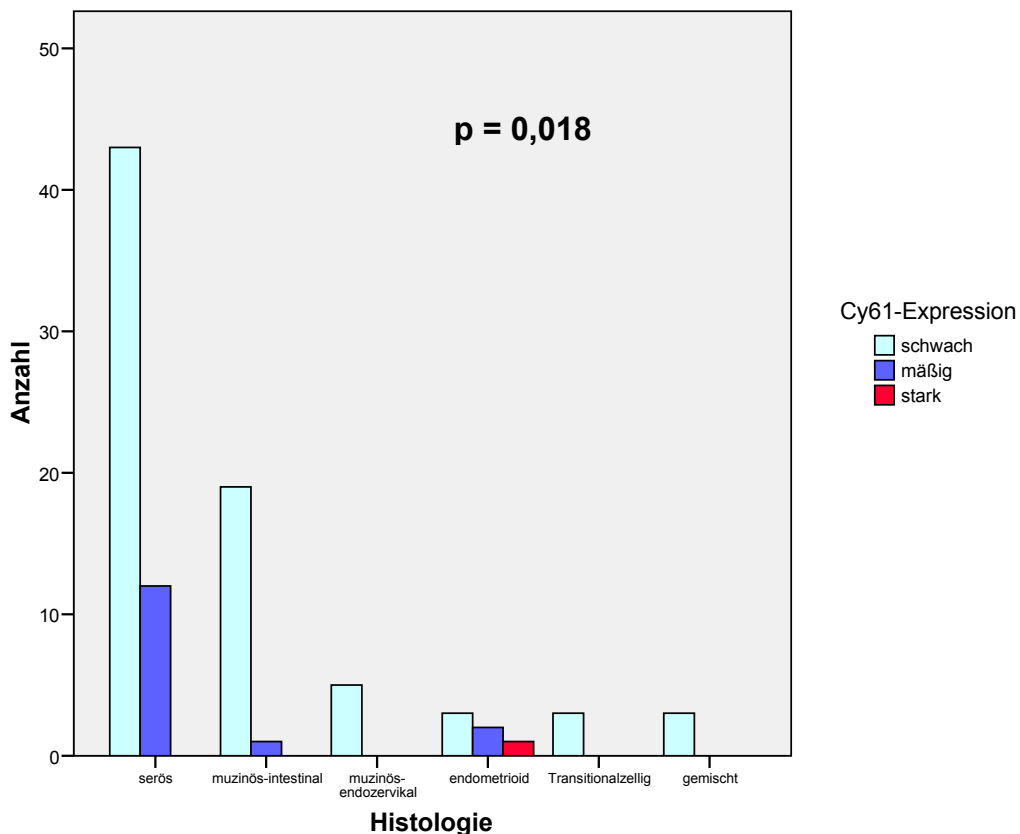


Abb. 4-3: Cyr61-Expression in Abhängigkeit von der Histologie, p-Wert mittels Chi-Quadrat-Test.

4.5.2 Korrelation der Cyr61-Expression in den Ovarialkarzinomen

Eine starke Cyr61-Expression korrelierte in den Ovarialkarzinomen (Tabelle 4-6) signifikant mit dem Nachweis von Lymphknotenmetastasen (Abb. 4-14), einem geringen Differenzierungsgrad (Abb. 4-15), einem serösen Typ (Abb. 4-16), sowie einem positiven Östrogenrezeptorstatus (Abb. 4-17).

Keines der muzinös, endometrioid oder klarzellig differenzierten Karzinome zeigte eine starke Cyr61-Expression (Abb. 4-16).

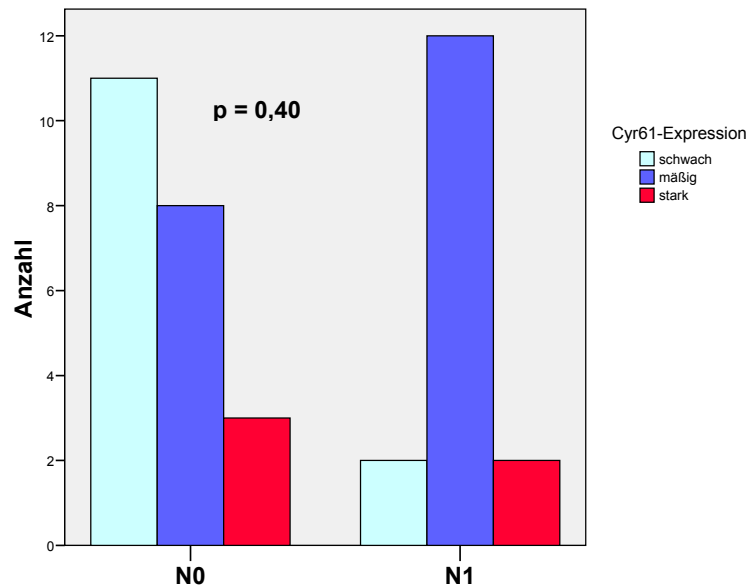


Abb. 4-14: Zusammenhang zwischen dem Nodalstatus und der Cyr61-Expression bei 38 Ovarialkarzinompatientinnen; Chi-Quadrat-Test $p=0,040$.

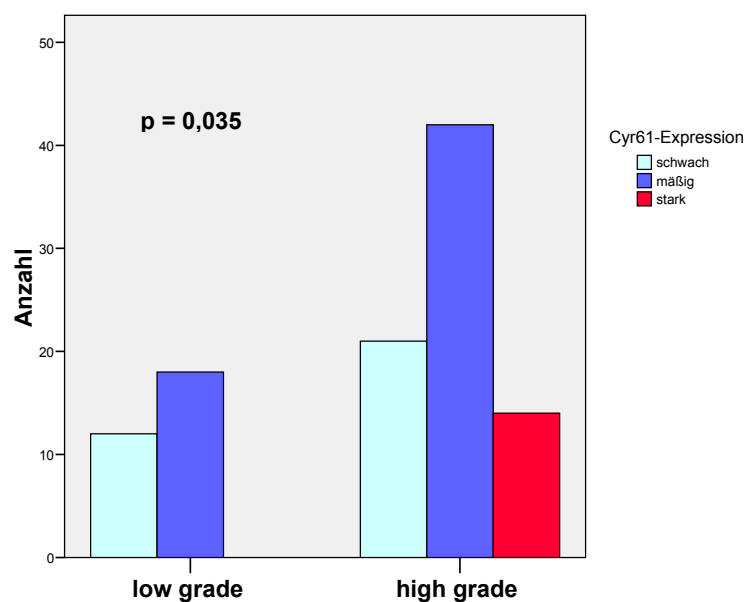


Abb. 4-15: Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad (G1=low grade, G2/3=high grade) und der Cyr61-Expression bei 107 Ovarialkarzinompatientinnen; Chi-Quadrat-Test $p=0,035$.

Tabelle 4-6: Die Cyr61-Expression im Ovarialkarzinom und Korrelation mit den klinisch-pathologischen Parametern

	Parameter	Cyr61 <i>schwach</i>	Cyr61 <i>mäßig</i>	Cyr61 <i>Stark</i>	Fälle	p-Wert Chi- Quadrat- Test
Alle Fälle		33	60	14	107	
Alter	< 64 Jahre	14	31	8	53	0,577
	≥ 64 Jahre	19	29	6	54	
Aszites	<500ml	13	22	7	42	0,639
	>500ml	12	24	4	40	
FIGO	IA, IB	3	8	2	13	0,197
	IC, II	13	11	2	26	
	III, IV	17	41	10	68	
pN	0	11	8	3	22	0,040
	1	2	12	2	16	
Residualtumor	nein	17	19	3	39	0,106
	ja	13	36	7	56	
Grading	1	12	18	0	30	0,035
	2/3	21	42	14	77	
Mitosen	<10/HPF	9	19	1	29	0,464
	10-24/HPF	11	19	6	36	
	>24/HPF	13	21	7	41	
Histologie	serös	14	41	7	62	0,013
	muzinös	0	2	0	2	
	endometrioid	7	7	0	14	
	klarzellig	5	4	0	9	
	transitionalzellig	0	0	1	1	
	gemischt	4	4	3	11	
	undifferenziert	3	2	3	8	
Histologie gruppiert	serös	14	41	7	62	0,034
	nicht-serös	16	17	4	37	
	undifferenziert	3	2	3	8	
ER-Status	negativ	19	23	4	46	0,038
	schwach	6	7	5	18	
	positiv	12	30	5	43	
CTGF- Expression	schwach	18	17	5	40	0,012
	mäßig	5	31	7	43	
	stark	10	12	2	24	

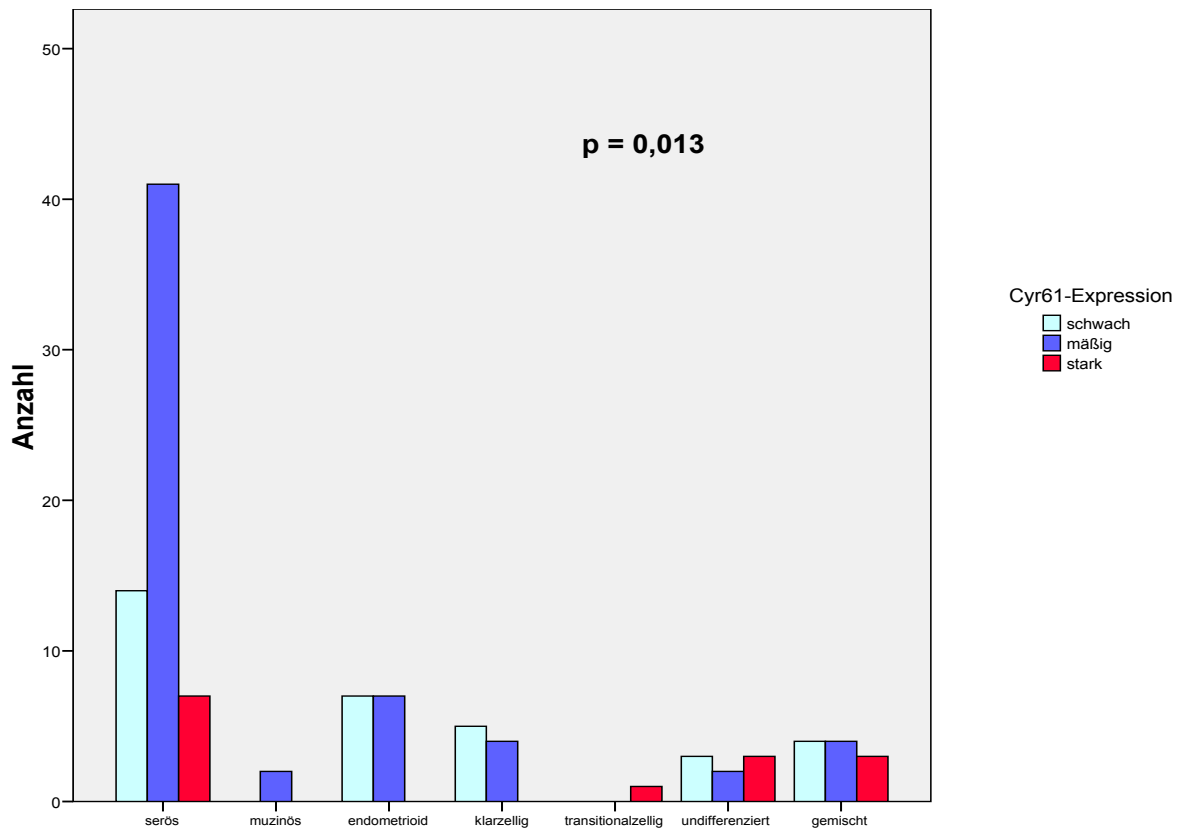


Abb. 4-16: Zusammenhang zwischen dem histologischen Typ und der Cyr61-Expression bei 107 Ovarialkarzinompatientinnen; Chi-Quadrat-Test $p=0,013$.

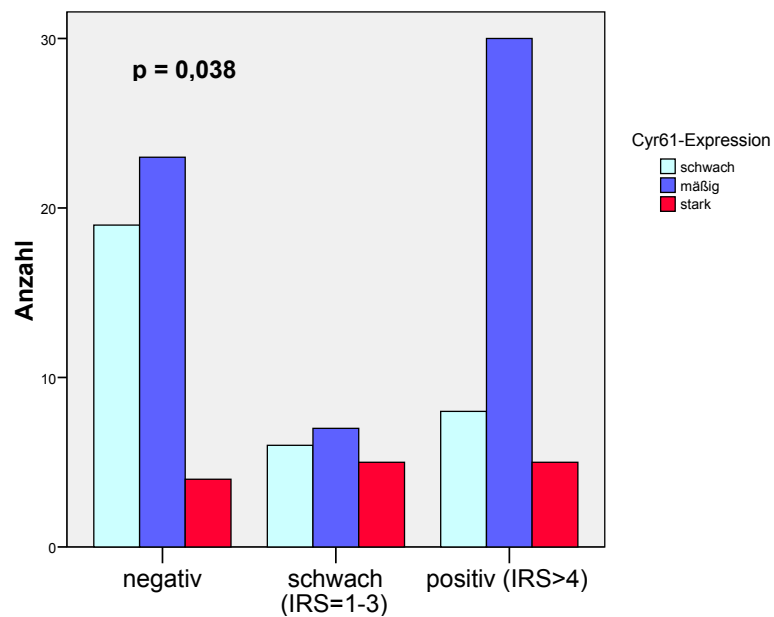


Abb. 4-17: Zusammenhang zwischen dem Östrogenrezeptorstatus und der Cyr61-Expression bei 107 Ovarialkarzinompatientinnen; Chi-Quadrat-Test $p=0,038$.

4.6 Korrelation der CTGF-Expression mit klinisch-pathologischen Daten

4.6.1 Korrelation der CTGF-Expression in den BOT

Keiner der in der Tabelle 4-7 aufgeführten klinisch-pathologischen Parameter korrelierte im BOT-Kollektiv mit der CTGF-Expression.

