

Aus dem Institut für Pathologie und Neuropathologie

der Universität Tübingen

Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. F. Fend

**SOX2 Expression und die
prognostische Bedeutung bei Ovarialkarzinomen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Deborah Lan Pham**

**aus
Böblingen**

2013

Dekan: Professor Dr. med. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. A. Staebler

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Perner

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
	EPIDEMIOLOGIE	1
	EINTEILUNG DER OVARIALNEOPLASIEN	2
	ENTSTEHUNGSTHEORIEN	4
	MOLEKULARE ABERRATIONEN.....	5
	SOX2.....	6
	ZIELE DIESER ARBEIT	8
2	MATERIAL UND METHODEN	10
	KOLLEKTIV	10
	ERSTELLUNG DES GEWEBE-MIKROARRAYS (TMA).....	13
	IMMUNHISTOCHEMIE	16
	2.1.1 <i>Allgemeine Immunhistochemie</i>	16
	2.1.2 <i>Immunhistochemische Färbung für SOX2</i>	17
	2.1.3 <i>Auswertung der Immunhistochemie</i>	18
	FLUORESCENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (FISH).....	19
	2.1.4 <i>FISH allgemein</i>	19
	2.1.5 <i>FISH für SOX2</i>	20
	2.1.6 <i>Auswertung der FISH</i>	22
	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	23
3	ERGEBNISSE.....	24
	SOX2 EXPRESSIONSSTATUS IM KOLLEKTIV	24
	3.1.1 <i>SOX2 und histologischer Typ</i>	28

3.1.2	SOX2 und Tumorstadium	29
3.1.3	SOX2 und Tumorgrad.....	30
	SOX2 AMPLIFIKATIONSSTATUS DER SERÖSEN KARZINOME.....	31
	SOX2 EXPRESSION UND ÜBERLEBENS DATEN.....	35
3.1.4	<i>SOX2 positive seröse high-grade Karzinome haben eine signifikant bessere Prognose</i>	<i>35</i>
	SOX2 IM KONTROLLGEWEBE	37
4	DISKUSSION.....	39
5	ZUSAMMENFASSUNG	44
6	TABELLENVERZEICHNIS	46
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	47
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	48
9	ANHANG	54
	FIGO KLASSIFIKATION.....	54
10	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	55
11	ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL.....	56
12	DANKSAGUNG	57

Häufige Abkürzungen

AGO	Arbeitsgemeinschaft Onkologische Gynäkologie e.V.
BL	Borderline
DNA	Engl.: desoxyribonucleic acid
FGF4	Engl.: fibroblast growth factor 4
FIGO	Franz.: Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
HIER	Engl.: heat induced epitope retrieval
HMG	Engl.: high-mobility-group
IHC	Immunhistochemie
IPS	Induzierte pluripotente Stammzelle
LAB	Engl.: labeled avidin-biotin
SOX	Engl.: sex determining region Y - box 2
SRY	Engl.: sex-determining region Y
TMA	Engl.: tissue microarray
TP53	Tumorsuppressorgen 53
WHO	Engl.: World Health Organization

1 Einleitung

Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom tritt weltweit mit einer Inzidenz von über 200.000 Fällen pro Jahr auf und ist der vierthäufigste maligne Tumor der Frau [1]. Ovarialkarzinome stehen weltweit an siebter Stelle der durch maligne Tumorerkrankungen bedingten Todesursachen unter Frauen. In Industrienationen stehen sie an sechster Stelle [2]. In Europa beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) 40%, womit die Prognose des Ovarialkarzinoms weiterhin ungünstig ist [3]. Dabei hängt diese stark vom initialen Tumorstadium zum Diagnosezeitpunkt ab. So beträgt die 5-JÜR bei Frauen mit dem Initialstadium FIGO IA-C (vgl. Anhang: Klassifikation nach FIGO), d.h. mit einer Begrenzung des Tumors auf die Ovarien, 78% bis 89%. Breitet sich der Tumor weiter im Becken aus (FIGO IIA-C) und greift auf das Peritoneum und/oder regionäre Lymphknoten über (FIGO IIIA-C), sinkt die 5-JÜR auf 68% (FIGO IIC) bzw. 28% (FIGO IIIC). Bei Ausbildung von Fernmetastasen (FIGO IV) überleben nur noch 16% der Patientinnen das fünfte Jahr nach Erstdiagnose [4]. In 65% der Fälle stellen sich die Frauen in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (FIGO III und IV) vor. Hauptgrund hierfür ist, dass die klinische Symptomatik, die zur diagnostischen Abklärung führt, anfangs oft unspezifisch ist und häufig erst in fortgeschrittenem Tumorstadium auftritt [3]. Dabei ist eine en-bloc Tumorresektion ohne Residualtumor oft nicht möglich, da sich diese fortgeschrittenen Tumoren intraoperativ meist gemeinsam mit einem Befall des Omentums, des Darms, des Mesenteriums, einer ausgedehnten Peritonealkarzinose und einem Mitbefall des Diaphragmas zeigen [5, 6]. Aktuell besteht der Grundpfeiler der Therapie aus einer Kombination von Tumorresektion und anschließender Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel [7]. Neben Alter und Tumorstadium bei Diagnosestellung ist der wichtigste unabhängige Prognosefaktor für das Überleben nach Tumorresektion, wie von Griffiths et al. schon 1975 festgestellt, bis heute die Größe des verbleibenden Resttumoranteils nach operativer Tumorresektion [8-12].

Obwohl 80% der Tumoren anfänglich gut auf Chirurgie und Chemotherapie ansprechen, sterben letztendlich über 70% der Frauen im Verlauf an den Komplikationen der fortschreitenden Erkrankung [13]. Somit ist das Ovarialkarzinom mit einer 5-JÜR um 40% vor dem Zervix- (5-JÜR: 60-75%) und dem Endometriumkarzinom (5-JÜR: 78%) immer noch das Malignom des weiblichen Genitaltraktes mit der ungünstigsten Überlebensprognose [14].

Das Gesamtüberleben der Frauen mit Ovarialkarzinom hat sich in den letzten 50 Jahren trotz der Verbesserungen der chirurgischen Resektionstechnik [10, 15-18] und verbesserter adjuvanter Chemotherapieschemata nicht wesentlich verbessert [7, 19-21]. Lag die 5-JÜR bei einem Tumor, der 1975 diagnostiziert wurde bei 37%, so verbesserte sich diese bei einem 2002 diagnostizierten Karzinom auf 43%, was v.a. auf die Einführung spezifischer Chemotherapeutika zurückzuführen ist. Betrachtet man aber die Veränderung in der 10-JÜR, so gibt es zwischen Tumoren die 1975 diagnostiziert wurden und solchen, die 1999 diagnostiziert wurden, lediglich eine Verbesserung von 32% auf 33.9% [22].

Da bis heute keine zuverlässigen Methoden zur frühen Tumordetektion gefunden werden konnten [23], sollte der Fokus auf die Entschlüsselung der molekularen Pathomechanismen, die bei der Manifestation und Progression des Ovarialkarzinoms beteiligt sind, gerichtet werden, um spezifische Diagnoseverfahren zur frühzeitigeren Tumordetektion zu finden und alternative, möglichst individualisierte Therapieansätze zu entwickeln.

Einteilung der Ovarialneoplasien

Ovarialneoplasien stellen eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren dar. Nach der Einteilung abhängig vom Ausgangsgewebe im Ovar, unterscheidet die WHO-Klassifikation zwischen Tumoren, die:

- aus den Keimzellen hervorgehen
- solchen, die sich aus den bindegewebigen Anteilen entwickeln,

- metastatischen Sekundärtumoren und
- epithelialen Tumoren, die aus dem Ovar epithel hervorgehen.

Unterschieden wird jeweils zwischen benignen und malignen Formen, sowie Tumoren von Borderline Dignität. Diese stellen eine Übergangsform dar. Die vorliegende Arbeit wird sich hauptsächlich mit den malignen Tumoren der epithelialen Gruppe beschäftigen.

Eine weitere Unterteilung erfolgt aufgrund verschiedener, pathologischer Gewebecharakteristika in folgende histologische Typen [24]:

- seröse Ovarialkarzinome
- muzinöse Ovarialkarzinome
- endometrioides Ovarialkarzinome
- klarzellige Ovarialkarzinome
- transitionalzellige Ovarialkarzinome
- gemischte epitheliale Ovarialkarzinome
- undifferenzierte Ovarialkarzinome

Alle Typen weisen eine starke Ähnlichkeit zu anderen Organen des weiblichen Genitaltrakts auf, so z.B. das endometrioides Ovarialkarzinom zum Endometrium des Uterus [25, 26].

Klinische und pathologische Studien zeigen, dass diese Tumoren weiter in zwei große Hauptgruppen unterteilt werden können, deren Unterscheidung nicht anhand histologischer Kriterien erfolgt, sondern sich aus den verschiedenen Entstehungswegen der Karzinome ergibt [27]. Zu Gruppe I gehören alle low-grade serösen, endometrioiden, klarzelligen und muzinösen Tumoren. Ihnen ist gemeinsam, dass sie sich stufenweise langsam von einer gutartigen Läsion zu einem Borderline Tumor entwickeln, welcher bereits Zell- und Gewebetypen aufweist, allerdings noch keine Invasion in das umliegende Gewebe zeigt. Aus diesem geht anschließend ein low-grade Karzinom hervor. Bei Erstdiagnose sind diese Tumoren meist noch auf das Ovar begrenzt, entsprechend FIGO Stadium I. Sie sind genetisch relativ stabil, besitzen also keine Mutationen des

Tumorsuppressorgens 53 (TP53), wobei jeder histologische Typ wiederum durch ein typisches Set an Mutationen von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen charakterisiert ist [28].

Die Tumoren, die zu Gruppe II gehören, zeigen dahingegen eine hochmaligne, schnelle Progredienz mit Tendenz zur frühen Umgebungsinvasion. In den Genotypen dieser Tumorarten findet man viele chromosomale Aberrationen. Über 80% der Fälle weisen eine TP53 Mutation auf. Die Vielzahl der genetischen Anomalien unterscheidet sich deutlich von denen der Gruppe I-Tumoren, zeigt jedoch innerhalb dieser zweiten Gruppe gemeinsame besonders häufige auftretende Aberrationen, so z.B. Amplifikationen in den Regionen 3q und 8q. Zur Gruppe II gehören die high-grade malignen serösen und endometrioiden Ovarialkarzinome und die Ovarialkarzinosarkome.

Entstehungstheorien

Diese genetischen Unterschiede zwischen den beiden Tumorgruppen innerhalb eines Organs legen nahe, dass verschiedene Tumorarten vorliegen, die von unterschiedlichen Geweben abstammen. Über den Ursprung, die Entstehung und die beteiligten Pathomechanismen, die zur Ausbildung dieser verschiedenen Tumorarten führen, gibt es beim Ovarialkarzinom unterschiedliche Theorien.

Eine dieser Theorien geht davon aus, dass am Anfang eine von Ovarialmesothel ausgekleidete Inklusionszyste steht. Diese durchläuft unter Einfluss verschiedener, u.a. auch lokaler Faktoren wie z.B. Steroidhormonen, eine metaplastische Veränderung. Dabei entwickeln sich die verschiedenen histologischen Zelltypen, die zum Spektrum der Ovarialkarzinome zählen. All diese haben Ähnlichkeiten zu anderen Geweben des weiblichen Geschlechtstrakts [29]. Dieser Entstehungsmechanismus wird vor allem bei den serösen low-grade Karzinomen, sowie den endometrioiden und muzinösen Karzinomen postuliert.

Dementsprechend findet man bei diesen Karzinomen auch häufig die Sequenz vom Adenom zum Borderline Tumor zum low-grade Karzinom. Wegen dieser Gemeinsamkeit werden diese Typen der Ovarialkarzinome auch unter dem Typ I der Ovarialkarzinome zusammengefasst. Da man aber in Untersuchungen an Ovarialkarzinomen kaum Vorgängerläsionen für seröse high-grade Karzinome (Typ II Karzinom) fand, werden für diese Gruppe andere Entstehungstheorien in Erwägung gezogen.