Tabelle 4-7: Kreuztabelle CTGF-Expression in den BOT

Parameter		CTGF <i>schwach</i>	CTGF <i>mäßig</i>	CTGF <i>stark</i>	Fälle	p-Wert Chi-Quadrat- Test
Alle Fälle		3	34	55	92	
FIGO	IA, IB	2	10	13	25	0,373
	IC, II	1	8	5	14	
	III	0	13	19	32	
Implantate	Nein	2	19	33	54	0,508
	Ja	0	13	19	32	
Implantate- Histologie	NIEI	0	4	7	11	0,517
	NIDI	0	2	6	8	
	NI-gemischt	0	3	1	4	
	II	0	1	2	3	
Histologie	serös	1	21	33	55	0,216
	muzinös-intestinal	2	3	15	20	
	muzinös-endoz.	0	4	1	5	
	endometrioid	0	2	4	6	
	transitionalzellig	0	2	1	3	
	gemischt	0	2	1	3	
Serös vs. Nicht serös	serös	2	13	22	37	0,628
	nicht-serös	1	21	33	55	
CTGF- Expression	schwach	3	31	42	76	0,139
	mäßig	0	2	13	15	
	stark	0	1	0	1	

4.6.2 Korrelation der CTGF-Expression in den Ovarialkarzinomen

Von den in der Tabelle 4-8 aufgeführten klinisch-pathologischen Parameter korrelierte eine starke CTGF-Expression mit gering proliferierenden (Abb. 4-18) und nicht-serösen Ovarialkarzinomen (Abb. 4-19) auf einem statistisch signifikanten Niveau.

Tabelle 4-8: Kreuztabelle CTGF - Expression in den Ovarialkarzinomen

	Parameter	CTGF schwach	CTGF mäßig	CTGF stark	Fälle	p-Wert Chi- Quadrat- Test
Alle Fälle		40	43	24	107	
Alter	< 64 Jahre	17	21	15	53	0,299
	≥ 64 Jahre	23	22	9	54	
Aszites	<500ml	16	16	10	42	0,567
	>500ml	11	19	10	40	
FIGO	IA, IB	4	5	4	13	0,768
	IC, II	12	10	4	26	
	III, IV	24	28	16	68	
pN	0	6	11	5	22	0,595
	1	4	6	6	16	
Residualtumor	nein	15	14	10	39	0,765
	ja	22	23	11	56	
Histologisches Grading	1	8	11	11	30	0,075
	2/3	32	32	13	77	
Mitosen	<10/HPF	6	11	12	29	0,012
	10-24/HPF	14	14	8	36	
	>24/HPF	20	19	3	42	
Histologie	serös	23	27	12	62	0,071
	muzinös	0	1	1	2	
	endometrioid	4	8	2	14	
	klarzellig	2	3	4	9	
	transitionalzellig	0	0	1	1	
	gemischt	4	3	4	11	
	undifferenziert	7	1	0	8	
Histologie gruppiert	nicht-serös	10	15	12	37	0,019
	serös	23	27	12	62	
	undifferenziert	7	1	0	8	
ER-Status	negativ	19	16	11	46	0,170
	schwach	8	4	5	6	
	positiv	13	23	7	43	

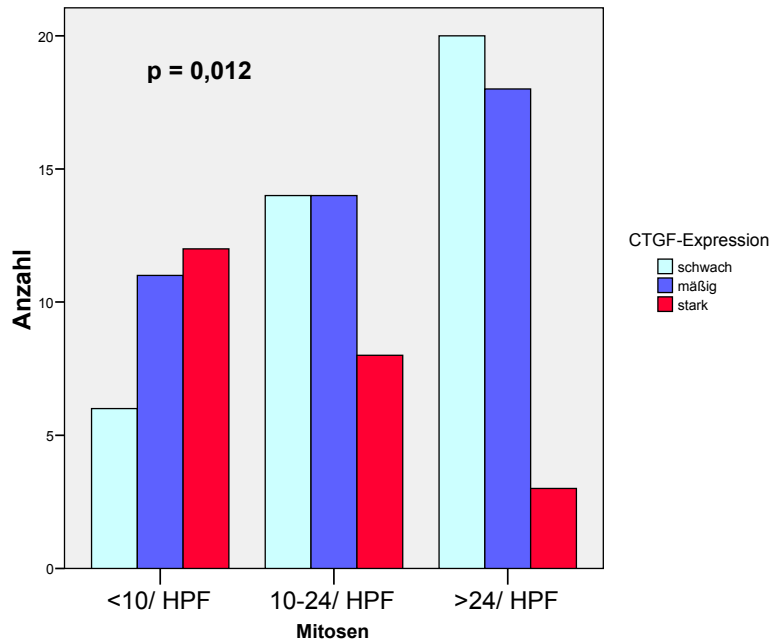


Abb. 4-18: Zusammenhang zwischen der CTGF-Expression und der Anzahl der Mitosen bei 107 Ovarialkarzinompatientinnen; Chi-Quadrat-Test $p=0,012$.

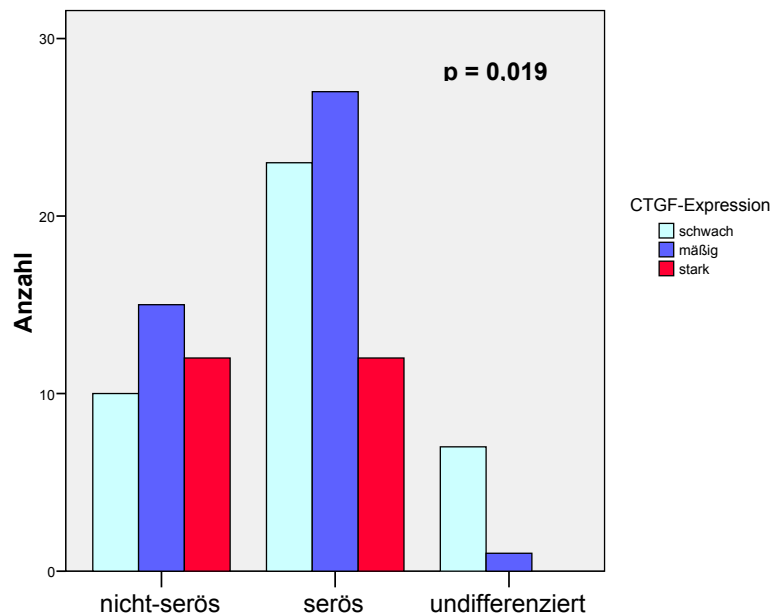


Abb. 4-19: Zusammenhang zwischen der CTGF-Expression und gruppierten Histologie bei 107 Ovarialkarzinompatientinnen; Chi-Quadrat-Test $p=0,019$.

4.7 Gesamtüberleben und Rezidivfreies Überleben

4.7.1 Cyr61 in Beziehung zum Gesamtüberleben und zum rezidivfreien Überleben

Die Cyr61-Expression hatte weder auf das progressfreie Überleben (Log-Rank-Test: $p=0,17$) noch auf das Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p=0,588$) einen Einfluss (Abb. 4-20).

Für Patientinnen mit einer schwachen Cyr61-Expression betrug die mediane rezidivfreie Überlebenszeit 14 Monate und das mediane Gesamtüberleben 63 Monate.

Jene mit einer mäßigen Cyr61-Expression wiesen ein medianes progressfreies Überleben von 16 Monaten und ein medianes Gesamtüberleben von 59 Monaten auf.

Bei den Patientinnen mit stark Cyr61-exprimierenden Karzinomen konnte ein medianes progressfreies Überleben von 14 Monaten und ein medianes Gesamtüberleben von 43,3 Monaten nachgewiesen werden.

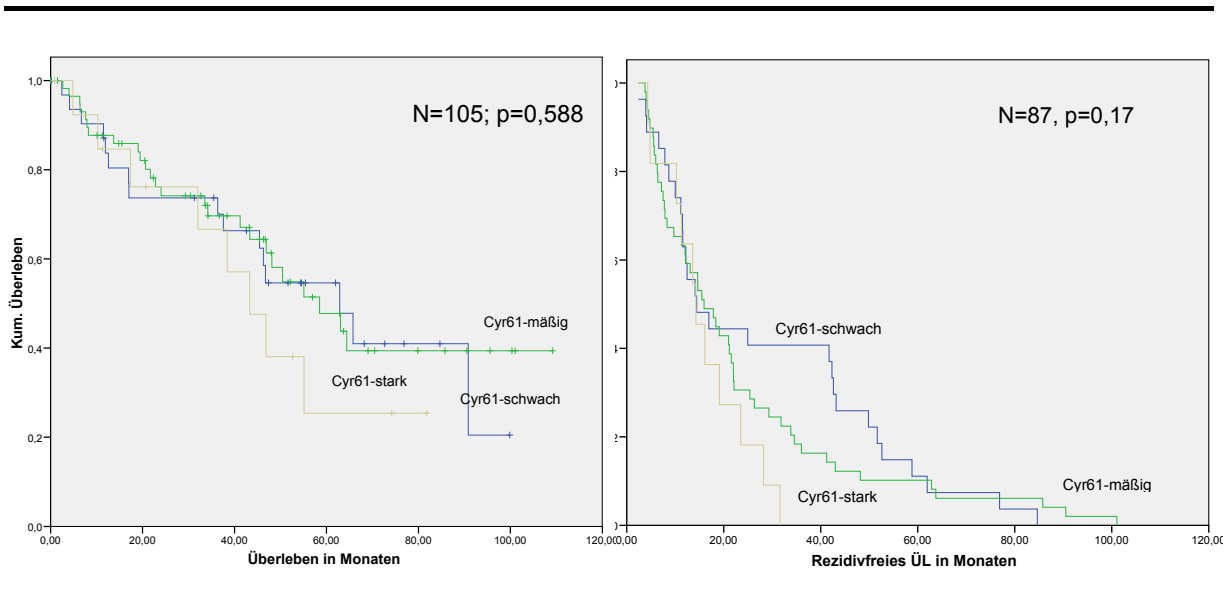


Abb. 4-20: Kaplan-Meier-Überlebenskurven des Gesamtüberleben (links) und des rezidivfreien Überleben (rechts) in Abhängigkeit von der Cyr61-Expression.

4.7.2 CTGF in Beziehung zum Gesamtüberleben und zum rezidivfreien Überleben

Die CTGF-Expression im Ovarialkarzinom war für das progressfreie Überleben und das Gesamtüberleben der Patientinnen von Bedeutung (Abb. 4-21).

Eine starke CTGF-Expression korrelierte mit einer längeren rezidivfreien Zeit (Log-Rank-Test: $p=0,026$). So lag das mediane rezidivfreie Überleben der Patientinnen mit stark CTGF-exprimierenden Ovarialkarzinomen bei 21 Monaten, das der mäßig CTGF-exprimierenden Tumoren bei 19 Monaten und das der schwach CTGF-exprimierenden bei 12 Monaten.

Patientinnen deren Ovarialkarzinome eine starke CTGF-Expression aufwiesen, hatten auch ein längeres Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p=0,019$). Das mediane Überleben der Patientinnen mit einer starken CTGF-Expression in den Karzinomen betrug 91 Monate, das derer mit einer mäßigen Expression 63 Monate, und das der mit einer schwachen CTGF-Expression 46 Monate.

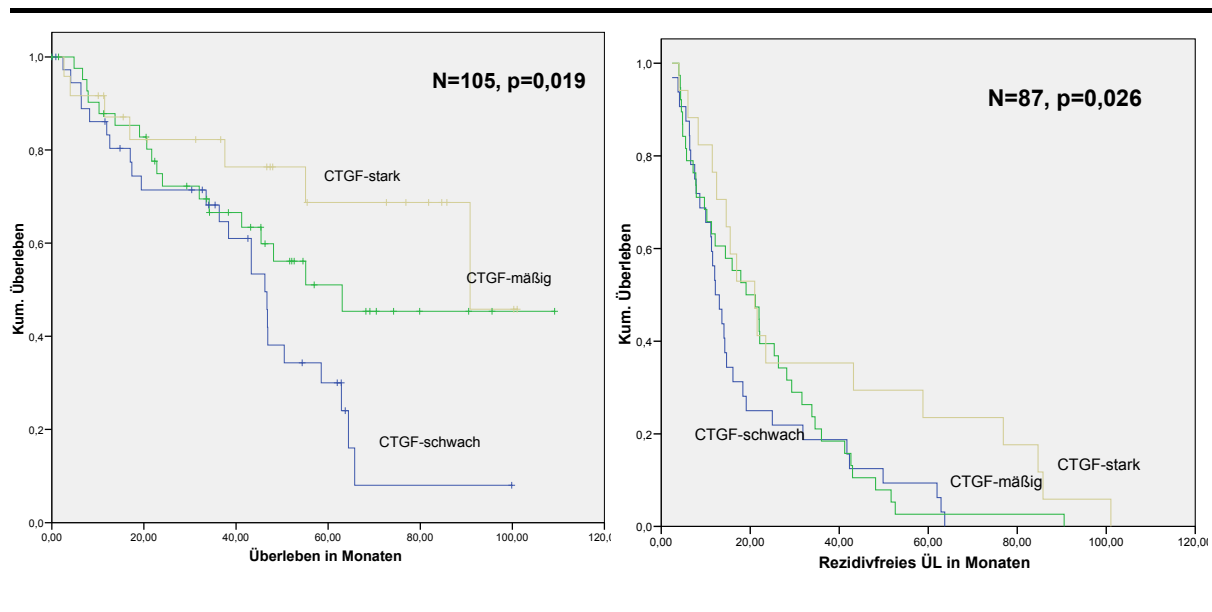


Abb. 4-21: Kaplan-Meier-Überlebenskurven des Gesamtüberleben (links) und des rezidivfreien Überleben (rechts) in Abhängigkeit von der CTGF-Expression.

4.7.3 Klinisch pathologische Parameter in Beziehung zum Gesamtüberleben

Die Ergebnisse der univariaten Analysen (Log-Rank-Test) sind in der Tabelle 4-9 aufgelistet. Folgende klinisch-pathologische Parameter sind als prognostische Faktoren zu nennen: der postoperative Tumorrest ($p<0.0001$), das FIGO-Stadium ($p=0,001$), das Silverberg-Grading ($p=0,012$), der histologische Typ ($p=0,015$) und das Patientenalter ($p=0,045$).