So besagt eine weitere Theorie, dass Ovarialtumoren mit Ähnlichkeiten zum Müller'schen Epithel, d.h. seröse, endometrioide und klarzellige Tumoren, aus dem sogenannten sekundären Müller'schen System hervorgehen. Dazu gehören alle Zellen, die nach der Entwicklung von Uterus, Tuben und Vagina aus dem Müller'schen Gang in der Embryonalzeit als residuale Zellen übrig bleiben. Dies sind das Ovarmesothel und Teile des Peritoneums. Dieses fimbrienbesetzte Säulenepithel, soll ebenfalls Zysten bilden, die im Verlauf entdifferenzieren und schließlich einen zunehmend großen malignen Tumor ausbilden, dessen lokale Ausbreitung so umfassend ist, dass letztendlich keine eindeutige Zuordnung zur Herkunft aus Tube oder Ovar mehr möglich ist [30].

Ähnlich ist eine weitere Theorie, die den Ursprung des Tumors im Tubengewebe vermutet und davon ausgeht, dass gerade ein Teil der größten Gruppe der Ovarialkarzinome, die serösen high-grade Karzinome, sich ursprünglich als seröse, intraepitheliale Karzinome im fimbrienbesetzten Teil der Tube ausbilden und anschließend in die Ovarien streuen. Jüngste Studien halten diese Theorie für sehr wahrscheinlich [31-34].

Molekulare Aberrationen

Die Betrachtung von Ovarialkarzinomen auf molekularer Ebene führte zu einer weiteren Differenzierung der möglichen Entstehungsmechanismen. Genomumfassende Analysen chromosomaler Amplifikationen und Deletionen in Ovarial-

karzinomgewebe zeigten zahlreiche wiederkehrende Aberrationen, v.a. in high-grade Karzinomen. Die häufigsten Amplifikationen finden sich in den Chromosomenabschnitten 3q, 8q, 19q und 20 [35, 36]. Interessanterweise beherbergen viele dieser vervielfältigten Regionen Gene, die für Proteine kodieren, welche bekanntermaßen zur Ausprägung des embryonalen Stammzellphänotyps beitragen [37]. Dazu gehört auch der Transkriptionsfaktor SOX2 auf dem Chromosomenabschnitt 3q26 [37], c-myc auf 8q [38] und Notch3 auf 19q [35]. Dabei wurde in vorhergehenden Untersuchungen der deutlichste Unterschied zwischen serösen high-grade und low-grade Karzinomen gefunden: Gerade die am häufigsten amplifizierte Region 3q26, welche SOX2 beinhaltet, wurde bei den serösen high-grade Karzinomen signifikant häufiger amplifiziert gefunden als bei den serösen low-grade Karzinomen [36].

Auch bei Tumoren anderer Ursprungsgewebe fand man diese Genamplifikation. So fand man bei Untersuchungen an Plattenepithel- und Adenokarzinomen der Lunge ebenfalls eine häufige Amplifikation dieser Region [39, 40]. Dabei wurde die Überexpression des SOX2 Proteins als direkte Konsequenz einer hohen Kopieanzahl der Region 3q26.33 beobachtet und so der Transkriptionsfaktor SOX2 als zugehörige Zielregion identifiziert [37, 41, 42].

SOX2

Die Abkürzung SOX steht für SRY BOX. Dabei ist SRY die geschlechtsbestimmende Region auf dem Y Chromosom (engl.: sex-determining region of Y). Diese Region gehört zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die über eine sogenannte HMG (engl.: high-mobility-group) Domäne verfügen, über welche die DNA Bindung vermittelt wird. Da alle Proteine der SOX Familie eine ebensolche HMG Domäne besitzen, die in ihrer Struktur sehr ähnlich zu der des Transkriptionsfaktors SRY auf dem Y Chromosom ist, haben sie den Namen SRY BOX, kurz SOX, erhalten. Erstmals beschrieben wurde diese Gruppe von Proteinen Anfang der 90er Jahre [43].

SOX Proteine verfügen über spezielle Eigenschaften der DNA Bindung. Sie können im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktoren in der kleinen Furche der DNA binden. Dadurch wirken sie in engster Nachbarschaft zu anderen Transkriptionsfaktoren. Weiterhin können sie Konformationsänderungen der DNA Struktur bewirken. Deswegen schreibt man ihnen eine wichtige architektonische Rolle bei der Bildung biologisch wirksamer Multiproteinkomplexe aus verschiedenen DNA Bindungsproteinen zu [44, 45]. 20 dieser 30 bisher entdeckten SOX Gene spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Organentwicklung und der Bestimmung von Apoptose, Zellerneuerung und -erhaltung [46]. In-vivo wird SOX2 in der frühen Embryogenese exprimiert und spielt eine wichtige Rolle im Zellschicksal von embryonalen und extra-embryonalen Zelltypen [47, 48]. So wurden sie bei verschiedenen Säugern, insbesondere bei Mäusen, schon in den frühen Entwicklungsstadien des Embryoblasten, des zentralen Nervensystems, des primitiven Ektoderms und der Augenlinse nachgewiesen [49]. Mausembryonen, die eine homozygote Deletion des SOX2 Gens trugen, starben hingegen bereits bei der Implantation der Blastozyste [50].

Auch im Zusammenspiel mit anderen Faktoren spielt SOX2 eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklung. So reguliert es gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor Oct3/4 die Expression von Genen, die an der frühen Embryogenese beteiligt sind, wie dem fibroblast growth factor (FGF4) und Osteopontin [46, 51]. Im zentralen Nervensystem wurde SOX2 in den frühen Entwicklungsstadien der Neuralplatte und des Neuralrohrs gefunden. Es wird angenommen, dass SOX2 die neuronale Differenzierung dieser Zellen initiiert. Später hingegen wird SOX2 nur noch in den neuroepithelialen Zellen der periventrikulären germinalen Matrix gefunden. Diese besitzen einen unreifen Phänotyp und sind dazu befähigt sich zu teilen. Bei weiterer Differenzierung und Migration dieser Zellen aus der Keimmatrix hinaus in Richtung ihrer Zielgebiete der späteren grauen Substanz, verliert sich der Nachweis von SOX2. [52-56]. Man fand SOX2 jedoch auch in unreifen Phänotypen von Teratomen und Glioblastomen des zentralen Nervensystems [57]. Aus Gewebe kindlicher Medulloblastome und Gliome wurden überdies Krebsstammzellen isoliert, die SOX2 exprimieren [58]. Ein Knockdown

des Proteins in diesen Zellen führte dabei zu einem Proliferationsstopp und einer Verringerung ihrer Tumorigenität [59].

Insbesondere SOX2 spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von Zellerneuerung und Pluripotenz in humanen embryonalen Stammzellen. Dabei hilft es ihnen ihr Differenzierungspotential beizubehalten. Eine Unterdrückung von SOX2 in diesen Zellen führt zu einem Verlust des undifferenzierten Stammzellstatus und einer verringerten Expression zahlreicher entscheidender Stammzellfaktoren [60]. SOX2 ist gemeinsam mit anderen embryonalen Stammzellfaktoren, wie Nanog und Oct3/4, außerdem an der Umwandlung adulter Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen (IPS) beteiligt [61].

SOX2 ist jedoch in den Keimzellen der frühen embryonalen Gonaden bis zu den vollständig entwickelten Testes und Ovarien von Erwachsenen nicht zu finden [62].

Ziele dieser Arbeit

Bisher weiß man wenig über die Rolle von SOX2 in der Pathogenese des Ovarialkarzinoms. Es ist lediglich die Tatsache bekannt, dass genau derjenige Chromosomenabschnitt, der das SOX2 Gen trägt, bei der histologischen Gruppe der serösen Ovarialkarzinome in vielen Fällen amplifiziert ist [36, 37]. Dieser Unterschied im Auftreten von SOX2 in den verschiedenen Tumorguppen rechtfertigt weitere Untersuchungen, die diesen Zusammenhang genauer betrachten.

Bei Aufnahme der eigenen Untersuchungen im April 2009 waren noch keine Untersuchungen an Ovarialkarzinomen zum nukleären SOX2 Expressionsstatus veröffentlicht. Somit war es das Hauptziel dieser Arbeit die nukleäre Expression des SOX2 Proteins in einem Patientenkollektiv, das sich aus den verschiedenen histologischen Typen der Ovarialkarzinome zusammensetzt, zu untersuchen.

Dazu wurde ein Gewebe Microarray (TMA) erstellt, der das gesamte Patientenkollektiv auf wenigen Paraffinblöcken zusammenfasst. Anschließend wurde das in Paraffin eingebettete Gewebe mittels Immunhistochemie auf seine SOX2 Expression untersucht. Abschließend erfolgte die Korrelation dieser Ergebnisse mit den klinisch-pathologischen Daten und dem klinischen Outcome.

Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen SOX2 Expression und der Amplifikation des SOX2 Gens mithilfe einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-(FISH) Analyse untersucht.

2 Material und Methoden

Kollektiv

Es wurde retrospektiv eine Datenbank von 230 Patientinnen erstellt, bei denen in den Jahren zwischen 2000 und 2008 konsekutiv die Diagnose eines Ovarialkarzinoms gestellt wurde und die daraufhin an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen behandelt wurden. Alle Patientinnen unterzogen sich einer chirurgischen Behandlung und erhielten, falls angezeigt, eine Platin enthaltende Chemotherapie, die auf den aktuellen Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) basiert (www.ago-online.de) [7].

Stadium	Therapie nach AGO-Leitlinien
FIGO IA, Grad 1	Rein operative Therapie (optimal R0-Resektion) wenn möglich fertilitätserhaltend
FIGO I-IIA (ohne IA,G1)	Operative Therapie (optimal R0-Resektion) Adjuvante platinhaltige Chemotherapie, 6 Zyklen
FIGO IIB-IV	Operative Therapie (optimal R0-Resektion) Adjuvante platin- und taxanhaltige Chemotherapie, 6 Zyklen

Tabelle 1: Therapieempfehlungen für die Behandlung des Ovarialkarzinoms basierend auf den aktuellen Leitlinien der AGO [7].

Die weiteren Verlaufsdaten dieser Patientinnen wurden von der Patientenregistrierung des Tübinger Krebszentrums erfasst.

Alle histologischen Schnitte zu diesen Fällen wurden aus dem Archiv des pathologischen Instituts bezogen und von einer Pathologin mit Zusatzausbildung im Bereich der Gynäkopathologie (A.S.) überprüft. Für jede Patientin wurden histologischer Typ und Grad des jeweiligen Tumors erfasst.

Letztendlich konnten von 215 (92.5%) Patientinnen entsprechende Paraffinblöcke gefunden werden, die sich zur Erstellung eines Gewebe Microarrays (TMA) eigneten. Darunter waren 154 seröse, 39 endometrioid, 11 klarzellige, 5 muzinöse und 6 transitionale Karzinome vertreten (Abbildung 1). 152 (70.7%) Tumore befanden sich zum Diagnosezeitpunkt in Stadium FIGO III und somit in einem fortgeschrittenen Stadium. 130 (60.5%) Tumore waren mit Differenzierungsgrad drei schlecht differenziert, 62 (28.4%) mäßig und 18 (8.4%) gut differenziert. Weiterhin fanden sich auch 5 Borderline Tumore im Kollektiv. 66 (30.7%) Tumore präsentierten sich initial mit dem Lymphknotenstatus N0, d.h. ohne einen Befall der Lymphknoten. Bei 93 (43.3%) Karzinomen waren auch die Lymphknoten tumorinfiltriert (N1) (Tabelle 2).

Klinisch-pathologische Parameter	Serös		Endometrioid		Klarzellig		Transitionalzellig		Muzinös		Gesamt	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Total	154	(71.6)	39	(18.1)	11	(5.1)	6	(2.8)	5	(2.3)	215	(100)
Tumor Stadium*												
I	8	(5.2)	15	(38.5)	4	(36.4)			4	(80)	31	(14.4)
II	22	(14.4)	7	(17.9)	1	(9.1)					30	(14.0)
III	123	(80.4)	17	(43.6)	6	(54.5)	5	(80)	1	(20)	152	(70.7)
Tumor Grad												
BL	5	(3.2)									5	(2.3)
G1	3	(1.9)	11	(28.2)					4	(80)	18	(8.4)
G2	44	(28.6)	17	(43.6)					1	(20)	62	(28.8)
G3	102	(66.2)	11	(28.2)	11	(100)	6	(100)			130	(60.5)
LK-Status												
N0	27	(17.5)	27	(69.2)	7	(63.6)	3	(50)	2	(40)	66	(30.7)
N1	81	(37.7)	9	(23.1)					3	(60)	93	(43.3)

Tabelle 2: Zusammensetzung des Studienkollektivs aufgeschlüsselt nach histologischem Typ und den klinisch-pathologischen Parametern Tumorstadium, Tumorgrad und Lymphknotenstatus (LK-Status). * Bei 2 Fällen waren keine Angaben über das Tumorstadium verfügbar.