In Bezug auf den Einfluss des Nodalstatus und des Aszites auf das Gesamtüberleben ergeben sich keine statistisch signifikanten Werte, wobei die Anzahl der in die Berechnung eingehenden Fällen gegenüber den anderen Parametern zu gering ist.

Tabelle 4-9: Univariate Analysen bezüglich des Gesamtüberlebens in den Ovarialkarzinomen

		Fälle	Ereignisse	Medianes Überleben (Monate)	Standardfehler	Log-rank-Test (p-Wert)
Alle Fälle		105	49	55,1	8,5	
Cyr61 Expression	schwach	32	16	62,9	11,6	0,588
	mäßig	59	25	58,5	8,6	
	stark	14	8	43,3	6,7	
CTGF Expression	schwach	38	24	46,3	4,1	0,019
	mäßig	43	18	63,1	12,8	
	stark	23	7	90,8	26,3	
Residualtumor	nein	38	8	nicht erreicht		<0,0001
	ja	55	33	36,4	10,6	
FIGO	IA, IB	12	2	nicht erreicht		0,001
	IC, IIA, IIB, IIC	26	11	64,4	2,1	
	III, IV	67	36	37,6	8,6	
Silverberg Grading	1	29	10	90,8		0,012
	2/3	76	39	46,3	4,3	
Histologie	serös	61	30	55,1	4,6	0,015
	muzinös	2	2	2,6		
	endometrioid	13	5	90,8		
	klarzellig	9	2	nicht erreicht		
	transitionalzellig	1	0	nicht erreicht		
	gemischt	11	5	nicht erreicht		
	undifferenziert	8	5	38,4	27,9	
Alter	< 64 Jahre	53	23	90,8	22,9	0,045
	≥ 64 Jahre	53	26	46,8	3,3	
Nodalstatus	pN0	22	6	nicht erreicht		0,562
	pN1	16	3	nicht erreicht		
Aszites	<500 ml	41	13	nicht erreicht		0,116
	>500 ml	39	20	48,1	6,7	

4.7.4 Klinisch pathologische Parameter in Beziehung zum rezidivfreien Überleben

Die Ergebnisse der univariaten Analysen (Log-Rank-Test) der klinisch-pathologischen Faktoren beim Ovarialkarzinom hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens sind in Tabelle 4-10 aufgeführt. Prognostisch entscheidende Parameter für das progressfreie Überleben sind der postoperative Tumorrest ($p < 0.0001$), das FIGO-Stadium ($p < 0.0001$), das Silverberg-Grading ($p < 0.0001$) und das Alter der Patientinnen ($p = 0,018$).

Tabelle 4-10: Univariante Analysen bezüglich des rezidivfreien Überlebens in den Ovarialkarzinomen

		Fälle	Ereignisse	Medianes Überleben (Monate)	Standardfehler	Log-rank-Test (p-Wert)
Alle Fälle		87	87	15,5	22,3	
Cyr61 Expression	schwach	27	27	14,4	3,9	0,170
	mäßig	49	49	16,0	2,6	
	stark	11	11	14,3	2,7	
CTGF Expression	schwach	32	32	12,1	1,5	0,026
	mäßig	38	38	19,1	4,6	
	stark	17	17	21,0	24,2	
Residualtumor	nein	30	30	42,3	10,1	<0,0001
	ja	48	48	11,3	1,4	
FIGO	IA, IB	8	8	28,2	25,2	<0,0001
	IC, IIA, IIB, IIC	23	23	33,9	15,3	
	III, IV	56	56	11,5	1,2	
Silverberg Grading	1	23	23	36,0	9,5	<0,0001
	2/3	64	64	12,5	1,4	
Histologie	serös	52	52	13,1	1,6	0,160
	muzinös	1	1	41,2	n.e.	
	endometrioid	10	10	29,4	20,4	
	klarzellig	8	8	36,0	26,0	
	transitionalzellig	1	1	23,5	n.e.	
	gemischt	9	9	18,4	10,2	
	undifferenziert	6	6	12,2	3,9	
Alter	< 64 Jahre	47	47	21,0	3,5	0,018
	≥ 64 Jahre	40	40	11,6	0,8	
Nodalstatus	pN0	19	19	41,7	14,7	0,128
	pN1	10	10	11,3	4,3	
Aszites	<500 ml	34	34	15,5	1,9	0,822
	>500 ml	33	33	14,4	6,4	

4.8 Multivariate Überlebensanalyse

Um die Unabhängigkeit der Faktoren untereinander, sowie der CTGF-Expression zu untersuchen, fand die multivariate Analyse der Cox-Regression, adjustiert nach dem Tumorrest, Anwendung (Tabelle 4-11). Es wurden die Parameter einbezogen, die in den univariaten Analysen des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Überlebens statistisch signifikant waren. Der postoperative Tumorrest erreichte in beiden Analysen unabhängige prognostische Relevanz. Er ist mit einem Relativen Risiko von 4,6 {95 % CI 1.66 – 12.95}, im Hinblick auf das Gesamtüberleben, und mit 3,35 {95 % CI 1.49 – 7.49}, hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens, der einflußreichste Risikofaktor in der vorliegenden Untersuchung.

Aus der Analyse des rezidivfreien Überlebens gingen das FIGO-Stadium und die CTGF-Expression als unabhängig statistisch signifikante Parameter hervor. Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (FIGO-Stadium III/IV) haben gegenüber denen mit einem FIGO-Stadium I/II ein 1,65-fach erhöhtes Relatives Risiko {95 % CI 0.49 – 5.56} ein Rezidiv zu erleiden. Eine schwache bzw. fehlende CTGF-Expression geht mit einer Erhöhung des Relativen Risikos um 2,31 gegenüber einer starken CTGF-Expression einher.

Bezüglich des Gesamtüberlebens ist die CTGF-Expression als Trend zu werten. Ovarialkarzinompatientinnen mit einer schwachen bzw. fehlenden CTGF-Expression haben gegenüber jenen mit einer starken CTGF-Expression ein 2,81 {95 % CI 0.99 – 7.93} erhöhtes Relatives Risiko am Tumor zu versterben.

Tabelle 4-11: Multivariates Cox-proportional-hazard-regression-model, N=95

		Gesamtüberleben			Rezidivfreies Überleben		
		RR	95 %CI	P-Wert	RR	95 %CI	P-Wert
Tumorrest	nein	1.00			1.00		
	ja	4.64	1.66 – 12.95	0.003	3.35	1.49 – 7.49	0.003
CTGF-Expression	stark	1.00			1.00		
	mäßig	1.85	0.65 – 5.23	0.249	1.58	0.78 – 3.19	0.200
	schwach	2.81	0.99 – 7.93	0.050	2.31	1.18 – 4.94	0.031
Histologie	nicht-serös	1.00			1.00		
	serös	1.24	0.40 – 2.64	0.961	1.46	0.42 – 5.16	0.553
	undifferenziert	0.72	0.28 - 4.95	0.818	1.94	0.64 - 5.87	0.240
FIGO	I / II	1.00			1.00		
	III/ IV	1.46	0.53- 4.07	0.467	1.65	0.49 - 5.56	0.041
Alter	< 64 Jahre	1.00			1.00		
	≥ 64 Jahre	1.49	0.83 – 3.12	0.155	1.49	0.43 – 1.18	0.192
Silverberg Grading	G1	1.00			1.00		
	G2/G3	1.65	0.44 – 3.18	0.732	0.72	0.37 – 1.39	0.715

5. Diskussion

In dieser Promotionsarbeit ist die Expression der ersten beiden Mitglieder der CCN-Proteinfamilie, Cyr61 und CTGF, in zwei gut charakterisierten Tumor-Kollektiven untersucht worden. Dabei zeigte sich sowohl zwischen den beiden Proteinen, als auch zwischen den beiden Tumorentitäten eine divergente Expression, so dass beiden Proteinen eine differentialdiagnostische Bedeutung zukommt. Die Expression beider Proteine korrelierte mit dem Gesamtüberleben. CTGF geht letztlich aus den multivariaten Analysen als unabhängiger Prognosemarker für das rezidivfreie Überleben hervor.

5.1 Das Patientenkollektiv und prognostische Faktoren

5.1.1 Alter der Patientinnen

Der Altersmedian der Ovarialkarzinom-Patientinnen beträgt 64,4 Jahre¹². Aktuelle Zahlen des Robert-Koch-Institutes¹ aus dem Jahr 2008 sprechen von einem mittleren Erkrankungsalter von 67 bis 68 Jahre. Dass ältere Patientinnen (≥ 64 Jahre) hinsichtlich des progressfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens tendenziell eine schlechtere Prognose aufweisen als die jüngeren Patientinnen (< 64 Jahre) ist in diesem Kollektiv bereits ausführlich beschrieben worden⁶⁵. Dieses Ergebnis wird durch die umfangreiche Metaanalyse von Thipgen *et al.*¹⁹⁸ bestätigt: ältere Patientinnen (> 65 Jahre/ 5-Jahres-Überlebensrate von 30 %) weisen im Vergleich zu den jüngeren Patientinnen (< 65 Jahre/ 5-Jahres-Überlebensrate von 64 %) kürzere Überlebenszeiten auf. Natürlich hat auch der Allgemeinzustand der Patientinnen, bzw. die Komorbidität entscheidenden Einfluss auf das Überleben¹⁴². Der Altersmedian der BOT-Patientinnen liegt mit 48 Jahren deutlich (16 Jahre) unter dem der Karzinom-Patientinnen dieser Studie und entspricht der in der Literatur angegebenen Spanne von 40-52 Jahren^{4, 202}.

5.1.2 Histologie

Im Kollektiv der BOT bilden die serös differenzierten mit 50,4 % (55/92) die größte histologische Gruppe, gefolgt von den 22,9 % (25/92) muzinösen, 5,5 % (6/92) endometrioiden und jeweils 2,8 % (3/92) transitional sowie gemischt differenzierten BOT. Diese prozentuale histologische Zusammensetzung steht im Einklang mit den Literaturdaten^{15, 104}. So weisen laut mehrerer Studien etwa 55 % aller BOT eine seröse Differenzierung weisen auf, 40 % sind muzinös differenziert^{15, 55}. Ungefähr 5 % der BOT zeigen andere histologische Typen, darunter 2 % gemischt, 2 % endometroid, 1 % klarzellig differenzierte und 1 % atypisch proliferierende Brenntumoren^{10, 95}. Im vorliegenden Studienkollektiv ist die Diagnose eines muzinös differenzierten BOT die zweithäufigste, wenngleich der prozentuale Anteil am Gesamtkollektiv etwas unter dem in der Literatur beschriebenen Durchschnitt liegt. Auch im Studienkollektiv der Ovarialkarzinome stellen die serösen Karzinome mit 57,9 % (62/107) die größte Gruppe dar, gefolgt von 13,1 % (14/107) endometroid, 10,3 % (11/107) gemischt, 8,4 % (9/107) klarzellig, 1,9 % (2/107) muzinös und 0,9 % (1/107) transitionalzellig differenzierten Karzinomen. 7,5 % (8/107) sind undifferenzierte Ovarialkarzinome, welche wegen

ihrer ausgeprägten Anaplasie keiner histogenetischen Gruppe zugeordnet werden können. Eine gleichartige prozentuale Verteilung der histologischen Subtypen ist auch in anderen Kollektiven der Literatur beschrieben worden^{132, 146}. Einzige Ausnahme im internationalen Kollektivvergleich ist das muzinös differenzierte Ovarialkarzinom, welches mit jeweils 10-12 % gemeinsam mit den endometrioiden, die zweitgrößte Gruppe ausmacht^{132, 146}. Einzig in der Untersuchung von Seidman *et al.*¹⁷⁹ beträgt der Anteil der muzinösen Ovarialkarzinome nur 2 %. Diese Diskrepanz älterer Studien ist dadurch zu erklären, dass hinter einem Großteil der muzinösen malignen Neoplasien im Ovar sich fehldiagnostizierte Metastasen verbergen. Laut Seidman *et al.* handelt es sich bei 77 % der muzinösen Malignome im Ovar um primär extraovarielle Karzinome¹⁷⁹. Heutzutage können diese Fehldiagnosen, welche eine unwirksame kombinierte Taxol-/Platinhaltige Chemotherapie für diese Patientinnen zur Folge haben, jedoch mit Hilfe der Immunhistologie und einem erfahrenen Pathologen vermieden werden⁷⁷. Da in diesem Kollektiv nur zwei primär muzinöse Ovarialkarzinome (darunter 1 Todesfall nach 41 Monaten) vorliegen, kann aufgrund der zu geringen Anzahl keine Aussage hinsichtlich der Prognose getroffen werden. Rodriguez *et al.*¹⁵⁹ geben die 10-Jahresüberlebensrate von 66 % an.

Der histologische Typ hat in diesem Kollektiv statistisch signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (Log-Rank-Test, $p=0,015$). Dabei haben die undifferenzierten Karzinome mit einer 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 21 %, gefolgt von den serösen Karzinomen (39,5 % 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate) und den gemischten Karzinomen (51 % 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate) die schlechtesten Prognosen im Kollektiv. Der einzige transitionalzellig differenzierte Fall (100 % 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate) kann ebenso wie die muzinösen Karzinome aufgrund der zu geringen Anzahl nicht prognostisch gewertet werden, wenngleich die Patientin ihr Tumorleiden überlebte und dieser spezielle histologische Typ auch mit einer besseren Prognose assoziiert sein soll¹⁰³. Die endometrioiden (64 % 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate) und die klarzelligen (76 % 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate) Karzinome haben in diesem Kollektiv die beste Prognose. In der Literatur sind die endometrioid differenzierten Karzinome auch jene mit der besten Prognose^{178, 201}. Ungewöhnlich ist im vorliegenden Kollektiv der sehr gute Verlauf der klarzellig differenzierten Karzinome, die in der Literatur, aufgrund der hohen Chemotherapie-Resistenz^{81, 185}, mit einer schlechten Prognose beschrieben sind¹⁷⁴. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt ist die Assoziation der klarzelligen Ovarialkarzinome dieses Studienkollektivs mit niedrigen FIGO-Stadien. Denn insgesamt wurden 80 % der klarzelligen Karzinome R0-reseziert⁶⁵. Fokussiert man hingegen auf die seröse Subgruppe, so konnte nur bei 30 % der Patientinnen eine komplette Tumorresektion nachgewiesen werden .