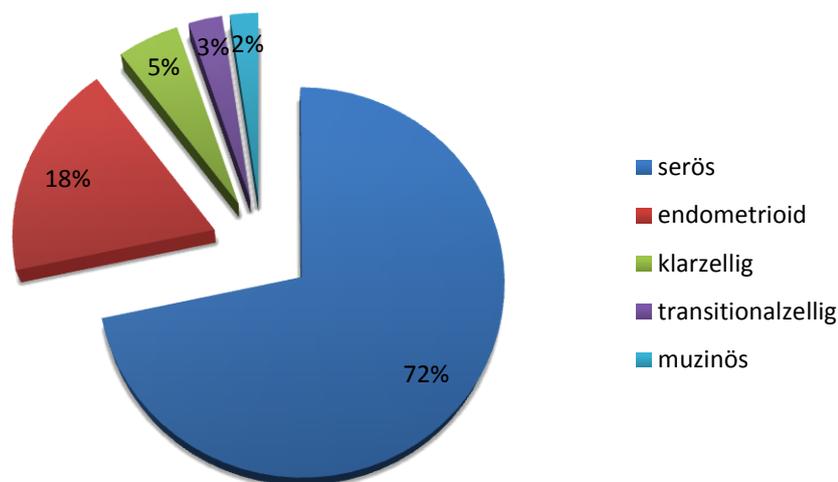


Abbildung 1: Verteilung der histologischen Typen im Gesamtkollektiv

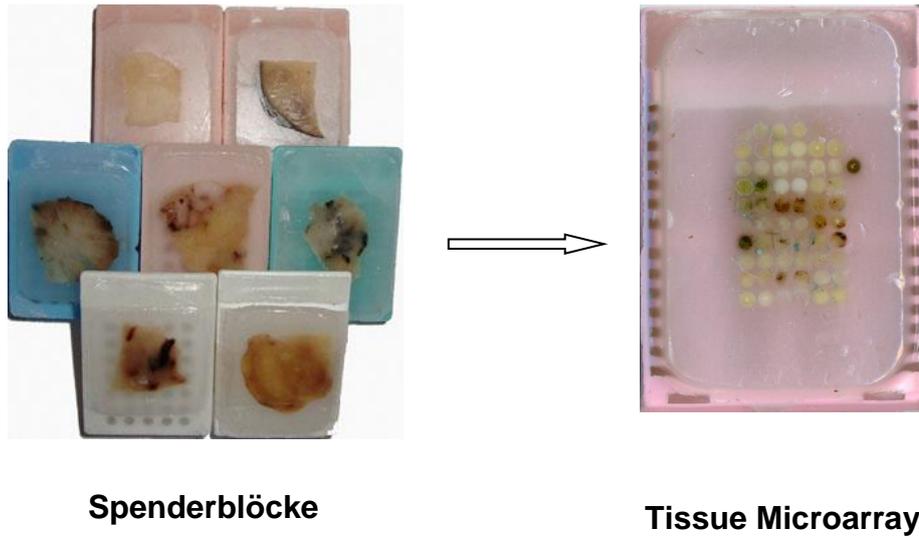
Erstellung des Gewebe-Mikroarrays (TMA)

Von den Blöcken mit in Paraffin eingebettetem Gewebe der Ovarialkarzinome, wurden Schnitte mit einer Dicke von 4 μm angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden sie mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Danach wurden die Schnitte erneut durchgesehen. Dabei wurden Tumoreareale markiert, in denen mindestens 70% der Zellen Tumorzellen waren. Bei der Durchsicht der Schnitte wurden außerdem Bereiche markiert, in denen sich normales Ovar- und Tubengewebe fand. Die entsprechenden Gewebeproben dieser Bereiche sollten später als Kontrollen dienen.

Aus den entsprechenden Bereichen der zugehörigen Paraffintumorblöcke wurden mit einem halbautomatischen Gewebearray Instrument (Beecher Instruments Sun Prairie, WI, USA) Gewebstanzen mit einem Durchmesser von 0,6 mm entnommen. Diese wurden anschließend in Paraffinempfängerblöcke eingefügt.

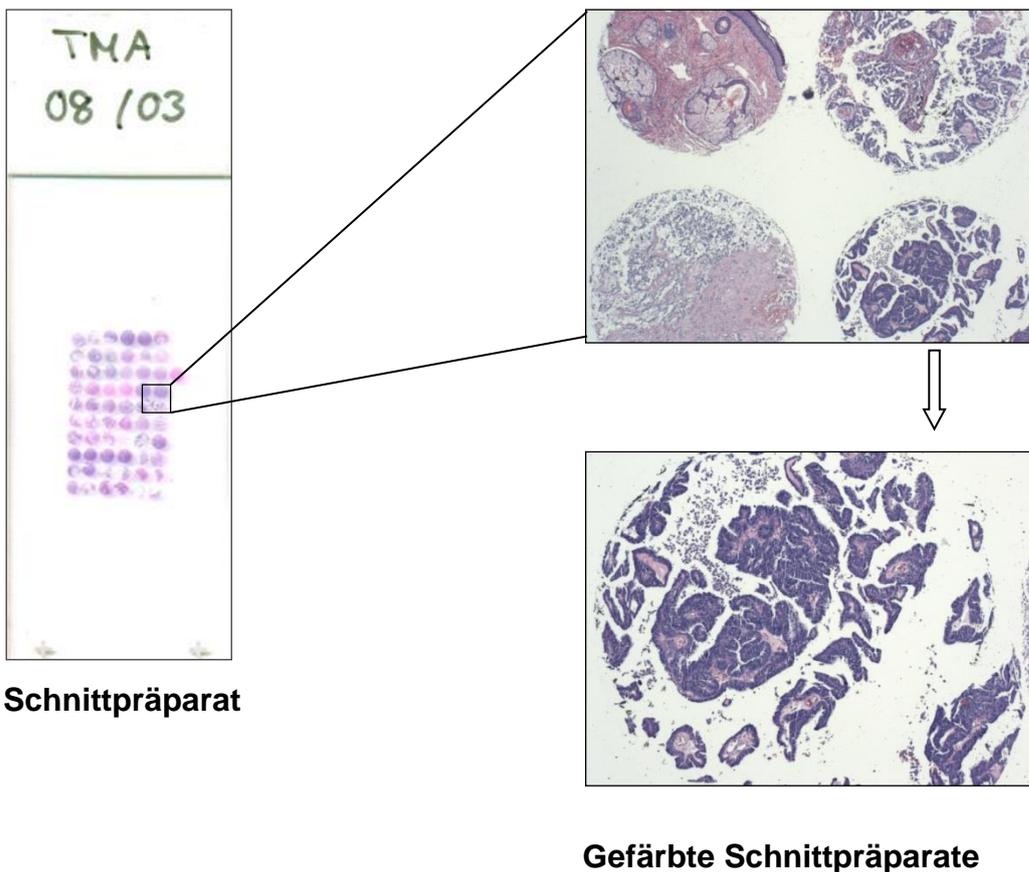
Für jeden Fall wurden mindestens drei repräsentative Tumorproben aus den Paraffinblöcken entnommen. Von Fällen mit bilateralem Karzinom oder mehr als zwei Tumorblöcken bei einseitigen Tumoren wurden je drei Stanzen aus

zwei Paraffinblöcken entnommen, sodass diese mit insgesamt sechs Proben auf dem Array vertreten sind. Schließlich wurden von diesen neu entstandenen Empfängerblöcken 4 μm dicke Schnitte gemacht, welche dann auf superfrost-Objektträger aufgezogen wurden (Abbildung 2).



Spenderblöcke

Tissue Microarray



Schnittpräparat

Gefärbte Schnittpräparate

Abbildung 2: Der Weg vom Paraffinblock über den Gewebe Microarray bis zum histologischen Schnitt [63]. Oben: Gewebestanden, die aus den Spenderblöcken entnommen wurden, werden in den Empfängerblock eingebracht und so zu einem Gewebe Microarray zusammengefasst. Unten: Die vom Empfängerblock angefertigten Schnittpräparate machen anschließend die gleichzeitige Beurteilung einer großen Anzahl an Tumoren möglich.

Immunhistochemie

2.1.1 Allgemeine Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung beruht auf einer Antikörper-Antigenreaktion eines spezifischen Antikörpers gegen das Protein, welches dargestellt werden soll (Abbildung 3). Dabei wurde für diese Arbeit die LAB (engl.: labeled avidin-biotin) Technik angewandt [64]: Im ersten Schritt der Färbung wird ein Primärantikörper mit hoher Affinität und Spezifität an das gesuchte Antigen gekoppelt. Anschließend erfolgt die Bindung eines biotinylierten Sekundärantikörpers. Gibt man im weiteren Verlauf mit dem Enzym Peroxidase markiertes Avidin dazu, bindet dieses aufgrund der hohen chemischen Affinität an das Biotin am Sekundärantikörper. Durch die Zugabe eines Wasserstoffperoxid-Chromogen-Komplexes und die Spaltung des Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch die Peroxidase zu H_2O+O_2 wird das Chromogen oxidiert und lagert sich als brauner Farbstoff an den gesamten Komplex an, sodass die Existenz des gesuchten Antigens letztendlich sichtbar wird [64]. Für diese Arbeit wurde der Farbstoff Diaminobenzidin als Chromogen verwendet.

Die Färbungen wurden mit dem vollautomatischen Immunfärbungssystem Ventana Discovery durchgeführt. Die Reagenzien waren von selbiger Firma (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA).

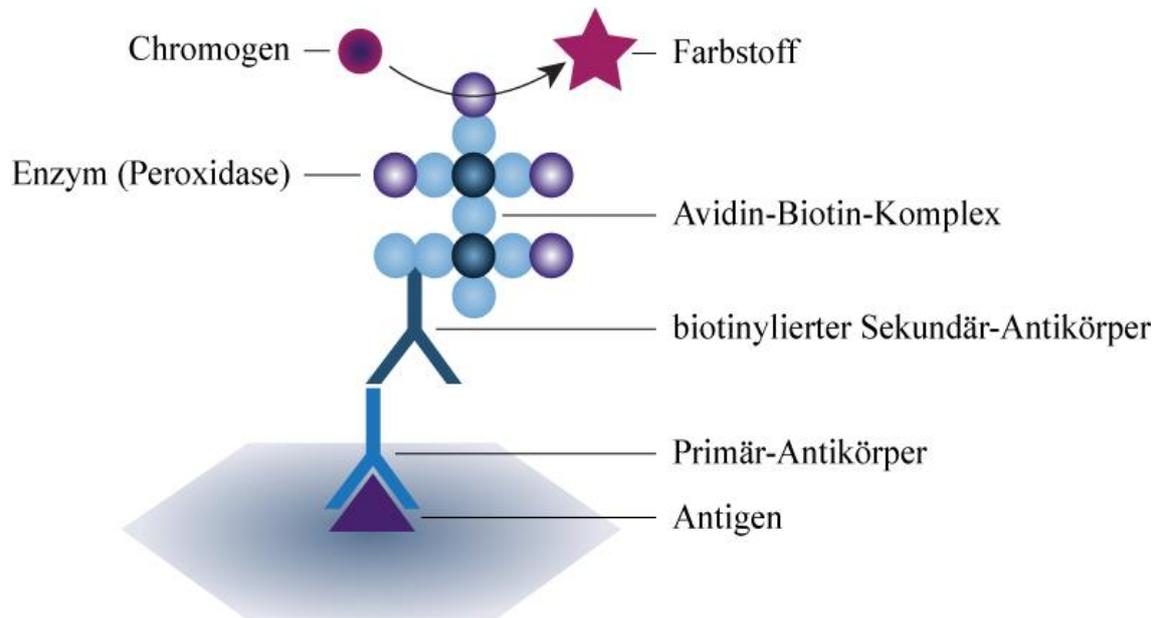


Abbildung 3: Prinzip der Immunhistochemie (frei nach Guesdon et al. [64]): Der Primärantikörper koppelt an das gesuchte Antigen. Anschließend erfolgt die Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers. Mit Peroxidase markiertes Avidin bindet an das Biotin. Ein zugegebener H_2O_2 -Chromogen-Komplex wird durch die Peroxidase gespalten und das Chromogen oxidiert. Dieses lagert sich als brauner Farbstoff an den gesamten Komplex an, sodass das gesuchte Antigen sichtbar wird.