5.1.3 Tumorrest

Insgesamt weisen in diesem Ovarialkarzinomkollektiv Patientinnen mit einem *in situ* verbliebenen Tumorrest eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 29 % auf. Patientinnen ohne Tumorrest haben dagegen eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 75 %. Der postoperative Tumorrest ist so der stärkste unabhängige klinische und der einzige effektiv beeinflussbare Prognosefaktor, der über den

weiteren Therapieerfolg entscheidet^{22, 74, 75, 109, 146}. Entgegen früherer Einteilungen des postoperativen Tumorrestes in „makroskopisch tumorfrei“, Tumorrest ≤ 1 cm und Tumorrest > 1 cm⁴⁹, spielt es heute nur noch eine Rolle, ob ein Tumorrest vorliegt oder nicht – unabhängig von seiner Größe.

5.1.4 FIGO-Stadium

Das FIGO-Stadium ist in allen Studien ein prognosebestimmender Faktor^{43, 182, 213}. Patientinnen mit einem organbegrenzten Ovarialkarzinom, aber ohne Oberflächenbeteiligung (FIGO Ia/Ib) haben hier eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 75 %. Bei Patientinnen deren Tumor sich bereits auf das kleine Becken ausgedehnt hat, bzw. mindestens eine ovarielle Oberflächenbeteiligung aufweist, beträgt die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate 64 %. Demgegenüber leben nach 5 Jahren nur noch 30 % der Frauen mit einem weiter fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (FIGO III). Gleichartige Gesamtüberlebensraten, in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium, waren auch in dem Ovarialkarzinomkollektiv (287 Patientinnen) von Brun *et al.*²⁴ nachweisbar. Generell ist eine exakte Zuordnung der FIGO-Stadien nur nach adäquater Operation möglich. So muss zum Beispiel bei einer nicht durchgeführten Lymphonodektomie in den FIGO-Stadien I und II in etwa 25 % von einem falsch niedrigen Stadium ausgegangen werden^{26, 164}.

Bezüglich des FIGO-Stadiums bei den BOT liegen kaum vergleichbare Studienkollektive vor. In der Literatur sind die FIGO-Stadien II und III gegenüber den organbegrenzten Tumoren (FIGO I) im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose beschrieben worden⁹⁵, wenngleich die Patientinnen bei den zumeist vorliegenden nicht-invasiven Implantaten, in der Regel nicht am Tumor versterben. Vielmehr sind jene eher mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert¹⁷⁷. So weisen auch im vorliegenden Kollektiv 4 von 5 der Rezidiv-Patientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium auf.

5.1.5 Grading

Das Tumorgrading nach Silverberg hat, wenngleich dessen Anwendung in der Literatur kontrovers diskutiert wird⁷⁹, in dem vorliegenden Kollektiv einen prognostischen Wert hinsichtlich des Gesamtüberlebens (Log-Rank-Test $p=0,012$). 68 % der Patientinnen mit einem G1-bzw. *low-grade* Karzinom leben noch nach 5 Jahren. Demgegenüber weisen Frauen mit einem *high-grade* Karzinom (G2/ G3) eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 37 % auf. Nahezu idente 5-Jahresüberlebensraten konnten auch in dem Kollektiv (197 Patientinnen) von Schildkraut *et al.*¹⁶⁷ dokumentiert werden.

5.1.6 Validität

Insgesamt stimmen die vorliegenden Kollektive sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen überein. Sowohl hinsichtlich der klassischen klinisch-pathologischen, prognostisch relevanten Faktoren als auch in Bezug auf die Überlebensanalysen konnten kaum Unterschiede aufgezeigt werden. Damit sind wesentliche Voraussetzungen für die Validität der Aussagen in Bezug auf Expressionsanalyse der beiden putativen Markerproteine Cyr61 und CTGF gegeben.

5.2 Cyr61

Mittels immunohistochemischer Analysen konnte ein deutlicher Unterschied der Cyr61-Protein-Expression zwischen den BOT und den Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden. So ist Cyr61 in 69 % (74/107) der untersuchten Ovarialkarzinome aber nur in 17,4 % (16/92) der BOT exprimiert. Weiterhin ist die Expressionsintensität von Cyr61 bei den BOT viel niedriger als in den Karzinomen (Mann-Whitney-U-Test, $P < 0,0001$). Korreliert man die Cyr61-Expression mit der histologischen Differenzierung der Ovarialkarzinome, zeigt sich, dass Cyr61 hauptsächlich in schlecht differenzierten serösen, gemischten und undifferenzierten Ovarialkarzinomen (Typ-II-Karzinomen) exprimiert wird. Dagegen sind die gut differenzierten muzinösen, endometrioiden sowie klarzelligen Subtypen (im Kollektiv entsprechen diese Fälle vor allen Typ I-Karzinomen) in der Regel schwach Cyr61 positiv und insgesamt als negativ einzuschätzen. Darüberhinaus besteht auch eine statistisch signifikante Korrelation zum Nodalstatus, weswegen Cyr61 bei organbegrenzten Tumoren kaum exprimiert ist. Die Überlebensanalysen ergaben keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Cyr61-Protein-Expression und dem Gesamtüberleben, sowie dem rezidivfreien Überleben der Ovarialkarzinome. Somit ist Cyr61 kein prognostischer Marker für das Ovarialkarzinom. Dem gegenüber stehen die erst kürzlich von Watari *et al.*²¹⁸ veröffentlichten Daten zur Expression von Cyr61 in einem Endometriumskarzinom-Kollektiv, aus denen das Protein aus den multivariaten Analysen als prognostisch unabhängiger Faktor hervorgeht. Mittels Immunhistochemie und RT-PCR wiesen sie in 22,8 % (21/92) der Patientinnen mit einem endometrioid differenzierten Karzinom eine hohe Cyr61-Expression nach. Diese Patientinnen (5-Jahresüberlebensrate: 0 %) hatten gegenüber denen mit Cyr61-negativen Endometriumkarzinomen (5-Jahresüberlebensrate: 96,5 %) ein viel schlechteres Gesamtüberleben. Ein ähnlicher, statistisch aber nicht signifikanter Trend zeigte sich auch hier, da Ovarialkarzinome mit einer schwachen bis mäßigen Cyr61-Expression mit einem längeren Gesamt-, bzw. einen längerem rezidivfreien Überleben assoziiert waren, als die stark Cyr61-exprimierenden. Insgesamt stimmen die in dieser Studie generierten Cyr61-Ergebnisse mit einer früheren Ovarialkarzinom-Studie⁶² überein, wo in 63 % der untersuchten Ovarialkarzinome zehnfach höhere Cyr61-mRNA- und Protein-Level als im normalen Ovar vorlagen und auch ein Trend, Cyr61-positiver Tumoren zum reduzierten Gesamtüberleben nachweisbar war.

Ein Grund für diesen Effekt könnte die experimentell an der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV 3 nachgewiesene Carboplatin-Resistenz bei Cyr61-Überexpression sein⁶². Ähnliches war bereits an MCF-7 Brustkarzinomzelllinien beschrieben worden, wo hohe Cyr61-Level mit einer Chemotherapie-Resistenz verbunden waren¹²⁴. Rho *et al.*¹⁵⁷ wiesen *in vitro* an HeLa-Zellen, einer Zervixkarzinomzelllinie, nach, dass Cyr61 die Aktivität der Caspase 3, und damit die Carboplatin induzierte Apoptose hemmt. Auch die Ergebnisse von Gery *et al.*^{62, 222} suggerieren, daß Cyr61 über die Stimulierung anti-apoptotischer Signalwege eine Rolle bei den Ovarialtumoren spielt. Laut den *in vitro*-Experimenten von Rho *et al.* beeinflusst Cyr61 in HeLa-Zellen die Excikutionsphase der Apoptosekaskade, in dem es die Aktivitäten des Effektorproteins Caspase-3 hemmt¹⁵⁷.

Ein anderer Grund für die schlechte Prognose bei einer Cyr61-Expression im Karzinom wäre die in früheren molekularen Studien beschriebene vermehrte Expression seines Rezeptors $\alpha_v\beta_3$ -Integrin²¹². Insbesondere die Expression der α_v -Untereinheit ist laut der multivariaten Analyse von Goldberg *et al.*⁶⁴ in Ovarialkarzinomen mit einer schlechten Prognose assoziiert. In Mammakarzinomen wiesen Menendez *et al.*^{130, 131} *in vivo* nach, dass Cyr61 über die Bindung an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin die Phosphoinositol-3-kinase/Akt, letztlich die ERK/ MAPK-Signalkaskade aktiviert, und so die Tumorzelle vor der Apoptose schützt. Gleichzeitig beeinträchtigt Cyr61 den Taxol-induzierten Anstieg von Wildtyp p53, fördere die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen, sowie deren Chemotherapie(Taxol)-Resistenz. Die einzelnen Reaktionsschritte, insbesondere wie und mit welchen Proteinen Cyr61 interagiert, um die genannten, sowie teilweise noch unbekanntes Signalkaskaden zu modulieren, sind trotz zahlreicher Untersuchungen weitgehend unklar.

In den Ovarialkarzinomen dieser Studie ist Cyr61 hauptsächlich in Typ II-Karzinomen, also mäßig bis schlecht differenzierten und undifferenzierten Ovarialkarzinomen exprimiert. Diese *high-grade* Karzinome weisen laut Shih und Kurman¹⁸⁴ in 50-80 % der Fälle einen p53-Funktionsverlust auf. An dieser Stelle wäre es für zukünftige Untersuchungen interessant, ob ein p53-Funktionsverlust und/oder eine verstärkte Cyr61-Expression eine defiziente Apoptose-Induktion und damit die Chemotherapie-Resistenz bewirken.

Darüberhinaus ist Cyr61 in der Literatur als angiogener Faktor bekannt. Speziell im Ovar ist Cyr61 während der Reifung des Corpus luteum, welche mit einer rapiden Gefäßproliferation verbunden ist, in den Granulosaluteinzellen¹⁸ exprimiert. Möglicherweise stimuliert überexprimiertes Cyr61 in neoplastischen Zellen ebenfalls die Angiogenese und fördert so die Tumorprogression. Für diese Aussage gibt es bereits einzelne Evidenzen. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass Cyr61-überexprimierende Adenokarzinome des Magens stärker vaskularisiert waren, als die Kontrollzellen⁶. Auch in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 konnte im Zusammenhang mit einer erhöhten Cyr61-Expression eine höhere Gefäßdichte, sowie ein verstärkte Tumorigenität nachgewiesen werden^{62, 131}.

Da in dieser Studie eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von ER und Cyr61 besteht, liegt eine hormonabhängige Regulation der Cyr61-Überexpression nahe. In *in vitro*-Untersuchungen stieg die Cyr61-mRNA-Expression nach Östrogen-Exposition im Mamma- und Ovarialkarzinomzellen

auf das 12fache an und war durch den Östrogen-Antagonisten Tamoxifen blockierbar^{62, 222}. Auch in anderen Experimenten konnte Cyr61 als ein von Östrogen induziertes und reguliertes Gen identifiziert werden, so zum Beispiel in Endometriose-Läsionen³, in den Uteri ovariectomierter Ratten¹⁵⁸ und in Leiomyomen¹⁶⁶.

5.3 CTGF

5.3.1 CTGF-Expression im Ovar

Die Expression von CTGF und deren physiologische funktionelle Bedeutung im Ovar ist bislang in nur sehr wenigen Studien untersucht worden. Harlow *et al.*⁶⁹ beschreiben CTGF als parakrinen Regulator der Follikulogenese, welches insbesondere bei der Organisation des Corpus luteum eine Rolle spielt. Im Einklang mit den Positivkontrollen dieser Studie wiesen sie CTGF zytoplasmatisch in Granulosazellen, im Follikelwand-angrenzenden Stroma (Fibroblasten) und im ovariellen Oberflächenepithel nach. Darüberhinaus war in unseren Färbungen CTGF auch in Endothelien nahe des Gelbkörpers und in den Theca externa-Zellen exprimiert. Diese Beobachtung geht mit den Ergebnissen der *in vitro*-Experimente von Liu und Wandji *et al.* konform, wo in humanen Granulosaluteinzellen und in den Endothelien ovarieller Blutgefäße erhöhte CTGF-mRNA-/Protein-Level nachgewiesen werden konnten^{126, 217}. Man nimmt an, dass CTGF als proangiogener und ECM-modulierender Faktor während der Follikulogenese und während der Entwicklung des Gelbkörpers eine entscheidende Rolle spielt. So beschreiben Harlow⁶⁹ und Wandji²¹⁷ eine erhöhte CTGF-mRNA-Expression in den Granulosazellen präantraler Follikel, deutlich reduzierte CTGF-Level in *präovulatorischen* Follikel, und schließlich *post ovulationem* wieder eine erhöhte CTGF-Expression. Bei den in Abhängigkeit von der Zeit variierenden CTGF-mRNA-Level während der verschiedenen Follikelstadien liegt eine hormonabhängige Expressionsregulierung nahe. Liu *et al.*¹²⁶ stellten schließlich den hormonellen Zusammenhang in ihren Zellkulturexperimenten her: LH und FSH inhibieren die Expression von CTGF *prä ovulationem* und regulieren über Proteinkinase C die mRNA-Expression in den antral lokalisierten Granulosazellen. Daneben konnte in den Positivkontrollen immunhistochemisch eine kräftige CTGF-Expression in zwei von drei Zelltypen des Tubenepithels, den zilienträgenden und den sezernierenden becherzellartigen Zellen nachgewiesen werden. In der Literatur ist diese Beobachtung noch nicht beschrieben worden. Möglicherweise beeinflusst CTGF als sezerniertes Protein, in Analogie zum Ovar, zyklusabhängig die Motilität der Tubenepithelien.

5.3.2 Die CTGF-Expression im Ovarialkarzinom

Die immunhistochemische Expression von CTGF im Ovarialkarzinom ist bisher nur in einer Studie untersucht worden. Kikuchi *et al.*⁹⁹ wiesen das CTGF-Protein ebenfalls zytoplasmatisch sowohl im normalen Oberflächenepithel, als auch in einigen wenigen Tumorzellen nach. Insgesamt zeigten 82 %

(84/103) der von Kikuchi untersuchten Ovarialkarzinome eine reduzierte CTGF-Protein-Expression. Dabei waren insbesondere die FIGO-Stadien I und II stärker mit einem CTGF-Verlust assoziiert, als die fortgeschrittenen Tumorstadien (FIGO III und IV). In der vorliegenden Untersuchung ergab sich keine statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der CTGF-Expression und dem FIGO-Stadium. Sowohl in den Analysen von Kikuchi *et al.*⁹⁹ als auch in dieser Arbeit korrelierte die CTGF-Expression statistisch signifikant mit der Histologie. So wiesen im Studienkollektiv von Kikuchi *et al.*⁹⁹ 19 % der (8/42) serösen; 47 % (7/15) der muzinösen, 17 % (2/17) der endometrioiden, 6 % (2/34) der klarzelligen und 18 % (11/61) der nicht-serösen Karzinome eine CTGF-Expression auf (Chi-Quadrat-Test, **p=0,029**). Im vorliegenden Studienkollektiv waren dagegen die nicht-serösen Ovarialkarzinome durch einen geringfügig höheren Anteil CTGF-positiver Fälle charakterisiert (72,9 %, 27/37), als die serös differenzierten (62,9 %, 39/62, Chi-Quadrat-Test, **p=0,019**). Allerdings unterscheidet sich die histologische Zusammensetzung beider Kollektive. In der Studiengruppe von Kikuchi *et al.*⁹⁹ bilden die nicht-serösen Karzinome mit 59 % (61/103) der Fälle den Hauptanteil, gegenüber 41 % (42/103) serös differenzierten Ovarialkarzinomen. Damit liegt der Studie aufgrund der relativ geringen Anzahl der serösen Karzinome eine histologische Verteilung zugrunde, die nicht den Tumorkollektiven der Literatur entspricht. Daher ist bei der Kohorte von Kikuchi *et al.*⁹⁹ einerseits die Validität der statistischen Aussagekraft einschränkt und andererseits sind die Ergebnisse nicht bis in das Detail mit dem vorliegenden Kollektiv vergleichbar.

In der Studie (59 Karzinome, quantitative real-time Reverse Transkription-PCR) von Gery *et al.*⁶² wiesen 46 % der Ovarialkarzinome erhöhte CTGF-mRNA-Level im Vergleich zum normalen ovariellen Gewebe auf. Da in ihren Untersuchungen keine signifikante Assoziation zum Gesamtüberleben nachweisbar war, erfolgte keine weitere Analyse des CTGF-Proteins. Dagegen ist in dieser Untersuchung die CTGF-Expression für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben relevant. Patientinnen, deren Karzinome keine oder nur eine schwache CTGF-Expression aufwiesen, hatten eine verkürzte Überlebenszeit (Log-Rank-Test, **p=0,019**) und ein kürzeres progressfreies Überleben (Log-Rank-Test, **p=0,026**). Aus den multivariaten Analysen ging CTGF als unabhängiger Prognosefaktor für das rezidivfreie Überleben (Cox-Regression, **p=0,031**) und hinsichtlich des Gesamtüberlebens als statistischer Trend ($p=0,050$) hervor. Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte an dem untersuchten Tumorgewebe liegen. Das Problem von mRNA-Analysen an gefrorenem Tumormaterial ist stets die „Kontamination“ durch das Tumorstroma. Der Vorteil der immunhistochemischen Untersuchung ist die selektive Beurteilbarkeit der Protein-Expression.

Darüberhinaus war in einen Teil der Ovarialkarzinome eine schwache CTGF-Expression im Stroma nachweisbar. Diese Beobachtung ist insofern nicht überraschend, da bekannt ist, dass CTGF als sekretorisches Protein hauptsächlich von Fibroblasten gebildet wird¹⁶³.

In den der Arbeit zugrunde liegenden Kollektiven zeigten die BOT gegenüber den Ovarialkarzinomen eine signifikant höhere CTGF-Expression (Mann-Whitney-U-Test: **P < 0,0001**). Im Einklang mit der deutlich reduzierten CTGF-Expression in den Karzinomen wiesen Kikuchi *et al.*⁹⁹ in

Ovarialkarzinomzelllinien mittels CGH-Analysen einen homozygoten CTGF- Verlust auf Chromosom 6q23.2 nach. In ihren *in vitro*-Experimenten führte die exogene Wiederherstellung der CTGF-Expression in den Ovarialkarzinomzelllinien zum Wachstumsstillstand. Daher postulieren Kikuchi *et al.*⁹⁹, dass CTGF im Ovarialkarzinom als Tumor-Suppressor-Gen agiert. Weiterhin wiesen 12 von 23 Zelllinien eine im Vergleich zum Normalgewebe reduzierte CTGF-mRNA-Expression ohne homozygoten Genverlust auf. Zur Klärung dieses Phänomens wurde der Methylierungsstatus der CTGF-Promoterregion untersucht und sie wiesen eine inverse Korrelation desselben mit der CTGF-mRNA-Expression nach.

5.3.3 CTGF und andere Tumoren

Die bisher gewonnenen Daten zur Bedeutung von CTGF in Tumorerkrankungen sind widersprüchlich. Im Einklang mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie geht eine verminderte Expression, bzw. der Verlust von CTGF in Rhabdomyosarkomen³⁹, im Mamma-⁹³, Pankreas⁷³, Lungen-^{29, 32, 34}, oralen Plattenepithelkarzinomen¹³⁵ und Kolonkarzinomen¹²³ mit einer schlechten Prognose einher. Bei Chondrosarkomen^{85, 96, 154, 183}, der akuten lymphatischen Leukämie²¹⁴, im Wilms-Tumor¹⁹⁰, in Glioblastomen^{143, 224}, in Mammakarzinomen^{57, 222, 225}, im desmoplastischen Malignen Melanom¹⁰⁸, im Pankreaskarzinom²²⁴ und im Prostatakarzinom²²⁶ hat CTGF hingegen eine inverse Bedeutung. Im Ösophaguskarzinom ist laut Koliopanos *et al.*¹⁰² eine differente CTGF-Expression in Abhängigkeit vom histologischen Typ mit einem unterschiedlichen Überleben korreliert. So wiesen die Adenokarzinome in dieser Studie höhere CTGF-Level und ein schlechteres Gesamtüberleben auf, als die kaum CTGF-exprimierenden, prognostisch günstigeren Plattenepithelkarzinome. Dieser Sachverhalt deutet auf eine gewebespezifische, bzw. auf eine differenzierungsspezifische Wirkung von CTGF hin. Beispielsweise konnte in CTGF-überexprimierenden oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien ein vermindertes Zellwachstum im Zusammenhang mit einer reduzierten Prothymosin- α -Expression beobachtet werden¹³⁵. Prothymosin- α ist ein Target von CTGF, welches in praktisch allen Säugerzellen nukleär exprimiert wird¹⁵². Nach heutigem Kenntnisstand spielt Prothymosin- α eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung in dem es antiapoptotisch wirkt⁵⁰. Es ist in zahlreichen Karzinomen, unter anderen Mammakarzinomen und Zervixkarzinomen überexprimiert und mit einer schlechten Prognose assoziiert^{50, 128, 209}. Der Mechanismus der antiapoptotischen Wirkung von Prothymosin- α wurde in der Studie von Jiang *et al.* aufgeklärt. Die Autoren zeigten, dass Prothymosin- α die Aktivierung der Caspase-9 hemmt⁹⁴.

Ob CTGF direkt Prothymosin- α inhibiert oder ob die reduzierten Prothymosin- α -Level in CTGF-überexprimierenden Tumoren ein Sekundäreffekt darstellen, ist noch unklar, da Prothymosin- α während der Apoptose durch Caspasen proteolytisch gespalten wird⁵⁰. Ebenso ist fraglich, inwieweit Prothymosin- α im Ovarialkarzinom eine Rolle spielt.

Hartel *et al.*⁷³ zeigten in ihrer multivariaten Analyse, dass Pankreaskarzinom-Patienten länger lebten, deren Tumore hohe CTGF-Expressions-Level aufwiesen. Die Rolle von CTGF in den

Adenokarzinomen des Pankreas ist eng mit dem TGF- β -Signalweg verknüpft. Wenger *et al.*²²⁴ identifizierten in ihren *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten CTGF als unmittelbares frühes Ziel-Gen von EGF, TGF- α , TGF- β und zeigten dass eine hohe CTGF-Expression mit der Menge an desmoplastischem Stroma korrelierte. Insbesondere wiesen die Stroma-Fibroblasten höhere CTGF-Transkriptions-Level als die Epithelien auf. Diese Assoziation von CTGF als *downstream*-Mediator von TGF- β ist sowohl in Karzinomen^{57, 102, 108}, als auch bei zahlreichen fibroproliferativen Erkrankungen¹¹⁷, sowie im Rahmen der physiologisch ablaufenden Wundheilungsprozesse^{56, 66, 86} beschrieben wurden. Da weder die BOT noch die Ovarialkarzinome ein markantes desmoplastisches Stroma aufweisen, scheinen die Interaktionen von CTGF mit TGF- β bei den epithelialen Neoplasien im Ovar eher von untergeordneter Bedeutung zu sein.

In Analogie zum Ovar ist CTGF in der Lunge als ein Tumorsuppressor-Protein beschrieben worden. CTGF wird in normalen Lungengewebe (Pneumozyten Typ I und II) exprimiert, währenddessen reduzierte CTGF-Level in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen nachweisbar sind³⁴. Speziell in den Adenokarzinomen der Lunge (Kohorte von 78 Tumorpatienten) korrelierten erniedrigte CTGF-Level statistisch signifikant mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und einem kürzeren Gesamtüberleben²⁹. In den *in vitro*-Experimenten von Chien *et al.*³⁴ war die Hemmung des Tumorzellwachstums infolge erhöhter CTGF-Level mit einem G0/G1-Wachstumsarrest, einer p53-Induktion, einer Suppression der IGF-1-abhängigen Akt-Phosphorylierung und der EGF-abhängigen ERK 1/2-Phosphorylierung assoziiert³⁴. In der vorliegenden Studie ist CTGF vor allem in den BOT und den prognostisch besseren Ovarialkarzinomen exprimiert. Daher ist (1.) eine proapoptotische CTGF-Wirkung durch eine Aktivierung von p53 vorstellbar und (2.) könnte der in den Ovarialkarzinomen oft alterierte Phosphatidylinositol-3-kinase/ Akt-Signalweg^{23, 221} von CTGF beeinflusst sein. Um diesen Vermutungen nachzugehen, wären weiterführende Untersuchungen notwendig. Bislang liegen keine Evidenzen zur Interaktion CTGF-p53 und CTGF- PI3K/ Akt-Signalweg im Ovar vor.

Chang *et al.*²⁹ identifizierten in den Adenokarzinomen der Lunge *Collapsin response mediator protein-1* (CRMP-1) als ein weiteres Target von CTGF. Im Maus-Modell sanken nach Zugabe von Antikörpern gegen $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrin die CTGF und CRMP-1-Level bei gleichzeitig rapide ansteigender Metastasierungsrate, was auf eine synergistische und receptorspezifische Wirkung der beiden Proteine hindeutet. Darüberhinaus suggerieren diese Ergebnisse, dass CTGF seine tumorsupprimierende Wirkung über die Modulation mehrerer Signalwege realisiert und dass gewebespezifisch, bzw. karzinomspezifisch unterschiedliche Targets eine Rolle spielen könnten. Beispielsweise konnte im Kolonkarzinom im Maus-Modell gezeigt werden, dass CTGF über Interaktion mit seinem *downstream*-Effektor MMP 7 den β -Catenin-Signalweg negativ beeinflusst¹²³. Eine Reduktion der CTGF-Level ging mit einer gesteigerten Zellinvasion und Metastasierung einher. Möglicherweise ist CTGF im Ovar ebenfalls eng mit dem Wnt-Signalweg verknüpft.

Seit seiner Entdeckung werden CTGF immer wieder auch proangiogene Eigenschaften zugeschrieben⁸⁷. In Glioblastomen beispielsweise ist das CTGF-Protein stark zytoplasmatisch in den Tumorzellen und in proliferierenden Endothelzellen exprimiert und gilt als tumorprogressionsfördernd^{143, 224}. Andererseits ist bekannt, dass CTGF aufgrund seiner multimodularen Struktur, durch das TSP-1-Modul auch direkt an VEGF binden und dessen proangiogenen Effekte inhibieren kann⁸⁸. Es wäre also vorstellbar, dass in den Ovarialtumoren ein CTGF-Expressionsverlust mit einer gesteigerten Angiogenese und damit einem verbesserten Tumorwachstum verbunden ist.

5.4 Cyr61 und CTGF in den BOT und den Karzinomen des Ovar

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cyr61 und CTGF in einem inversen Expressionsverhältnis stehen. Offenbar haben sie als Mitglieder der CCN-Proteinfamilie trotz ihrer strukturellen Homologien differente tumorbiologische Bedeutung. Während Cyr61 im Ovarialkarzinom eher tumorprogressionsfördernde Eigenschaften zeigt, weist CTGF eine tumorsupprimierende Wirkung auf.

6. Zusammenfassung

Cyr61 und CTGF sind Mitglieder der CCN-Proteinfamilie, welche im Organismus als matrizelluläre, proangiogen und profibrotisch wirkende Proteine während der Embryogenese, der Wundheilung und in fibrosierenden Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Darüberhinaus sind aberrant exprimierte Cyr61- und CTGF-Proteine bereits in zahlreichen Tumoren sowohl in einem tumorprogressionsfördernden als auch tumorsupprimierenden Kontext beschrieben worden. Cyr61 und CTGF – so die modellhaften Vorstellungen – interagieren mit Proteinen der Zelloberfläche (z.B. Integrinen), der ECM (z.B. Heparansulfatproteoglykanen) und weiteren Interaktionspartnern (z.B. MMPs, TGF- β , VEGF) um die Angiogenese, sowie mannigfaltige zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Migration, Proliferation und die Apoptose zu regulieren.