2.1.2 Immunhistochemische Färbung für SOX2

Zu allererst wurden die Schnitte, die von den Paraffinblöcken gemacht und auf superfrost-Objektträger aufgezogen wurden, mit einem anorganischen Puffer entparaffinisiert. Die Vorbehandlung wurde mittels eines EDTA-basierten Puffers mit pH 8,4 durchgeführt. Da die Zielantigene durch die Fixierung im Paraffin durch Proteinstrukturen verlegt und so für den Primärantikörper maskiert sein können, wurde zu Anfang eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) durchgeführt. Auf diese Weise wird das Antigen freigelegt, sodass der Primärantikörper daran binden kann.

Beim anschließend applizierten Antikörper handelte es sich um einen polyklonalen anti-humanen SOX2 Antikörper (AF 2018), der aus Ziegen Serum gewonnen wird (Fa. R&D Systems, Verdünnung 1:40 in Ventana Verdünnungspuffer). Zur Detektion des Antigen-Antikörper Komplexes kam ein anti-Ziegen Sekundärantikörper zum Einsatz, welcher mit Diaminobenzidin markiert ist und durch

eine Reaktion mit Meerrettich Peroxidase sichtbar gemacht wird (DABMap Kit Ventana). Um das umliegende, nicht markierte Gewebe sichtbar zu machen, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Bluing Reagent gegengefärbt und gewaschen. Die anschließende Dehydrierung erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (40%, 70%, 90%). Abschließend wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Cytoseal abgedeckt.

2.1.3 Auswertung der Immunhistochemie

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen wurden mithilfe eines semiquantitativen Punktesystems ausgewertet, welches die relative Anzahl an angefärbten Zellkernen bewertet. War kein einziger Kern angefärbt, der Fall also komplett negativ war, wurde die Punktzahl 0 vergeben. Waren 0-10% der Kerne positiv, bekam der Fall die Punktzahl 1. Bei einem Prozentsatz von 10-50% positiver Kerne wurde die Punktzahl 2 und bei >50% positiver Kerne die Punktzahl 3 vergeben.

Score	% SOX2 positive Zellen
Score 0	0 (negativ)
Score 1	>0 und <10
Score 2	≥10 und <50
Score 3	≥50

Tabelle 3: Punktesystem zur Bewertung der immunhistochemischen Färbung für SOX2 Protein.

Zur Auswertung wurden alle Fälle herangezogen, von denen nach immunhistochemischer Färbung mindestens eine Gewebsstanze beurteilbar war. Die Beurteilung wurde von zwei Personen unabhängig voneinander durchgeführt (A.S., D.P.), wobei eine dieser Personen eine erfahrene Gynäkopathologin war. Die-

ses Punktesystem gilt als etabliert und wurde bereits ausführlich beschrieben [65].

Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

2.1.4 FISH allgemein

Die FISH Methode wurde erstmals 1969 beschrieben [66]. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, mit dem man auf chromosomaler Ebene bestimmte Nukleinsäuresequenzen im Erbmaterial nachweisen kann. Man macht sich die Eigenschaften der DNA zunutze, welche bei normalen Bedingungen in hybridisierter Doppelstrang-Formation vorliegt, jedoch bei hohen Temperaturen zu zwei Einzelsträngen denaturiert. Diese Stränge lassen sich bei Absenken unter den Schmelzpunkt erneut hybridisieren. Dann kann man neue Sonden in die Reaktion einbringen, welche die zur gesuchten Nukleinsäuresequenz homologe Basenabfolge besitzen.

Bei der direkten FISH sind diese Sonden wiederum mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert und können direkt im Anschluss an den Hybridisierungsvorgang mit einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden.

Die indirekte FISH führt über Stoffe wie Biotin oder Digoxigenin. Diese sind an die Sonde gekoppelt und werden erst nach Hybridisierung über an Antikörper gebundene Fluoreszenz-Farbstoffe sichtbar gemacht.

Um Deletionen, Translokationen oder Amplifikationen von speziellen Bereichen in der DNA aufzuspüren, werden sogenannte lokusspezifische Sonden eingesetzt, die die Sequenz eines bestimmten Gens oder eines Genabschnitts enthalten und im Hybridisierungsschritt an diese binden.

2.1.5 FISH für SOX2

Für die Beurteilung des SOX2 Amplifikationsstatus auf chromosomaler Ebene wurde eine zwei-Farben-Interphase-FISH durchgeführt, wie schon zuvor von Bass et al. [39] beschrieben.

Die Zielsonde, welche mit der DNA am Locus 3q26.33 (zugrundeliegender BAC clone CTD-2348H10) hybridisiert, wurde hinzugefügt um die Anzahl an SOX2 Kopien zu erfassen. Verglichen wurde mit einer Referenzsonde, die den Bereich um die Region 3p22.3 - 3p22.2 (zugrundeliegender BAC clone RP11-286G5) abdeckt. Beide Sonden stammen von der Firma Life Technologies (Life Technologies, Grand Island, NY, USA; ehemals Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Bei einer Temperatur von 73°C wurden die Sonden für 5 Minuten denaturiert. Die Schnitte vom Gewebe Microarray und die BAC Sonden wurden für 3 Minuten bei 94°C kodenaturiert. Über Nacht fand bei 37°C die Hybridisierung statt. Die folgende Waschung erfolgte 5 Minuten lang mit 2xSSC Puffer.

Die Zielsonde wurde mit Biotin markiert, welches später mithilfe eines Streptavidin-konjugierten roten Fluorochroms (SAV-ALEXA Fluor-594, Life Technologies) detektiert wurde. Die Referenzsonde wurde mit Digoxigenin gekennzeichnet, welches in der Folge via eines anti-Digoxigenin-konjugierten grünen Fluorochroms (FITC, Roche, Basel, Schweiz) aufgespürt wurde. Demzufolge entsprechen die roten Signale der SOX2 Zielregion, die grünen der Referenzregion.

Im Folgenden das detaillierte FISH Protokoll:

1. Tag

Vorbehandlung

Entparaffinierung

1. „Aging“ bei 60°C für 1 Stunde
2. 3 x Xylene 10 min

3. 100% EtOH 2x2 min
4. Lufttrocknung

Freilegen der Zellkerne

5. Tränken der Schnitte in 100mM Tris/ 50mM EDTA pH 7.0
 - 15 min Inkubieren bei 92.8°C (im Wasserbad)
6. Spülen mit PBS (phosphate buffered saline)
7. Pepsinverdau mit 300 µl Digest All III, Pepsin 1:2
 - 14 min bei 37°C
8. Spülen mit PBS
9. Dehydrierung in EtOH 70%, 85%, 95%, 100%
 - Jeweils 2 min bei Raumtemperatur
10. Lufttrocknen

Sondenvorbereitung

1. 45,5µl HB (Hybridisierungspuffer)
 - + 15µl of Cot-1 (Human Cot-1)
 - + 22,5µl von Bio-Sonde (Biotin markiert)
 - + 15 µl von Dig-Sonde (Digoxigenin markiert)
 - Denaturierung für 5 min bei 73°C

Hybridisierung

1. Zugeben von 25µl Sondenlösung für 21 x 26mm Deckglas Größe
2. Versiegelung mit Gummi Zement Ecken (Fixogum) um Gewe-
beaustrocknung zu vermeiden
3. Einbringen in ThermoBrite
4. Denaturierung für 3 min bei 94°C
5. Hybridisierung über Nacht bei 37°C

2. Tag

Post-Hybridisierungs-Waschung

1. Tränken der Schnitte in 2x SSC für einige Minuten bei Raum-
temperatur
2. Ablösen der Deckgläser

3. Inkubation für 6 min bei 75°C

Detektion

1. Tränken der Schnitte in 0.5x SSC für 3 x 2min
2. CAS-Block (enthält 10% normales Ziegen Serum) bei RT für 10min
3. FITC-anti-Dig/594 SAV 1:400 Verdünnung in CAS Block bei 1h
4. Tränken der Schnitte in 0.5x SSC bei RT für 3 x 2min

DAPI Markierung

1. Kerngegenfärbung und Eindeckung der Präparate mit Eindeckmedium DAPI bei Raumtemperatur

2.1.6 Auswertung der FISH

Der SOX2 Amplifikationsstatus wurde auf semiquantitative Weise beurteilt. Dabei wurde die Anzahl der roten Signale (= SOX2 Zielregion) mit der Anzahl der grünen Signale (= Referenzregion) verglichen. In normalen Kernen, deren Chromosome keine Amplifikation aufweisen, kann für jedes rote Signal ein entsprechendes grünes Signal gefunden werden, d.h. in einem Verhältnis von 1:1.

Fälle, in denen 30% der Gewebeproben eine Anzahl von roten Signalen aufwiesen, die die Anzahl an grünen Signalen um das 2-9 fache überstieg, wurden als positive Amplifikation beurteilt (vgl. Abbildungen 8 und 9 im Ergebnisteil).

Diese Analyse wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Zeiss, Jena, Deutschland) unter einem 63-fachen Ölimmersionsobjektiv durchgeführt. Das Mikroskop ist mit passenden Filtern, einer Digitalkamera und der FISH Bildgebungs- und Erfassungsoftware Metafer 4 (Metasystems, Altusheim, Deutschland) ausgestattet.

Pro Fall wurden mindestens 100 Kerne beurteilt um den Amplifikationsstatus anschließend von einem erfahrenen Untersucher (V.S.) ermitteln lassen zu können. Da über den Amplifikationsstatus der serösen Ovarialkarzinome bereits richtungsweisende Ergebnisse aus vorhergehenden Untersuchungen vorliegen,

und diese mit 154 Fällen die größte homogene Gruppe des Kollektivs darstellt, wurden ausschließlich diese Fälle in der FISH auf ihren Amplifikationsstatus hin untersucht [36]. Unter diesen 154 serösen Karzinomen fanden sich 15 Fälle, die nicht beurteilt werden konnten. Gründe hierfür waren insuffiziente Hybridisierung beim Färbungsvorgang oder ein Mangel an Zielgewebe.

Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen und FISH Untersuchung in Untergruppen analysiert und mit den klinischen Daten, den histologischen Subtypen und dem Grad verglichen.

Je nach Eignung wurden der Chi-Quadrat- oder der exakte Fisher-Test angewandt. Mithilfe der Kaplan-Meier-Methode wurden Kurven für das Gesamtüberleben erstellt und mittels des Log-Rank-Tests verglichen.

Für alle Tests galt ein statistisches Signifikanzniveau von 5%. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der SPSS Software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Das Studienvorhaben wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen bewilligt (ref. 307/2006).

3 Ergebnisse

SOX2 Expressionsstatus im Kollektiv

Die Untersuchungen ergaben, dass die Mehrheit der im Kollektiv befindlichen Ovarialkarzinome eine positive nukleäre Färbung für SOX2 aufweist.

Insgesamt konnten wir in 130 von 215 Fällen (60.5%) auf dem Gewebearray mindestens eine Tumorzelle nachweisen, die eine positive nukleäre Färbung für SOX2 zeigt. Es konnten alle Fälle beurteilt werden. Die folgende Tabelle (Tabelle 4) zeigt die Verteilung der immunhistochemischen Scores innerhalb der histologischen Typen.

Histologischer Subtyp	Gesamt	SOX2 negativ		SOX2 positiv		Score 1		Score 2		Score 3	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Serös	154	57	(37.0)	97	(63.0)	60	(39.0)	16	(10.4)	21	(13.6)
Endometrioid	39	16	(41.0)	23	(59.0)	13	(33.3)	5	(12.8)	5	(12.8)
Klarzellig	11	6	(54.5)	5	(45.5)	1	(9.1)	2	(18.2)	2	(18.2)
Muzinös	5	4	(80.0)	1	(20.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(20.0)
Transitionalzellig	6	2	(33.3)	4	(66.7)	4	(66.7)	0	(0.0)	0	(0.0)
Gesamt	215	85		130		78		23		29	

Tabelle 4: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung auf SOX2

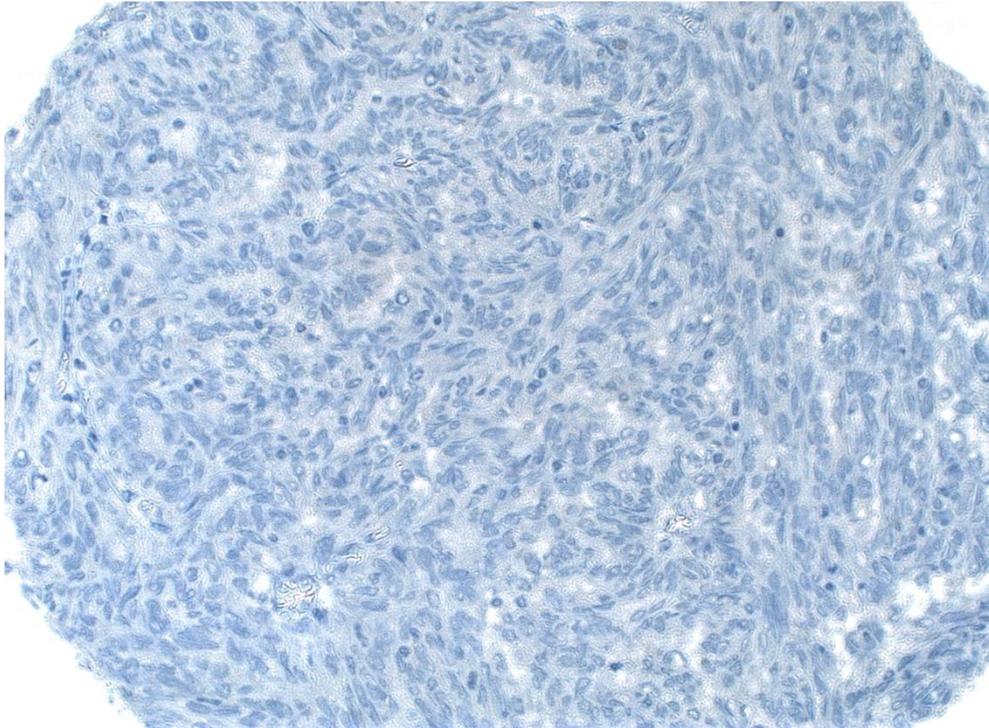


Abbildung 4A-D: Immunhistochemische Färbung auf SOX2 Expression an serösen high-grade Ovarialkarzinomen (200-fache Vergrößerung). **Abbildung 4A:** SOX2 Expressionscore 0 in diesem Tumor; keine nukleäre SOX2 Expression.

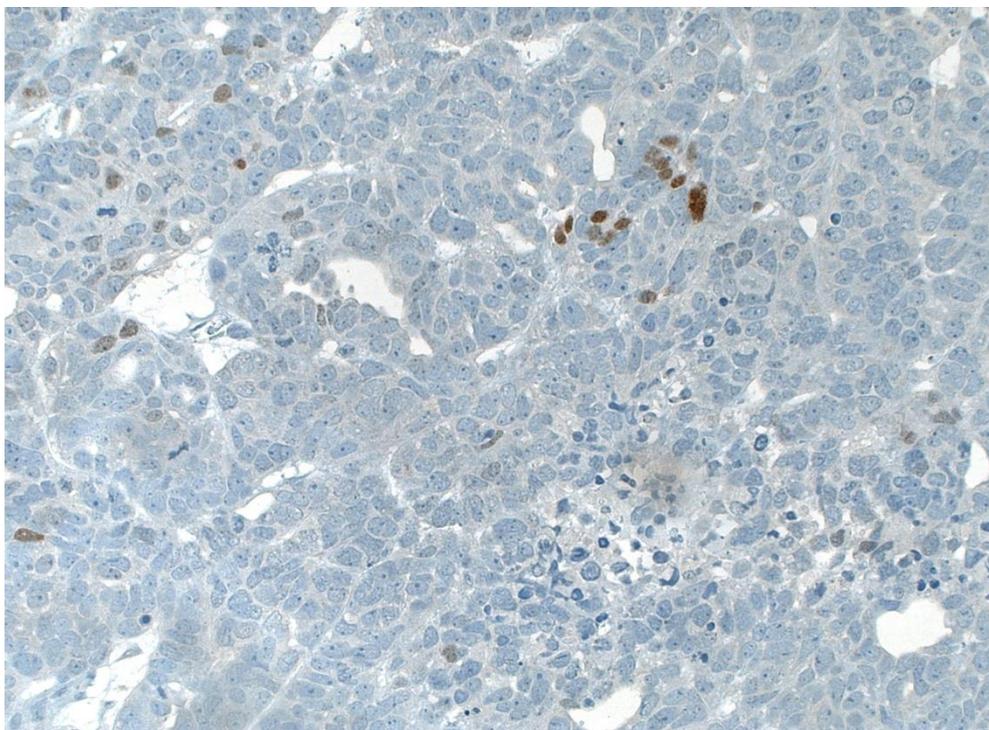


Abbildung 4B: Score 1: Weniger als 10% der Tumorzellen zeigen eine mäßige bis starke nukleäre Anfärbung für SOX2.

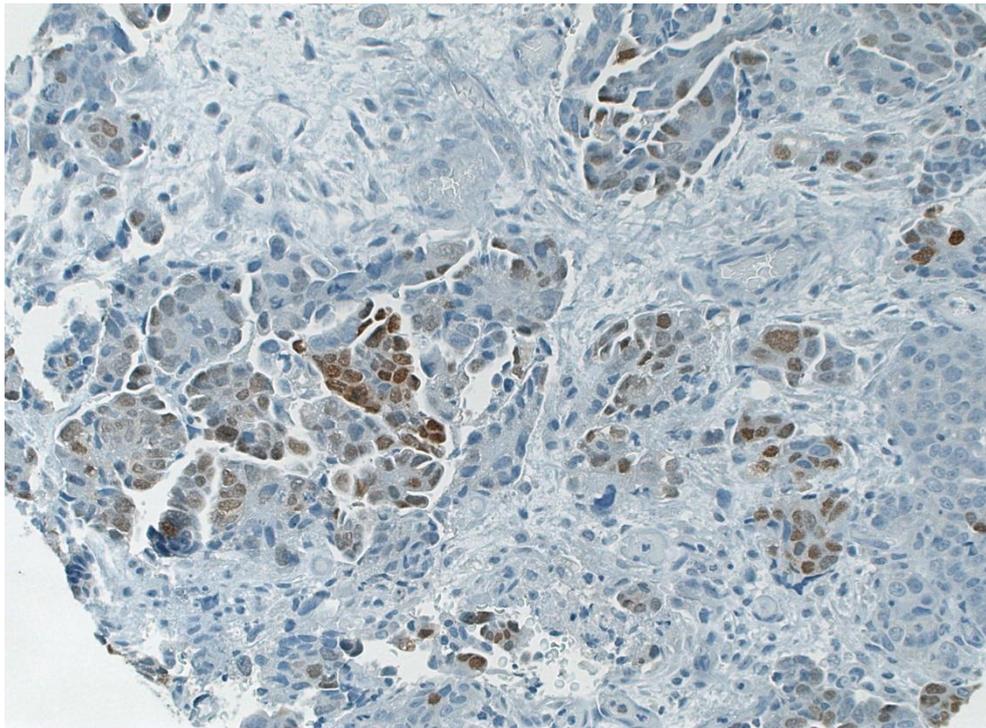


Abbildung 4C: Score 2: 10%-50% der Tumorzellen zeigen eine mäßige bis starke nukleäre Anfärbung für SOX2.

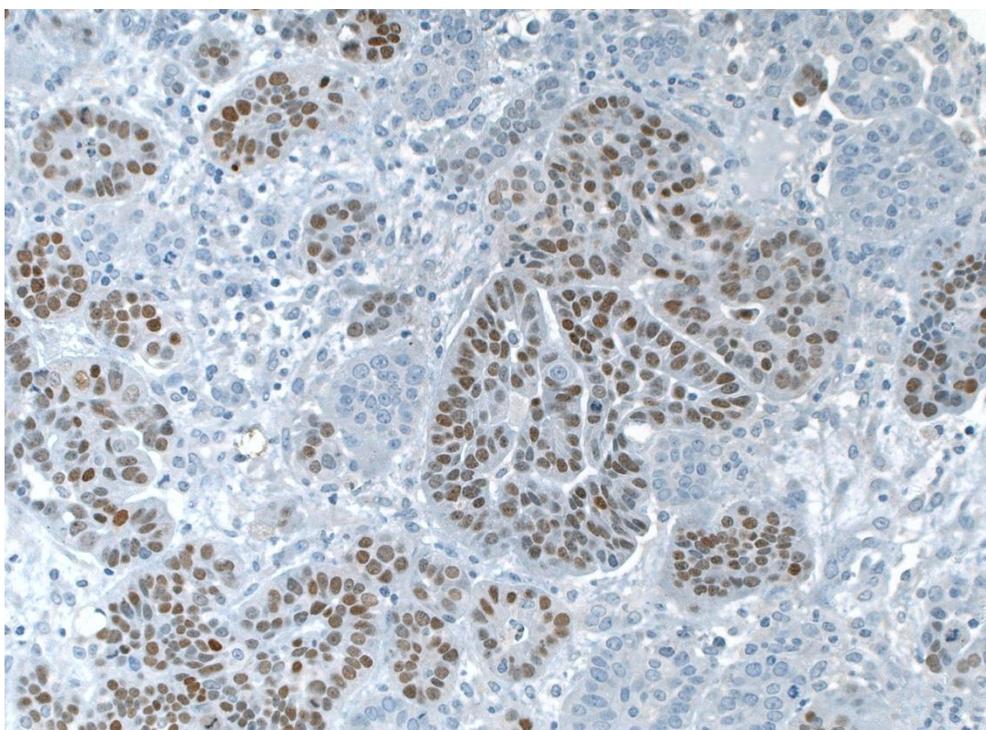


Abbildung 4D: Score 3: Die Mehrheit der Tumorzellen, d.h. >50% zeigen eine mäßige bis starke nukleäre Färbung für SOX2.

3.1.1 SOX2 und histologischer Typ

Zwischen den verschiedenen histologischen Typen ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der SOX2 Expression. So lassen sich bei den serösen Karzinomen in 64,4%, bei den endometrioiden in 59% und bei den klarzelligen in 45,5% der Fälle SOX2 positive Tumorzellen nachweisen. Bei den seltenen histologischen Typen zeigt sich bei den muzinösen Tumoren einer von fünf Fällen positiv (20%), bei den transitionalzelligen sind es vier von sechs (66.7%) (Abbildung 5, Tabelle 4).

Der p-Wert von 0.236 im Chi-Quadrat-Test zeigt, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen histologischem Typ und der SOX2 Proteinexpression besteht.

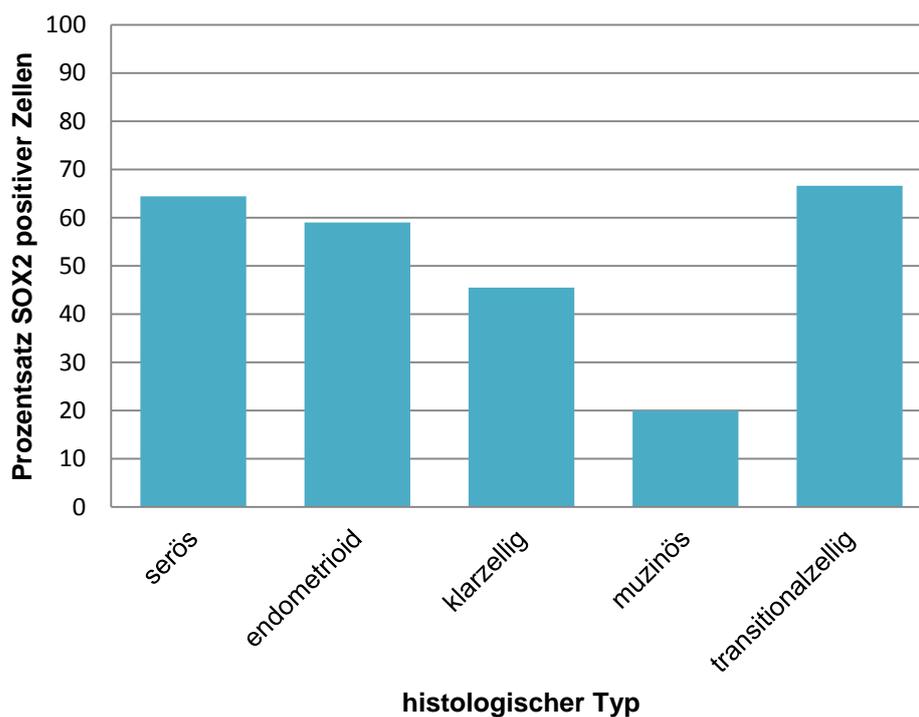


Abbildung 5: Prozentsatz der immunhistochemisch SOX2 positiven Tumoren jeder histologischen Gruppe. Dabei ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen histologischen Typen ($p=0.236$ im Chi-Quadrat-Test).