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Expressionsanalyse der beiden strukturell verwandten Proteine Cyr61 und CTGF in Borderline-Tumoren (BOT) und Karzinomen des Ovar. Um die differentialdiagnostische sowie prognostische Bedeutung der Proteine zu klären, wurde die statistische Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern, sowie dem rezidivfreien und dem Gesamtüberleben untersucht.

Basis der vorliegenden retrospektiven Studie war paraffineingebettetes Tumormaterial und die dazugehörigen klinischen Daten von 92 BOT- und 107 Ovarialkarzinompatientinnen, die in den Jahren 1996-2005 erkrankt waren. Alle Tumoren wurden nach den aktuellen Richtlinien der WHO reklassifiziert. Die immunhistochemische Evaluation der Cyr61- und CTGF-Expression erfolgte an repräsentativem Tumorgewebe.

Insgesamt zeigten Cyr61 und CTGF ein inverses Expressionsverhältnis. Cyr61 war signifikant stärker in den Ovarialkarzinomen als in den BOT exprimiert - CTGF dagegen stärker in den BOT als in den Karzinomen. Bezüglich der klinisch-pathologischen Parameter korrelierte Cyr61 mit dem Nodalstatus, dem Grading, der Histologie und dem Östrogenrezeptorstatus der Ovarialkarzinome. Eine hohe Cyr61-Expression war besonders in nodalpositiven, gering differenzierten, serösen und östrogenrezeptorpositiven Ovarialkarzinomen nachweisbar. Die CTGF-Expression zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Anzahl der Mitosen. So exprimierten gering proliferierende Ovarialkarzinome das CTGF-Protein stark. Aus den univariaten Analysen des rezidivfreien und des Gesamtüberleben ging CTGF als prognostisch signifikanter Marker hervor. Cyr61 war dagegen prognostisch nicht relevant. In der multivariaten Analyse, adjustiert nach dem Tumorrest, ging CTGF für das rezidivfreie Überleben als unabhängiger Prognosemarker hervor.

7. Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends. 6.Auflage. Robert-Koch-Institut, 2008, S. 66-69
2. Abreu JG *et al.*: Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 599-604
3. Absenger Y *et al.*: Cyr61, a deregulated gene in endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 10 (2004) 399-407
4. Auranen A *et al.*: Borderline ovarian tumors in Finland: epidemiology and familial occurrence. *Am. J. Epidemiol.* 144 (1996) 548-553
5. Babic AM *et al.*: Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) 2958-2966
6. Babic AM *et al.*: CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 6355-6360
7. Ball DK *et al.*: Characterization of 16- to 20-kilodalton (kDa) connective tissue growth factors (CTGFs) and demonstration of proteolytic activity for 38-kDa CTGF in pig uterine luminal flushings. *Biol. Reprod.* 59 (1998) 828-835
8. Bartel F *et al.*: Both germ line and somatic genetics of the p53 pathway affect ovarian cancer incidence and survival. *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 89-96
9. Bell DA: Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod. Pathol.* 18 Suppl 2:S19-32. (2005) S19-S32
10. Bell DA, Scully RE: Ovarian serous borderline tumors with stromal microinvasion: a report of 21 cases. *Hum. Pathol.* 21 (1990) 397-403
11. Bell KA *et al.*: Refined diagnostic criteria for implants associated with ovarian atypical proliferative serous tumors (borderline) and micropapillary serous carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 25 (2001) 419-432
12. Bertz J, Kaatsch P: Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken, 2004, S. 60-63
13. Bork P: The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett.* 327 (1993) 125-130
14. Bradham DM *et al.*: Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J. Cell Biol.* 114 (1991) 1285-1294
15. Breitbach G-P & Kommos F: Borderline-Tumoren des Ovars. *Der Onkologe* 8, 1149-1159. 2002. Springer-Verlag.
16. Breitbach GP *et al.*: Treosulfan in the treatment of advanced ovarian cancer: a randomised co-operative multicentre phase III-study. *Anticancer Res.* 22 (2002) 2923-2932
17. Brigstock DR: The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr. Rev.* 20 (1999) 189-206
18. Brigstock DR: Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61). *Angiogenesis.* 5 (2002) 153-165
19. Brigstock DR: The CCN family: a new stimulus package. *J. Endocrinol.* 178 (2003) 169-175
20. Brigstock DR *et al.*: Proposal for a unified CCN nomenclature. *Mol. Pathol.* 56 (2003) 127-128
21. Brigstock DR *et al.*: Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 20275-20282
22. Bristow RE *et al.*: Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 1248-1259
23. Brugge J *et al.*: A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell.* 12 (2007) 104-107

24. Brun JL *et al.*: [Prognostic factors for survival of ovarian epithelial cancers: apropos of 287 cases]. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 28 (2000) 223-231
25. Brustmann H: Vascular endothelial growth factor expression in serous ovarian carcinoma: relationship with topoisomerase II alpha and prognosis. *Gynecol. Oncol.* 95 (2004) 16-22
26. Burghardt E *et al.*: Patterns of pelvic and paraaortic lymph node involvement in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 40 (1991) 103-106
27. Chambers SK *et al.*: Plasminogen activator inhibitor-1 is an independent poor prognostic factor for survival in advanced stage epithelial ovarian cancer patients. *Int. J. Cancer.* 79 (1998) 449-454
28. Chan WY *et al.*: Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 409-417
29. Chang CC *et al.*: Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 96 (2004) 364-375
30. Chen CC *et al.*: The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47329-47337
31. Chen N *et al.*: Identification of a novel integrin alphavbeta3 binding site in CCN1 (CYR61) critical for pro-angiogenic activities in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 44166-44176
32. Chen PP *et al.*: Expression of Cyr61, CTGF, and WISP-1 correlates with clinical features of lung cancer. *PLoS. ONE.* 2 (2007) e534
33. Chien W *et al.*: Cyr61 suppresses growth of human endometrial cancer cells. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 53087-53096
34. Chien W *et al.*: Suppression of cell proliferation and signaling transduction by connective tissue growth factor in non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 4 (2006) 591-598
35. Chintalapudi MR *et al.*: Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 mediate the proangiogenic activity of VHL-mutant renal carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 29 (2008) 696-703
36. Chuva de Sousa Lopes SM *et al.*: Connective tissue growth factor expression and Smad signaling during mouse heart development and myocardial infarction. *Dev. Dyn.* 231 (2004) 542-550
37. Cramer DW *et al.*: Factors affecting the association of oral contraceptives and ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 307 (1982) 1047-1051
38. Cramer DW, Welch WR: Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 71 (1983) 717-721
39. Croci S *et al.*: Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in a mouse model of rhabdomyosarcomagenesis. *Pathol. Oncol. Res.* 13 (2007) 336-339
40. Czernobilsky B, Kurman RJ: Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. 3. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 1988, S. 560-596
41. Daly M, Orams I: Epidemiology and Risk Assessment for Ovarian Cancer. In: *Seminars in Oncology.* 1998, S. 255-264
42. Dammeier J *et al.*: Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 (1998) 909-922
43. Dembo AJ *et al.*: Prognostic factors in patients with stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.* 75 (1990) 263-273
44. Denkert C *et al.*: Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2-specific RNA interference. *Oncogene.* 22 (2003) 8653-8661
45. Diamandis EP *et al.*: Human kallikrein 11: an indicator of favorable prognosis in ovarian cancer patients. *Clin. Biochem.* 37 (2004) 823-829
46. Diebold J: Molecular genetics of ovarian carcinomas. *Histol. Histopathol.* 14 (1999) 269-277
47. Duncan MR *et al.*: Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J.* 13 (1999) 1774-1786
48. Eguchi T *et al.*: Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol. Cell Biol.* 28 (2008) 2391-2413
49. Eisenkop SM, Spirtos NM: What are the current surgical objectives, strategies, and technical capabilities of gynecologic oncologists treating advanced epithelial ovarian cancer? *Gynecol. Oncol.* 82 (2001) 489-497

50. Evstafieva AG *et al.*: Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp. Cell Res.* 284 (2003) 211-223
51. Fajac A *et al.*: c-erbB2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis. *Int. J. Cancer.* 64 (1995) 146-151
52. Fan WH *et al.*: Connective tissue growth factor (CTGF) stimulates vascular smooth muscle cell growth and migration in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 79 (2000) 915-923
53. Fathalla MF: Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet.* 2 (1971) 163
54. Fogh J *et al.*: One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59 (1977) 221-226
55. Fox H: The concept of borderline malignancy in ovarian tumours: a reappraisal. *Curr. Top. Pathol.* 78:111-34. (1989) 111-134
56. Frazier K *et al.*: Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J. Invest Dermatol.* 107 (1996) 404-411
57. Frazier KS, Grotendorst GR: Expression of connective tissue growth factor mRNA in the fibrous stroma of mammary tumors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (1997) 153-161
58. Gao R, Brigstock DR: Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 8848-8855
59. Gao R, Brigstock DR: A novel integrin alpha5beta1 binding domain in module 4 of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes adhesion and migration of activated pancreatic stellate cells. *Gut.* 55 (2006) 856-862
60. Gellhaus A *et al.*: The circulating proangiogenic factors CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) are significantly decreased in placentae and sera of preeclamptic patients. *Reprod. Sci.* 14 (2007) 46-52
61. Genini M *et al.*: Isolation of genes differentially expressed in human primary myoblasts and embryonal rhabdomyosarcoma. *Int. J. Cancer.* 66 (1996) 571-577
62. Gery S *et al.*: Ovarian carcinomas: CCN genes are aberrantly expressed and CCN1 promotes proliferation of these cells. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 7243-7254
63. Godwin AK *et al.*: Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells: association with cytogenetic changes and implications of repeated ovulation in the etiology of ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 84 (1992) 592-601
64. Goldberg I *et al.*: Alphav integrin expression is a novel marker of poor prognosis in advanced-stage ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 4073-4079
65. Gradhand E.: Ezrin als Prognosefaktor für das Ovariakarzinom. 2007. Martin-Luther Universität Halle, Medizinische Fakultät.
66. Grotendorst GR: Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8 (1997) 171-179
67. Grzeszkiewicz TM *et al.*: CYR61 stimulates human skin fibroblast migration through Integrin alpha vbeta 5 and enhances mitogenesis through integrin alpha vbeta 3, independent of its carboxyl-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 21943-21950
68. Hamilton TC *et al.*: Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res.* 43 (1983) 5379-5389
69. Harlow CR *et al.*: Oestrogen formation and connective tissue growth factor expression in rat granulosa cells. *J. Endocrinol.* 192 (2007) 41-52
70. Harlow CR *et al.*: FSH and TGF-beta superfamily members regulate granulosa cell connective tissue growth factor gene expression in vitro and in vivo. *Endocrinology.* 143 (2002) 3316-3325
71. Harlow CR, Hillier SG: Connective tissue growth factor in the ovarian paracrine system. *Mol. Cell Endocrinol.* 187 (2002) 23-27
72. Harris R *et al.*: Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. III. Epithelial tumors of low malignant potential in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am. J. Epidemiol.* 136 (1992) 1204-1211
73. Hartel M *et al.*: Desmoplastic reaction influences pancreatic cancer growth behavior. *World J. Surg.* 28 (2004) 818-825

74. Harter P *et al.*: Surgery in recurrent ovarian cancer: the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR trial. *Ann. Surg. Oncol.* 13 (2006) 1702-1710
75. Harter P, du BA: The role of surgery in ovarian cancer with special emphasis on cytoreductive surgery for recurrence. *Curr. Opin. Oncol.* 17 (2005) 505-514
76. Hartge P *et al.*: Rates and risks of ovarian cancer in subgroups of white women in the United States. The Collaborative Ovarian Cancer Group. *Obstet. Gynecol.* 84 (1994) 760-764
77. Hauptmann S: [Differential diagnosis of ovarian metastases]. *Pathologe.* 28 (2007) 215-221
78. Hauptmann S *et al.*: Genetic alterations in epithelial ovarian tumors analyzed by comparative genomic hybridization. *Hum. Pathol.* 33 (2002) 632-641
79. Hauptmann S, Kobel M: [Prognostic factors in ovarian carcinoma]. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 89:92-100. (2005) 92-100
80. Haustein UF, Anderegg U: Pathophysiology of scleroderma: an update. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 11 (1998) 1-8
81. Hess V *et al.*: Phase I study of carboplatin, doxorubicin and weekly paclitaxel in patients with advanced ovarian carcinoma. *Ann. Oncol.* 14 (2003) 638-642
82. Holloway SE *et al.*: Increased expression of Cyr61 (CCN1) identified in peritoneal metastases from human pancreatic cancer. *J. Am. Coll. Surg.* 200 (2005) 371-377
83. Holschneider CH, Berek JS: Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin. Surg. Oncol.* 19 (2000) 3-10
84. Hwa V *et al.*: The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* 20 (1999) 761-787
85. Igarashi A *et al.*: Differential expression of connective tissue growth factor gene in cutaneous fibrohistiocytic and vascular tumors. *J. Cutan. Pathol.* 25 (1998) 143-148
86. Igarashi A *et al.*: Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J. Invest Dermatol.* 106 (1996) 729-733
87. Igarashi A *et al.*: Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol. Biol. Cell.* 4 (1993) 637-645
88. Inoki I *et al.*: Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J.* 16 (2002) 219-221
89. Ito Y *et al.*: Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int.* 53 (1998) 853-861
90. Ivkovic S *et al.*: Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development.* 130 (2003) 2779-2791
91. Jay P *et al.*: The human growth factor-inducible immediate early gene, CYR61, maps to chromosome 1p. *Oncogene.* 14 (1997) 1753-1757
92. Jedsadayamata A *et al.*: Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24321-24327
93. Jiang WG *et al.*: Differential expression of the CCN family members Cyr61, CTGF and Nov in human breast cancer. *Endocr. Relat Cancer.* 11 (2004) 781-791
94. Jiang X *et al.*: Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science.* 299 (2003) 223-226
95. Kaern J *et al.*: A retrospective study of 370 borderline tumors of the ovary treated at the Norwegian Radium Hospital from 1970 to 1982. A review of clinicopathologic features and treatment modalities. *Cancer.* 71 (1993) 1810-1820
96. Kasaragod AB *et al.*: Connective tissue growth factor expression in pediatric myofibroblastic tumors. *Pediatr. Dev. Pathol.* 4 (2001) 37-45
97. Katsube Y *et al.*: Epidemiologic pathology of ovarian tumors: a histopathologic review of primary ovarian neoplasms diagnosed in the Denver Standard Metropolitan Statistical Area, 1 July-31 December 1969 and 1 July-31 December 1979. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1 (1982) 3-16
98. Kiechle M *et al.*: Comparative genomic hybridization detects genetic imbalances in primary ovarian carcinomas as correlated with grade of differentiation. *Cancer.* 91 (2001) 534-540
99. Kikuchi R *et al.*: Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor suppressor gene connective tissue growth factor in ovarian cancer. *Cancer Res.* 67 (2007) 7095-7105