3.1.2 SOX2 und Tumorstadium

Bei der Betrachtung von SOX2 und FIGO Tumorstadium ergab sich, dass ein positiver Zusammenhang zwischen SOX2 Expression und fortgeschrittenem Tumorstadium besteht.

Im FIGO Stadium I waren 41,4% der Fälle positiv. Bei den Stadien II-IV waren es 60,6%. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,023$).

Somit besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen fortschreitendem Tumorstadium und zunehmender SOX2 Expression (Abbildung 6, Tabelle 5).

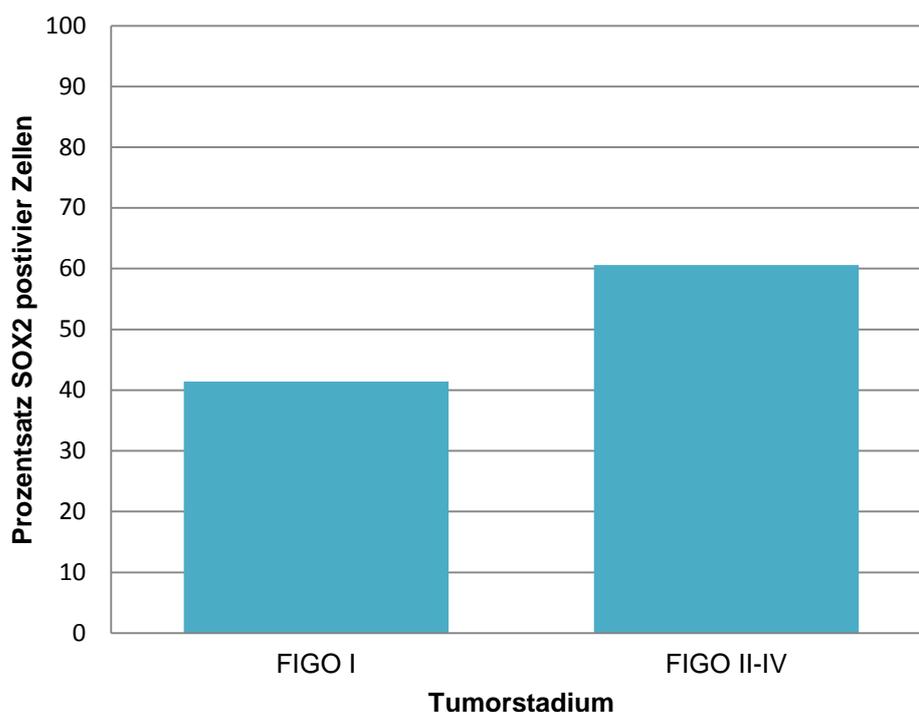


Abbildung 6: Prozentsatz immunhistochemisch SOX2 positiver Tumoren niedriger (FIGO I) und hoher (FIGO II-IV) Tumorstadien. Dabei ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen niedrigen und fortgeschrittenen FIGO Stadien.

3.1.3 SOX2 und Tumorgrad

Auffallend ist, dass die SOX2 Expression positiv mit dem Tumorgrad korreliert. D.h. die SOX2 Expression ist in weniger differenzierten Tumoren häufiger.

Insgesamt sind 41,2% der Fälle mit Differenzierungsgrad Grad 1 positiv für SOX2, bei Grad 3 sind es schon 68,2%. Dieser Unterschied war im Chi-Quadrat-Test statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,001 (Abbildung 7, Tabelle 6).

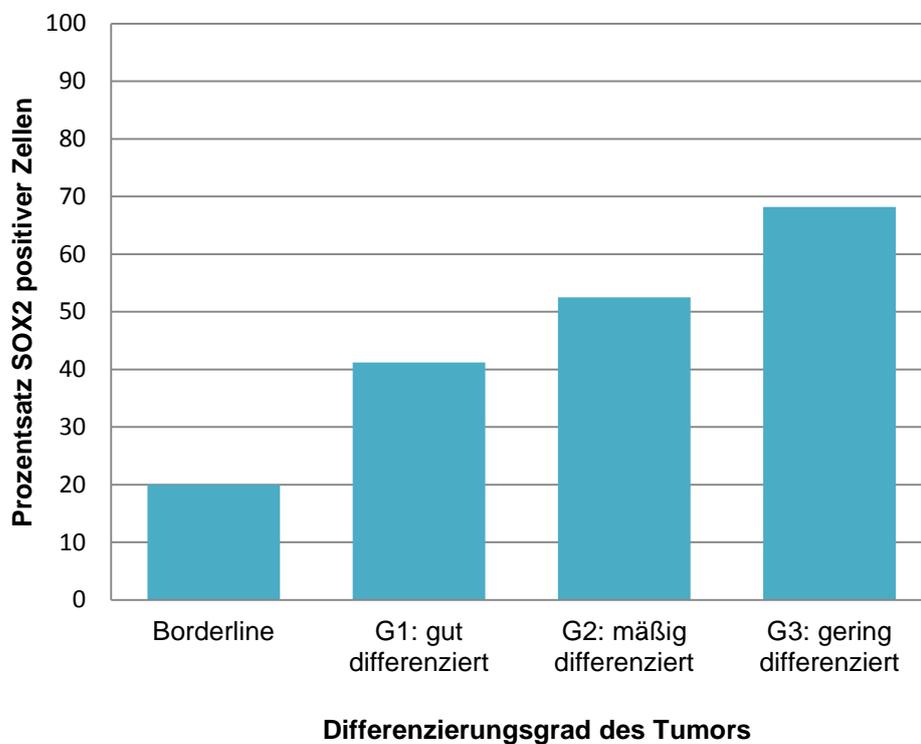


Abbildung 7: Prozentsatz immunhistochemisch SOX2 positiver Tumoren der verschiedenen Differenzierungsgrade. Je geringer der Differenzierungsgrad eines Tumors ist, desto höher ist der Anteil an SOX2 positiven Tumorzellen. Dieser Zusammenhang ist im Chi-Quadrat-Test signifikant mit einem p-Wert von 0.001.

Klinisch-pathologische Parameter	SOX2 negativ		SOX2 positiv (>0%)		p-Wert
	N	%	N	%	
Tumorstadium					
I	17	(58.6)	12	(41.4)	0.023
II-IV	63	(35.2)	116	(64.8)	
Histologischer Subtyp					
Serös	53	(35.6)	96	(64.4)	n.s.
Endometrioid	16	(41)	23	(59)	
Klarzellig	6	(54.5)	5	(45.5)	
Muzinös	4	(80)	1	(20)	
Transitionalzellig	2	(33.3)	4	(66.7)	
Tumorgrad					
BL	4	(80)	1	(20)	0.001
G1	10	(58.8)	7	(41.2)	
G2	29	(47.5)	32	(52.5)	
G3	42	(31.8)	90	(68.2)	

Tabelle 5: SOX2 in Ovarialkarzinomen des Kollektivs, aufgeschlüsselt nach Tumorstadium, histologischen Subtypen und Tumorgrad; N = Anzahl, n.s. = nicht signifikant, BL=Borderline

SOX2 Amplifikationsstatus der serösen Karzinome

Mittels FISH Untersuchung wurde die größte Gruppe des Kollektivs, die serösen high-grade Ovarialkarzinome auf Genamplifikationen untersucht. Die Zielregion der Untersuchung war der Locus um 3q26.33. In dieser Region liegt das Gen, das für das SOX2 Protein kodiert.

Für insgesamt 146 von 167 Fällen (87,4%) auf dem Gewebearray ergaben sich beurteilbare Ergebnisse. Insgesamt zeigten 21,2%, d.h. 31 von 146 Fällen eine Amplifikation für SOX2. Obwohl es keinen Unterschied zwischen den Tumoren mit hoher oder niedriger SOX2 Proteinexpression gab, war ein Trend hin zu

einer häufigeren Amplifikation bei Tumoren mit hoher SOX2 Proteinexpression zu erkennen. So wiesen 23,7% der Fälle mit immunhistochemischem Score 1 und 2 (Proteinexpressionsstärke zwischen 0 und 50%) eine Amplifikation auf. Bei Score 3 (Proteinexpressionsstärke >50%) waren es schon 33,3%.

Letztendlich wies auch eine kleine Anzahl von 9% der immunhistochemisch SOX2 negativen Tumoren eine SOX2 Amplifikation auf. Außerdem gab es auch viele Tumoren mit einer hohen SOX2 Expression, mit keinerlei Hinweis auf eine Genamplifikation (Tabelle 6, Abbildung 8)

	SOX2 negativ		SOX2 positiv (Score 1-2)		SOX2 positiv (Score 3)		Gesamt	
	N	%	N	%	N	%	N	%
FISH								
Negativ	44	(83)	71	(76.3)	14	(66.7)	115	(78.8)
Positiv	9	(17)	22	(23.7)*	7	(33.3)*	31	(21.2)
Total	53	(100)	93	(100)	21	(100)	146	(100)

Tabelle 6: SOX2 Amplifikationsstatus der serösen high-grade Ovarialkarzinome - aufgeschlüsselt nach SOX2 Expression Score 0, Score 1-2 und Score 3 (*p-Wert = nicht signifikant im Chi-Quadrat-Test).

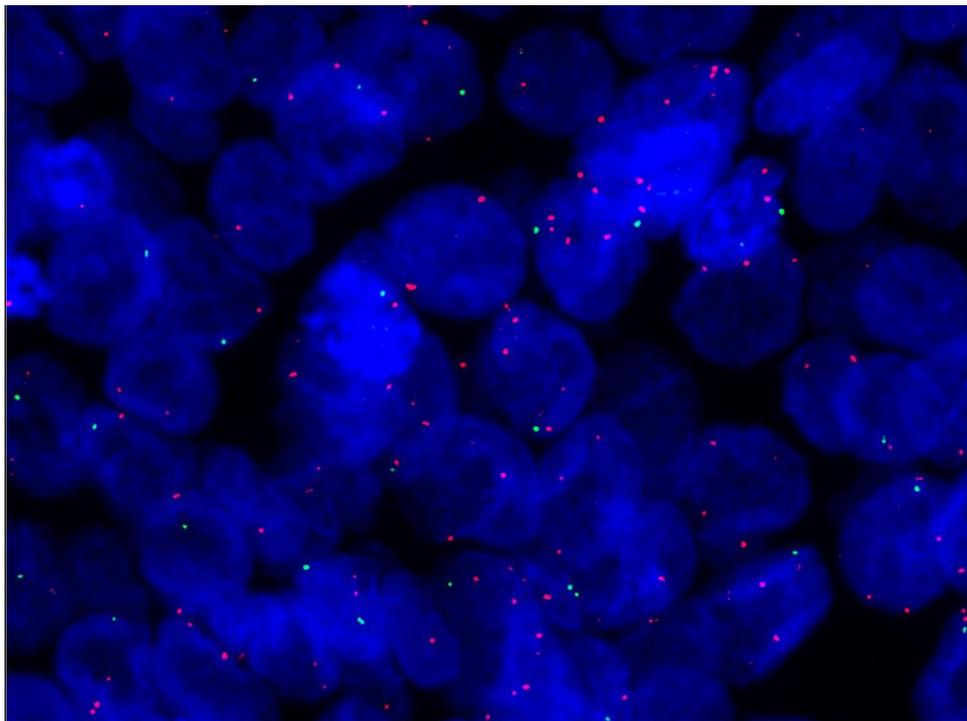
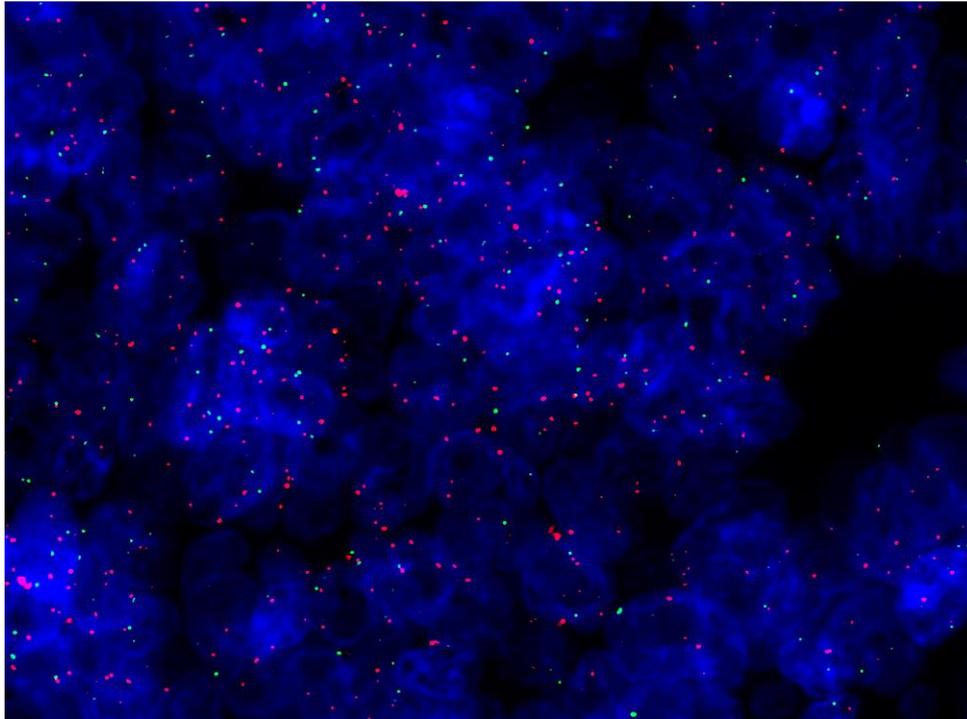


Abbildung 8 oben und unten: Mit der FISH Methode gefärbte Schnittpräparate unter dem Fluoreszenz Mikroskop. Die grünen Signale bilden die Bindung der Referenzsonde an den Bereich um 3p22.3 - 3p22.2 ab. Die roten Signale stellen die Bindung der SOX2 Sonde an die Zielregion 3q26.33, den Genlokus von SOX2 dar.

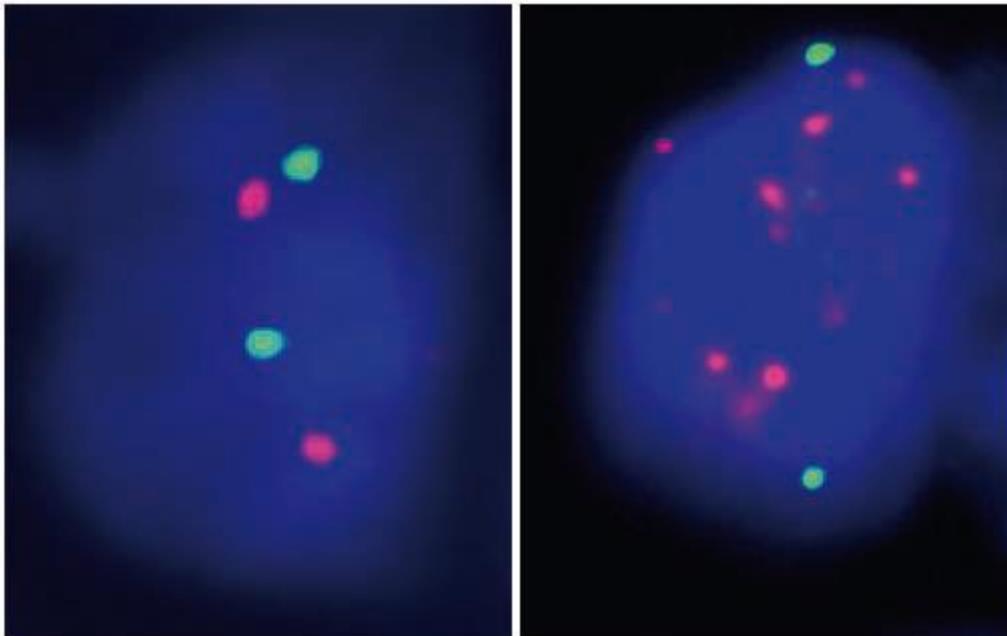


Abbildung 9: SOX2 Amplifikationsstatus von serösen high-grade Ovarialkarzinomen untersucht mit FISH. **Links:** Tumorzellen mit normalem SOX2 Status ohne Amplifikation. Verhältnis roter zu grüner Signale 1:1 **Rechts:** Low-level Amplifikation mit einem Verhältnis roter zu grüner Signale von $>2:1$.

Wenn man diese Ergebnisse zum Amplifikationsstatus der serösen high-grade Karzinome betrachtet, kann man sagen, dass eine SOX2 Genamplifikation keineswegs eine notwendige Voraussetzung für die Proteinexpression ist. Da sowohl Tumoren SOX2 exprimieren, die keine Amplifikation von 3q26.33 aufweisen, als auch andersherum Tumoren existieren, die zwar eine Amplifikation, jedoch keine Expression zeigen.

Somit müssen neben chromosomalen Alterationen dieses Bereiches auch andere Mechanismen dazu führen, dass das SOX2 Protein in Ovarialkarzinomzellen exprimiert wird.

SOX2 Expression und Überlebensdaten

Der Zusammenhang zwischen SOX2 Expression und Überleben wurde für die serösen high-grade Karzinome (Grad 2 und 3) in den fortgeschrittenen FIGO Stadien II-IV analysiert. Diese Gruppe stellte die größte homogene Untergruppe der Studie dar.

3.1.4 SOX2 positive seröse high-grade Karzinome haben eine signifikant bessere Prognose

Die Analyse ergab, dass Tumoren, die zur Gruppe der serösen high-grade Ovarialkarzinome gehören, mit SOX2 Expression eine signifikant bessere Prognose haben. Dieser Unterschied ergab sich auch für Tumoren mit dem geringsten Maß an SOX2 Expression, d.h. auch für Karzinome ab Score 1 und mehr, also insgesamt für eine Proteinexpression in >0% der Tumorzellen.

All diese Tumoren wiesen einen Trend zu einem längeren Gesamtüberleben auf. Im Median ergaben sich 39 vs. 25 Monate ($p = 0.062$).

Außerdem zeigten sie ein günstigeres krankheitsfreies Intervall, wobei sich für Letzteres ein signifikanter Unterschied mit 27 Monaten bei SOX2 Expression vs. 21 Monate ohne SOX2 Expression ergab ($p=0,041$) (Abbildungen 9A und B).

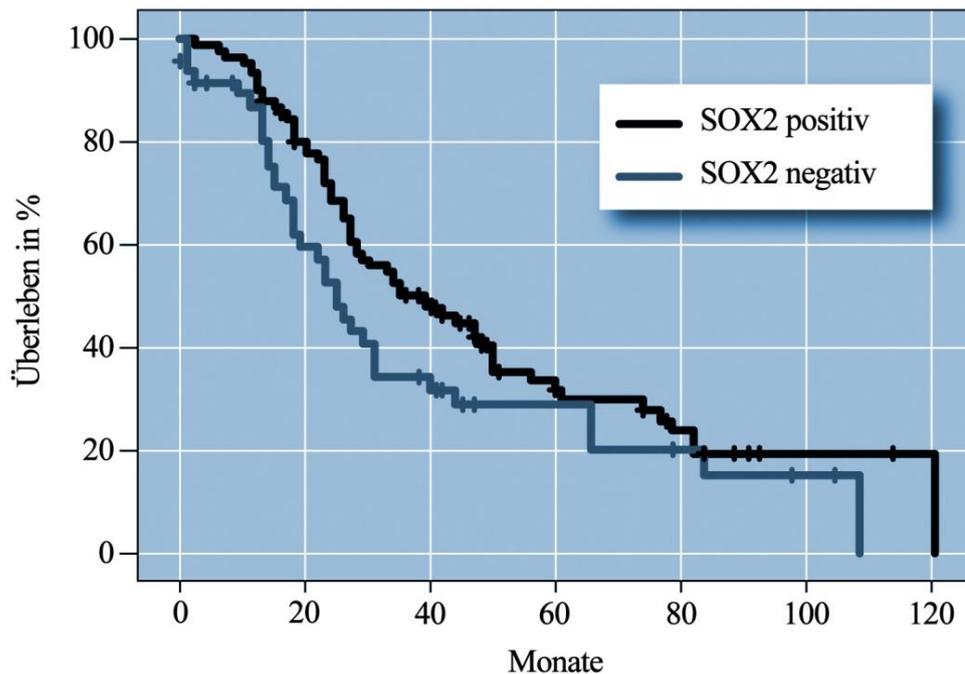


Abbildung 10A: Kaplan-Meier Kurve für die serösen high-grade Karzinome der fortgeschrittenen Stadien (FIGO II-IV) - Gesamtüberleben. Patienten mit SOX2 exprimierenden Tumoren zeigen einen Trend hin zu einem längeren Gesamtüberleben (Medianes Überleben 39 vs. 25 Monate; $p=0.062$).

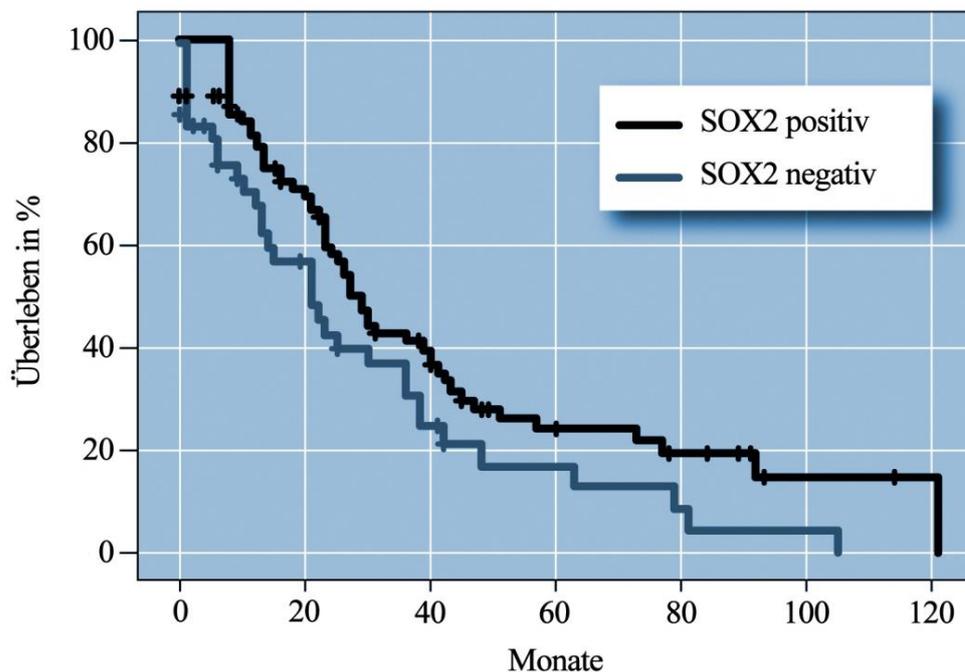


Abbildung 10B: Kaplan-Meier Kurve für die serösen high-grade Karzinome der fortgeschrittenen Stadien (FIGO II-IV) - rezidivfreies Überleben. Fälle mit SOX2 Expression (Score 1 und größer) zeigen ein signifikant längeres rezidivfreies Intervall. (Medianes Überleben 27 vs. 21 Monate; $p=0.041$).

SOX2 im Kontrollgewebe

Neben Tumorgewebe wurde auch Normalgewebe von nicht tumorbefallenen Tuben und Eierstöcken in den Array eingearbeitet, das nach der Färbung als Negativkontrolle ebenfalls auf SOX2 Expression untersucht wurde.

Wie erwartet, wies gesundes Eierstockgewebe keine Zellen mit positiver nukleärer SOX2 Färbung auf.

Anders war dies beim Tubengewebe. Bei der Beurteilung des gefärbten gesunden Tubengewebes fiel auf, dass 100% aller Tuben, die auf dem Array vertreten waren positiv für SOX2 angefärbt waren. Bei genauerer Betrachtung ergab sich weiterhin, dass nicht alle Zellen in den Tuben, sondern ausschließlich die zilienträgenden Zellen SOX2 exprimierten. Bei Vergleich mit dem Punktesystem, der für den restlichen Array bereits angewendet wurde, ergab sich zudem, dass all diesen Fällen der Score 3 zugeteilt werden konnte. Das Ovargewebe, welches sich, wie erwartet, nicht für SOX2 anfärben ließ, diente als Kontrollgewebe (Abbildung 10 und 11).