100. Kireeva ML *et al.*: Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol. Cell Biol.* 16 (1996) 1326-1334
101. Kobel M *et al.*: Ezrin promotes ovarian carcinoma cell invasion and its retained expression predicts poor prognosis in ovarian carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 25 (2006) 121-130
102. Koliopoulos A *et al.*: Connective tissue growth factor gene expression alters tumor progression in esophageal cancer. *World J. Surg.* 26 (2002) 420-427
103. Kommos F, Kommos S, Eichhorn J & Schmidt D. Das transitionalzellige Ovarialkarzinom. *Der Pathologe* 28, 209-214. 2007. Bochum, Springer-Verlag.
104. Kommos F, Richter B & Breitbach G-P. Borderline-Tumoren des Ovars. *Der Gynäkologe* 34, 1003-1012. 2001. Springer-Verlag.
105. Koninger J *et al.*: Transforming growth factor-beta pathway is activated in cholecystolithiasis. *Langenbecks Arch. Surg.* 390 (2005) 21-28
106. Kothapalli D *et al.*: Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway. *Cell Growth Differ.* 8 (1997) 61-68
107. Kristiansen G *et al.*: CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. *Am. J. Pathol.* 161 (2002) 1215-1221
108. Kubo M *et al.*: Expression of fibrogenic cytokines in desmoplastic malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.* 139 (1998) 192-197
109. Kuhn W *et al.*: Operative Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms. *Der Gynäkologe* 34 (2001) 1050-1057
110. Kunz M *et al.*: Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 45651-45660
111. Kurman RJ *et al.*: Early detection and treatment of ovarian cancer: shifting from early stage to minimal volume of disease based on a new model of carcinogenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198 (2008) 351-356
112. Lasky JA *et al.*: Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Physiol.* 275 (1998) L365-L371
113. Latinkic BV *et al.*: Xenopus Cyr61 regulates gastrulation movements and modulates Wnt signalling. *Development.* 130 (2003) 2429-2441
114. Lau DH *et al.*: Multifactorial mechanisms associated with broad cross-resistance of ovarian carcinoma cells selected by cyanomorpholino doxorubicin. *Cancer Res.* 51 (1991) 5181-5187
115. Lau LF, Lam SC: The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp. Cell Res.* 248 (1999) 44-57
116. Lau LF, Nathans D: Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J.* 4 (1985) 3145-3151
117. Leask A: Targeting the TGFbeta, endothelin-1 and CCN2 axis to combat fibrosis in scleroderma. *Cell Signal* (2008)
118. Leask A, Abraham DJ: All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J. Cell Sci.* 119 (2006) 4803-4810
119. Leask A *et al.*: The control of *ccn2* (*ctgf*) gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *Mol. Pathol.* 54 (2001) 180-183
120. Leu SJ *et al.*: Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins α v β 3 and α 6 β 1 in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 46248-46255
121. Leu SJ *et al.*: Identification of a novel integrin α 6 β 1 binding site in the angiogenic inducer CCN1 (CYR61). *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 33801-33808
122. Li Y *et al.*: [The effects of genistein on epidermal growth factor receptor mediated signal transduction pathway in human ovarian carcinoma cells lines SKOV3 and its xenograft in nude mice]. *Zhonghua Bing. Li Xue. Za Zhi.* 33 (2004) 546-549
123. Lin BR *et al.*: Connective tissue growth factor inhibits metastasis and acts as an independent prognostic marker in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 128 (2005) 9-23
124. Lin MT *et al.*: Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24015-24023

125. Lin MT *et al.*: Involvement of HIF-1alpha -dependent PAI-1 up-regulation in Cyr61/CCN1 induced gastric cancer cell invasion. *J. Biol. Chem.* . (2008)
126. Liu J *et al.*: Gonadotrophins inhibit the expression of insulin-like growth factor binding protein-related protein-2 mRNA in cultured human granulosa-luteal cells. *Mol. Hum. Reprod.* 8 (2002) 136-141
127. Maeta N *et al.*: CYR61 downregulation correlates with tumor progression by promoting MMP-7 expression in human gastric carcinoma. *Oncology.* 73 (2007) 118-126
128. Magdalena C *et al.*: Tumour prothymosin alpha content, a potential prognostic marker for primary breast cancer. *Br. J. Cancer.* 82 (2000) 584-590
129. Meinhold-Heerlein I *et al.*: Molecular and prognostic distinction between serous ovarian carcinomas of varying grade and malignant potential. *Oncogene.* 24 (2005) 1053-1065
130. Menendez JA *et al.*: The angiogenic factor CYR61 in breast cancer: molecular pathology and therapeutic perspectives. *Endocr. Relat Cancer.* 10 (2003) 141-152
131. Menendez JA *et al.*: A novel CYR61-triggered 'CYR61-alpha3 integrin loop' regulates breast cancer cell survival and chemosensitivity through activation of ERK1/ERK2 MAPK signaling pathway. *Oncogene.* 24 (2005) 761-779
132. Mink PJ *et al.*: Incidence patterns of invasive and borderline ovarian tumors among white women and black women in the United States. Results from the SEER Program, 1978-1998. *Cancer.* 95 (2002) 2380-2389
133. MO FE, Lau LF: The matricellular protein CCN1 is essential for cardiac development. *Circ. Res.* 99 (2006) 961-969
134. MO FE *et al.*: CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Mol. Cell Biol.* 22 (2002) 8709-8720
135. Moritani NH *et al.*: Suppressive effect of overexpressed connective tissue growth factor on tumor cell growth in a human oral squamous cell carcinoma-derived cell line. *Cancer Lett.* 192 (2003) 205-214
136. Moussad EE, Brigstock DR: Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol. Genet. Metab.* 71 (2000) 276-292
137. Moussad EE *et al.*: Temporal and spatial expression of connective tissue growth factor (CCN2; CTGF) and transforming growth factor beta type 1 (TGF-beta1) at the utero-placental interface during early pregnancy in the pig. *Mol. Pathol.* 55 (2002) 186-192
138. Mukudai Y *et al.*: Conserved repressive regulation of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte-specific gene 24 (ctgf/hcs24) enabled by different elements and factors among vertebrate species. *Biol. Chem.* 384 (2003) 1-9
139. Nakanishi T *et al.*: Cloning of a mRNA preferentially expressed in chondrocytes by differential display-PCR from a human chondrocytic cell line that is identical with connective tissue growth factor (CTGF) mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1997) 206-210
140. O'Brien TP, Lau LF: Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *cyr61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell Growth Differ.* 3 (1992) 645-654
141. Oemar BS *et al.*: Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation.* 95 (1997) 831-839
142. Omura GA *et al.*: Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J. Clin. Oncol.* 9 (1991) 1138-1150
143. Pan LH *et al.*: Neoplastic cells and proliferating endothelial cells express connective tissue growth factor (CTGF) in glioblastoma. *Neurol. Res.* 24 (2002) 677-683
144. Pan LH *et al.*: Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur. Respir. J.* 17 (2001) 1220-1227
145. Paradis V *et al.*: Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology.* 30 (1999) 968-976
146. Pecorelli S: [Advanced cancer of the ovary. The paclitaxel-cisplatin combination as the first-line standard of treatment]. *Recenti Prog. Med.* 90 (1999) 338-341
147. Perbal B: CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet.* 363 (2004) 62-64
148. Perbal B *et al.*: Report on the second international workshop on the CCN family of genes. *Mol. Pathol.* 56 (2003) 80-85

149. Pereira RC *et al.*: Transcriptional regulation of connective tissue growth factor by cortisol in osteoblasts. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 279 (2000) E570-E576
150. Pfisterer J, du Bois A: *Das Ovarialkarzinom*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 2002, S. 21
151. Pilarsky CP *et al.*: Expression of the extracellular matrix signaling molecule Cyr61 is downregulated in prostate cancer. *Prostate.* 36 (1998) 85-91
152. Pineiro A *et al.*: Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons. *Peptides.* 21 (2000) 1433-1446
153. Planque N, Perbal B: A structural approach to the role of CCN (CYR61/CTGF/NOV) proteins in tumorigenesis. *Cancer Cell Int.* 3 (2003) 15
154. Rachfal AW *et al.*: Expression of connective tissue growth factor (CCN2) in desmoplastic small round cell tumour. *J. Clin. Pathol.* 57 (2004) 422-425
155. Remmele W: *Weibliches Genitale*. In: *Pathologie 4*. Springer Verlag, 1997, S. 92-108
156. Remmele W, Stegner HE: [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologie.* 8 (1987) 138-140
157. Rho SB *et al.*: Cysteine-rich 61 (CYR61) inhibits cisplatin-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 23-28
158. Rivera-Gonzalez R *et al.*: Estrogen-induced genes in the uterus of ovariectomized rats and their regulation by droloxifene and tamoxifen. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 64 (1998) 13-24
159. Rodriguez IM, Prat J: Mucinous tumors of the ovary: a clinicopathologic analysis of 75 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 26 (2002) 139-152
160. Rosen B *et al.*: Systematic review of management options for women with a hereditary predisposition to ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 93 (2004) 280-286
161. Runnebaum IB, Stickeler E: Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127 (2001) 73-79
162. Russel P, Bannatyne P: Introduction to mullerian epithelial and mesenchymal tumors. In: *Surgical Pathology of the ovaries*. Churchill Livingstone, 1996, S. 191-252
163. Ryseck RP *et al.*: Structure, mapping, and expression of fisp-12, a growth factor-inducible gene encoding a secreted cysteine-rich protein. *Cell Growth Differ.* 2 (1991) 225-233
164. Sakurai S, Shimizu Y & Utsugi K. Validity of complete paraaortic and pelvic lymphadenectomy in apparent stage I (pT1) ovarian carcinoma. 38th. 2002. ASCO Annual Meeting.
165. Sampath D *et al.*: The angiogenic factor Cyr61 is induced by the progestin R5020 and is necessary for mammary adenocarcinoma cell growth. *Endocrine.* 18 (2002) 147-159
166. Sampath D *et al.*: Aberrant expression of Cyr61, a member of the CCN (CTGF/Cyr61/Cef10/NOVH) family, and dysregulation by 17 beta-estradiol and basic fibroblast growth factor in human uterine leiomyomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 1707-1715
167. Schildkraut JM *et al.*: Prognostic factors in early-onset epithelial ovarian cancer: a population-based study. *Obstet. Gynecol.* 95 (2000) 119-127
168. Schmalfeldt B *et al.*: Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 2396-2404
169. Schober JM *et al.*: Identification of integrin alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. *Blood.* 99 (2002) 4457-4465
170. Schober JM *et al.*: Identification of a novel integrin alphaMbeta2 binding site in CCN1 (CYR61), a matricellular protein expressed in healing wounds and atherosclerotic lesions. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 25808-25815
171. Schutze N *et al.*: Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Commun. Signal.* 3 (2005) 5

172. Scorilas A *et al.*: Human kallikrein 13 protein in ovarian cancer cytosols: a new favorable prognostic marker. *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 678-685
173. Scully RE: Histological typing of ovarian tumors. In: International Classification of tumors. Springer, PrFont34Bin0BinSub0Frac0DeflMargin0Margin0Jc1lIndent1440Lim0Lim1Berlin, Heidelberg, New York, 1999, S. 12-13
174. Scully RE, Young RH: Surface Epithelial-Stromal Tumors and Serous-Tumors. In: Rosai J (Hrsg.): Tumors of the Ovary, Maldeveloped Gonads, Fallopian Tube and Broad Ligament. Atlas of Tumor Pathology, Washington D.C., 1998, S. 51-79
175. Segarini PR *et al.*: The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 40659-40667
176. Sehouli J *et al.*: [Conventional and experimental prognostic factors in ovarian cancer]. *Zentralbl. Gynakol.* 126 (2004) 315-322
177. Seidman JD, Kurman RJ: Ovarian serous borderline tumors: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators. *Hum. Pathol.* 31 (2000) 539-557
178. Seidman JD, Kurman RJ: Pathology of ovarian carcinoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 17 (2003) 909-25, vii
179. Seidman JD *et al.*: Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 27 (2003) 985-993
180. Seidman JD *et al.*: Pathology of borderline (low malignant potential) ovarian tumours. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 16 (2002) 499-512
181. Serov SF, Scully RE: Histological typing of ovarian tumors. In: International classification of tumours. World Health Organization, Geneva, 1973,
182. Sevelde P *et al.*: Prognostic factors for survival in stage I epithelial ovarian carcinoma. *Cancer.* 65 (1990) 2349-2352
183. Shakunaga T *et al.*: Expression of connective tissue growth factor in cartilaginous tumors. *Cancer.* 89 (2000) 1466-1473
184. Shih I, Kurman RJ: Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am. J. Pathol.* 164 (2004) 1511-1518
185. Silverberg SG: Prognostic significance of pathologic features of ovarian carcinoma. *Curr. Top. Pathol.* 78:85-109. (1989) 85-109
186. Silverberg SG: Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 19 (2000) 7-15
187. Singer G *et al.*: Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am. J. Surg. Pathol.* 29 (2005) 218-224
188. Slee RB *et al.*: Differentiation-dependent expression of connective tissue growth factor and lysyl oxidase messenger ribonucleic acids in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 142 (2001) 1082-1089
189. Staebler A, Diebold J: [Molecular pathology of epithelial ovarian neoplasias: from the phenotype-genotype correlation to new targets in diagnostics and therapy.]. *Pathologe.* 28 (2007) 180-186
190. Stanhope-Baker P, Williams BR: Identification of connective tissue growth factor as a target of WT1 transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 38139-38150
191. Steffen CL *et al.*: Characterization of cell-associated and soluble forms of connective tissue growth factor (CTGF) produced by fibroblast cells in vitro. *Growth Factors.* 15 (1998) 199-213
192. Surveyor GA, Brigstock DR: Immunohistochemical localization of connective tissue growth factor (CTGF) in the mouse embryo between days 7.5 and 14.5 of gestation. *Growth Factors.* 17 (1999) 115-124
193. Suzuki S *et al.*: An approach to analysis of large-scale correlations between genome changes and clinical endpoints in ovarian cancer. *Cancer Res.* 60 (2000) 5382-5385
194. Szamborski J *et al.*: Case control study of high-risk factors in ovarian carcinomas. *Gynecol. Oncol.* 11 (1981) 8-16

195. Tavassoli FA DP: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. In: World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon, 2003,
196. Taylor HC. Malignant and semimalignant tumors of the ovary. *Surg.Gynecol.Obstet.* 48, 204-230. 1929.
197. Testa JR *et al.*: Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells results in well to poorly differentiated tumors with a parallel range of cytogenetic complexity. *Cancer Res.* 54 (1994) 2778-2784
198. Thigpen T *et al.*: Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer.* 71 (1993) 606-614
199. Todorovicc V *et al.*: The matrix protein CCN1 (CYR61) induces apoptosis in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 171 (2005) 559-568
200. Tong ZY, Brigstock DR: Intrinsic biological activity of the thrombospondin structural homology repeat in connective tissue growth factor. *J. Endocrinol.* 188 (2006) R1-R8
201. Tornos C *et al.*: High-stage endometrioid carcinoma of the ovary. Prognostic significance of pure versus mixed histologic types. *Am. J. Surg. Pathol.* 18 (1994) 687-693
202. Trimble CL, Trimble EL: Management of epithelial ovarian tumors of low malignant potential. *Gynecol. Oncol.* 55 (1994) S52-S61
203. Trimble CL, Trimble EL: Ovarian tumors of low malignant potential. *Oncology (Williston Park).* 17 (2003) 1563-1567
204. Trope C, Kaern J: Prognosis and management of borderline tumours of the ovary. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 8 (1996) 12-16
205. Trope CG *et al.*: Surgery for borderline tumor of the ovary. *Semin. Surg. Oncol.* 19 (2000) 69-75
206. Tsai MS *et al.*: Cyr61 promotes breast tumorigenesis and cancer progression. *Oncogene.* 21 (2002) 8178-8185
207. Tsai MS *et al.*: Expression and regulation of Cyr61 in human breast cancer cell lines. *Oncogene.* 21 (2002) 964-973
208. Tsai MS *et al.*: Expression and function of CYR61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies. *Cancer Res.* 60 (2000) 5603-5607
209. Tsai YS *et al.*: Aberrant prothymosin-alpha expression in human bladder cancer. *Urology.* 73 (2009) 188-192
210. Tsao SW *et al.*: Characterization of human ovarian surface epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFs). *Exp. Cell Res.* 218 (1995) 499-507
211. Uzumcu M *et al.*: Localization of connective tissue growth factor in human uterine tissues. *Mol. Hum. Reprod.* 6 (2000) 1093-1098
212. Vellon L *et al.*: AlphaVbeta3 integrin regulates heregulin (HRG)-induced cell proliferation and survival in breast cancer. *Oncogene.* 24 (2005) 3759-3773
213. Vergote I: Prognostic factors in stage I ovarian carcinoma. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* 63 (2001) 257-271
214. Vorwerk P *et al.*: Expression of components of the IGF signalling system in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Mol. Pathol.* 55 (2002) 40-45
215. Wahab N *et al.*: Connective tissue growth factor (CTGF) promotes activated mesangial cell survival via up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1). *Biochem. J.* 406 (2007) 131-138
216. Wahab NA *et al.*: Connective tissue growth factor CCN2 interacts with and activates the tyrosine kinase receptor TrkA. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (2005) 340-351
217. Wandji SA *et al.*: Messenger ribonucleic acids for MAC25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated during folliculogenesis and early luteogenesis. *Endocrinology.* 141 (2000) 2648-2657
218. Watari H *et al.*: Cyr61, a member of ccn (connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed) family, predicts survival of patients with endometrial cancer of endometrioid subtype. *Gynecol. Oncol.* 112 (2009) 229-234
219. Wenger C *et al.*: Expression and differential regulation of connective tissue growth factor in pancreatic cancer cells. *Oncogene.* 18 (1999) 1073-1080

220. Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F: TNM Klassifikation maligner Tumoren. Springer, Berlin, 2002, S. 152-156
221. Woenckhaus J *et al.*: Prognostic value of PIK3CA and phosphorylated AKT expression in ovarian cancer. *Virchows Arch.* 450 (2007) 387-395
222. Xie D *et al.*: Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer Res.* 61 (2001) 8917-8923
223. Xie D *et al.*: Cyr61 is overexpressed in gliomas and involved in integrin-linked kinase-mediated Akt and beta-catenin-TCF/Lef signaling pathways. *Cancer Res.* 64 (2004) 1987-1996
224. Xie D *et al.*: Levels of expression of CYR61 and CTGF are prognostic for tumor progression and survival of individuals with gliomas. *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 2072-2081
225. Yang DH *et al.*: Identification of glycosylated 38-kDa connective tissue growth factor (IGFBP-related protein 2) and proteolytic fragments in human biological fluids, and up-regulation of IGFBP-rP2 expression by TGF-beta in Hs578T human breast cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 2593-2596
226. Yang F *et al.*: Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. *Cancer Res.* 65 (2005) 8887-8895
227. Yang GP, Lau LF: Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth Differ.* 2 (1991) 351-357

8. Thesen

1. Cyr61 und CTGF sind Mitglieder der multifunktionalen CCN-Proteinfamilie. Diese Proteine interagieren mit der Extrazellulärmatrix (ECM) und nehmen Einfluss auf die Zelladäsion, -proliferation, -migration, die Angiogenese und das Tumorwachstum.
2. Die Borderline-Tumoren (BOT) und Karzinome des Ovars nehmen ihren gemeinsamen Ursprung vom Müllerschen Epithel, biologisch handelt es sich jedoch um differente Tumorentitäten.
3. Für die chirurgische und die onkologische Therapie ist die Unterscheidung zwischen einem Borderline-Tumor (BOT) und einem Ovarialkarzinom ausschlaggebend. Die diagnostische Kontroverse BOT *versus* Ovarialkarzinom wird auf histologischer Ebene entschieden, die Differenzierung ist jedoch nicht immer einfach, weshalb molekulare Marker als zusätzliches Unterscheidungsmerkmal hilfreich wären.
4. Eine Möglichkeit der Charakterisierung eines Tumor-Phänotyps ist die Definition des Immunphänotyps. Auf diese Weise können bei den Borderline-Tumoren und Karzinomen des Ovars Unterscheidungskriterien auf Proteinebene identifiziert werden, die diagnostisch mittels der Immunhistochemie dargestellt werden.
5. Die stetige Suche nach neuen biologischen Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom ist wichtig, da dieser Tumor eine der häufigsten tumorbedingten Todesursachen der Frau ist.
6. Der wichtigste bekannte Prognosefaktor für das Ovarialkarzinom ist der postoperative Tumorrest. Weitere statistisch unabhängige Prognosefaktoren sind das klinisch-pathologische Tumorstadium, der histologische Differenzierungstyp und das Lebensalter der Patientinnen.
7. Die der Studie zu Grunde liegenden Kollektive entsprechen hinsichtlich des Durchschnittsalters der Patientinnen sowie bezüglich der klinisch-pathologischen Parameter wie 5-Jahresgesamtüberlebensrate, Tumorrest, histologischer Typ, Differenzierungsgrad und FIGO-Stadium, denen der Literatur.

8. Die Proteine Cyr61 und CTGF zeigen in den BOT und den Karzinomen des Ovars ein inverses Expressionsverhältnis. Eine stärkere Cyr61-Expression liegt in den Ovarialkarzinomen vor. Dagegen exprimieren die BOT stärker CTGF als die Karzinome.
9. Eine starke Cyr61-Expression weisen die serös differenzierten (**p=0,013**), *high grade* (**p=0,035**), nodalpositiven (**p=0,040**) und östrogenrezeptorpositiven (**p=0,038**) Ovarialkarzinome auf.
10. Eine starke Cyr61-Proteinexpression ist in den Ovarialkarzinomen mit einer schlechten Prognose assoziiert, da Cyr61 antiapoptotisch, chemotherapieresistenz-induzierend und proangiogen wirkt.
11. Für das Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen ist in den multivariaten Berechnungsverfahren die Cyr61-Expression im Tumor prognostisch nicht von Bedeutung.
12. Ovarialkarzinome mit einer geringen Mitoserate (< 10 Mitosen/ HPF) exprimieren stark CTGF (**p=0,012**).
13. Die nicht-serösen Ovarialkarzinome zeigen häufiger eine starke CTGF-Expression als serös differenzierte (**p=0,019**).
14. Patientinnen mit einem stark CTGF-exprimierenden Ovarialkarzinom haben ein besseres rezidivfreies- (**p=0,026**) und Gesamtüberleben (**p=0,019**) als jene ohne CTGF-Expression.
15. Stark CTGF-exprimierende Ovarialkarzinome sind mit einer besseren Prognose assoziiert, da CTGF auf die Tumorzellen proapoptotisch und anti-angiogen wirkt.
16. Aus der multivariaten Überlebensanalyse ging CTGF für das rezidivfreie Überleben als unabhängiger Prognosemarker hervor (**p=0,031**).
17. Cyr61 und CTGF haben als Mitglieder der CCN-Proteinfamilie trotz ihrer strukturellen Homologien differente tumorbiologische Bedeutung.

9 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Alle benutzten Hilfsmittel, die Literatur sowie die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sind vollständig angegeben.

Kiel, den 28.05.2009

Katharina Balschun

10 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den 28.05.2009

Katharina Balschun

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Ruth Katharina Balschun, geb. Zeng
am 07.11.1980 in Mühlhausen/ Thüringen
verheiratet

Berufsausbildung

seit 9/2008

Assistenzärztin in Weiterbildung
Institut für Pathologie der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel
(Direktor: Prof. Dr. C. Röcken)

06/2006–8/2008

Assistenzärztin in Weiterbildung
Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. S. Hauptmann)

Promotion

seit 2004

Expressionsanalyse von Cyr61 und CTGF in den Borderline-
Tumoren und Karzinomen des Ovars

Hochschulausbildung

1999-2006

Studium der Humanmedizin
an der Martin-Luther-Universität Halle –Wittenberg

05/2006

3. Staatsexamen, Approbation

Schulbildung

1991-1999

Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasium Großgotttern
Allgemeine Hochschulreife

1987-1991

Grundschule Weberstedt

Kiel, 28.05.2009

12 Hinweise auf Veröffentlichung von Resultaten dieser Arbeit

EZRIN PROMOTES OVARIAN CARCINOMA CELL INVASION AND ITS RETAINED EXPRESSION PREDICTS POOR PROGNOSIS IN OVARIAN CARCINOMA.

Kobel,M.; Gradhand,E.; **Zeng,K.**; Schmitt,W.D.; Kriese,K.; Lantzsch,T.; Wolters,M.; Dittmer,J.; Strauss,H.G.; Thomssen,C.; Hauptmann,S.

Int J Gynecol Pathol 25 (2006) 121-130

BOTH GERM LINE AND SOMATIC GENETICS OF P53 PATHWAY EFFECT OVARIAN CANCER INCIDENCE AND SURVIVAL.

Bartel,F.; Jung,J.; Bohnke,A.; Gradhand,E.; **Zeng,K.**; Thomssen,C.; Hauptmann,S.

Clin Cancer Res 14 (2008) 89-96

EXPRESSION OF THE RNA-BINDING PROTEIN IMP1 CORRELATES WITH POOR PROGNOSIS IN OVARIAN CARCINOMA.

Kobel,M.; Weidensdorfer,D.; Reinke,C.; Lederer,M.; Schmitt,W.D.; **Zeng,K.**; Thomssen,C.; Hauptmann,S.; Huttelmaier,S.

Oncogene (2007) 7584-7589.

GENOTYPIC RELATIONSHIP BETWEEN SEROUS OVARIAN BORDERLINE TUMORS AND PERITONEAL IMPLANTS

Bartel,F.; Taubert,H.; Gerono,E.; **Balschun,K.**; Gradhand,E.; Kriese,K.; Hauptmann,S

Manuscript submitted

CYR61- AND CTGF-PROTEIN-EXPRESSION IN OVARIAN BORDERLINE-TUMOR AND CARCINOMAS

Balschun,K.; Bartel,F.; Gradhand,E.; Dittmer,J.; Strauss,H.G.; Thomssen,C.; Hauptmann,S.

Manuscript in preparation

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die direkt und indirekt zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, indem sie mir durch ihren Rat und ihre Unterstützung behilflich waren.

Herrn Professor Dr. med. Steffen Hauptmann danke ich nicht nur für die Ermöglichung der Promotion und die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskriptes, sondern vor allen für das Interesse und die Freude an der Gynäkopathologie, welche er in mir geweckt hat.

Bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Jürgen Dittmer, der die damals noch „jungen“ Proteine Cyr61 und CTGF erstmals ins Gespräch brachte und in dessen Labor praktisch alles begann.

Ein Danke an Dr. med. Martin Köbel, der mir im ersten Promotionsabschnitt mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein Dank gilt Dr. Frank Bartel für die praktischen Tips beim Schreiben der Arbeit und die stets schnelle Durchsicht des Manuskripts.

Ein großes Danke an Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Holzhausen, Dr. med. Wolfgang Schmitt und Dr. med. Elise Gradhand für die Hilfe bei der Lösung so manchen Problems.

Jana Beer, die ich stellvertretend für alle MTA`s nennen möchte, danke ich für die praktischen „Tips und Tricks“ im Labor.

Der größte Dank gebührt jedoch Tobias, meiner Familie und Freunden für die unbegrenzte Unterstützung und Anteilnahme, so dass ich nun zu guter Letzt glücklich sagen kann:

Gottseidank!