Dieser zufällige Nebenbefund wird im folgenden Diskussionsteil mit Hinblick auf die verschiedenen Entstehungstheorien des Ovarialkarzinoms genauer betrachtet.

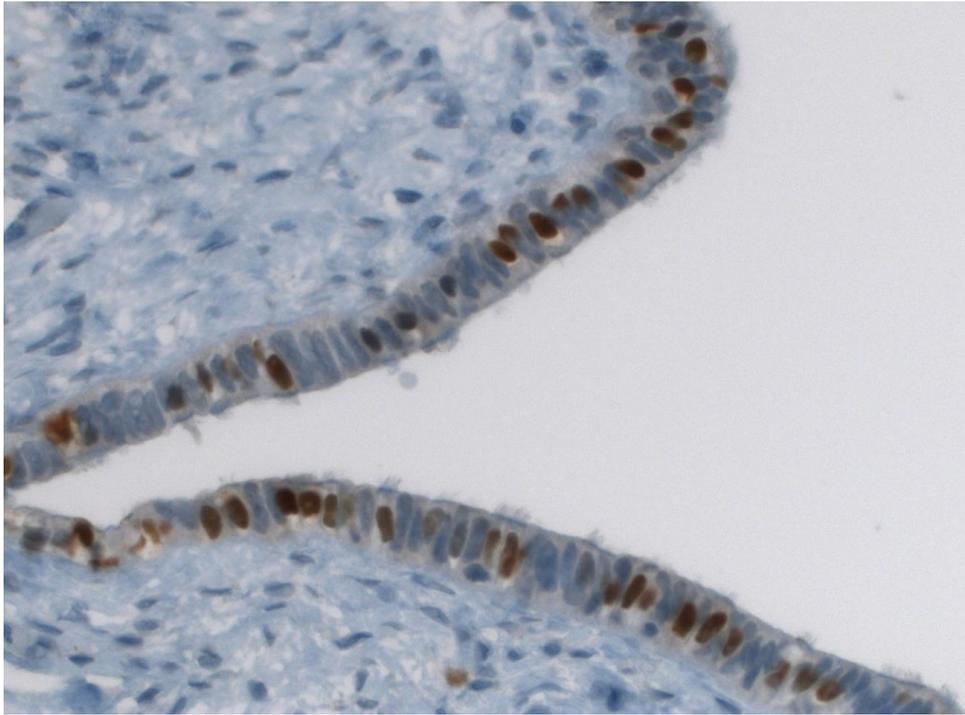


Abbildung 11: Tubenepithel, dessen zilienbesetzte Zellen positiv für SOX2 angefärbt sind. (200-fache Vergrößerung)

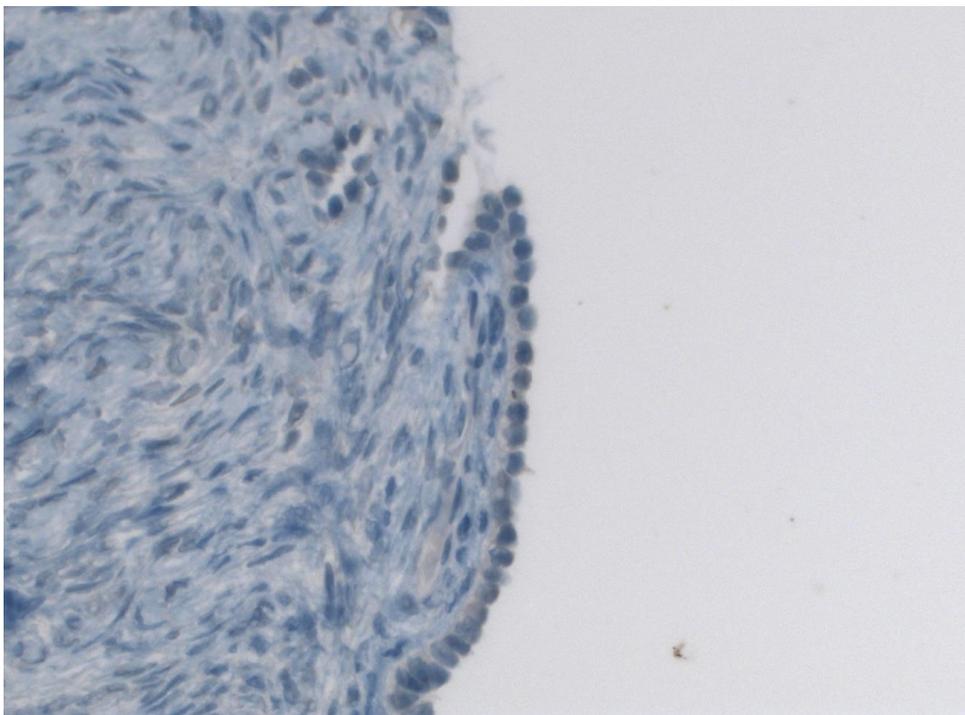


Abbildung 12: Kontrollgewebe des Ovars, welches in der SOX2 Färbung keine positive nukleäre Färbung aufweist. (200-fache Vergrößerung)

4 Diskussion

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass der embryonale Stammzellfaktor SOX2 in allen verschiedenen histologischen Typen der Ovarialkarzinome exprimiert wird. Wie zuvor schon erwähnt, besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem zunehmenden SOX2 Expressionsstatus und zunehmendem Tumorgrad, wenn man ein gemischtes Kollektiv verschiedener histologischer Typen, aber auch die Gruppe der serösen Karzinome an sich untersucht.

Bisher war wenig bekannt über die Rolle von SOX2 im Ovarialkarzinom. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es lediglich zwei Studien, die einen Zusammenhang zwischen SOX2 Expression und Differenzierungsgrad herstellen. Auch diese unterstützen das Ergebnis einer positiven Korrelation von SOX2 Expression und geringem Differenzierungsgrad der Karzinome [67, 68]. Nur eine dieser Studien untersuchte die Auswirkung auf den klinischen Verlauf und das Überleben und fand ebenfalls eine Korrelation mit einer schlechteren Prognose in einer Kohorte von Ovarialkarzinomen verschiedener histologischer Typen [68]. Der Hauptunterschied zur Arbeit von Ye et al. [67] besteht darin, dass ein anderer Antikörper benutzt wurde und dass auch eine zytoplasmatische, und nicht nur die nukleäre Färbung gewertet wurde. Dies erklärt auch, warum die Autoren einen Prozentsatz von 80% für SOX2 positive Fälle fanden, welcher deutlich höher liegt, als der dieser Arbeit (60.5%). Der Untersuchung der nukleären SOX2 Expression, so wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wurde kommt jedoch eine entscheidende Bedeutung zu, weil gerade die Expression im Nukleus bestimmt, ob eine Zelle ihren pluripotenten Status beibehält [69].

In der zweiten Studie zum Zusammenhang zwischen SOX2 und Ovarialkarzinomen wurde ebenfalls die nukleäre Färbung gewertet [68]. Es wurde mit 15% SOX2 positiver Fälle ein deutlich niedrigerer Prozentsatz gefunden. Die Arbeit von Zhang et al. bestätigt die Ergebnisse dieser Arbeit, indem sie ebenfalls eine positive Korrelation von SOX2 Expression mit geringerem Differenzierungsgrad und zunehmendem Tumorstadium aufzeigt [68].

Beim Mammakarzinom wurde die SOX2 Proteinexpression bisher v.a. in schlecht differenzierten Tumoren und in Tumoren mit Basal-Zell-Phänotyp nachgewiesen, welcher als undifferenziert und „stammzellartig“ gilt. Dabei wird SOX2 verdächtigt wesentlich zur Ausprägung dieses prognostisch ungünstigeren Tumortyps beizutragen [70].

In Mammakarzinomen vom schlecht-differenzierten und Basalzell-Typ wurde außerdem die Hochregulierung von SOX2 abhängigen Zielgenen beobachtet [71]. In einer dieser vorhergehenden Untersuchungen an hauptsächlich Hormonrezeptor positiven Mammakarzinomen wurde eine höhere SOX2 Expression bei Fällen mit Lymphknotenmetastasen beobachtet [65].

Zum besseren Verständnis der Mechanismen der SOX2 Regulation sollte die FISH Analyse für das SOX2 Gen beitragen. Dabei fanden sich mehr Fälle mit Amplifikation unter den stark-exprimierenden Tumoren, als unter den schwach exprimierenden. Dieses Ergebnis fand sich auch in vorhergehenden Studien, welche zeigten, dass 0% der serösen low-grade und Borderline Tumoren, aber 40,8% der high-grade Karzinome eine Amplifikation der Region 3q aufweisen, dem Genlocus für das SOX2 Protein [36].

Weiterhin zeigte sich, dass eine starke Proteinexpression auch in Abwesenheit einer nachweisbaren Genamplifikation möglich ist und es außerdem auch Fälle gibt, die eine Genamplifikation aufweisen, ohne das SOX2 Protein zu exprimieren. Daraus kann man schließen, dass es neben der Genamplifikation auch noch andere davon unabhängige Mechanismen der Regulation geben muss.

Der Zusammenhang zwischen SOX2 Expression und einer möglichen Genamplifikation auf Chromosom 3q26 wurde vormals in Untersuchungen am Adenokarzinom der Lunge [40] und im Plattenepithelkarzinom verschiedenen histologischen Ursprungs [39, 41] beschrieben, welche die hier resultierenden Daten bestätigen. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen ergaben jene Studien einen positiven Zusammenhang zwischen SOX2 Genamplifikation und SOX2 Proteinexpression. Jedoch wurden auch viele SOX2 positive Fälle ge-

funden, die keine Amplifikation aufwiesen und so die Existenz anderer Regulationsmechanismen suggerieren.

Eine Möglichkeit scheint die Abhängigkeit von anderen gewebsspezifischen Kofaktoren zu sein. Diese Annahme scheint naheliegend, wenn man sich die Ergebnisse von Überlebensanalysen anderer Studien anschaut. Diese zeigen einerseits, dass Patienten mit SOX2 exprimierenden Adenokarzinomen der Lunge eine schlechtere Prognose als Patienten mit SOX2 negativen Adenokarzinomen haben [40, 42]. Andererseits zeigten Patienten mit SOX2 exprimierenden Plattenepithelkarzinomen der Lunge ein längeres, und solche die SOX2 negativ waren ein kürzeres Überleben [37].

Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen unserer Untersuchungen. Sie zeigen, dass auch high-grade Ovarialkarzinome mit dem geringsten Maß an SOX2 Expression eine geringfügig bessere Prognose mit längerem rezidiv-freien Überleben aufweisen.

Die bereits erwähnte Studie von Zhang et al. zeigt jedoch keinerlei Einfluss von SOX2 Proteinexpression auf das Gesamtüberleben. Jedoch belegen die Ergebnisse, dass das rezidiv-freie Überleben bei solchen Patientinnen kürzer ist, die einen SOX2 positiven Tumor hatten. Somit zeigt sich auch hier, dass ein Einfluss von SOX2 Expression auf das klinische Outcome vorhanden ist [68]. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ein gemischtes Kollektiv von Ovarialkarzinomen mit unterschiedlicher Histologie und Ausgangsstadium untersucht. In der multivariaten Analyse war der Einfluss von SOX2 auf das Überleben dann nicht mehr signifikant.

Im Gegensatz dazu zeigt unsere Analyse, dass die Expression des Stammzellfaktors in der Gruppe der serösen high-grade Karzinome sowohl mit einem längeren Gesamtüberleben, als auch mit einem längeren rezidiv-freien Intervall verbunden ist.

Ein möglicher Mechanismus der SOX2 Regulation wurde kürzlich identifiziert: der Transkriptionsfaktor Dachshund1, der die Expression von SOX2 und Na-

nog, einem weiteren embryonalen Stammzellfaktor über die Unterdrückung ihrer Promotorregion reguliert [72].

Zusätzlich wurden die ersten Zielgene von SOX2 in in-vitro Studien gefunden, die sich mit der Fragestellung beschäftigten, wie das SOX2 Protein auf die Differenzierung und den Zellzyklus einwirkt. Chen et al. fanden heraus, dass SOX2 tiefgreifende Auswirkungen auf Gene hat, die auf die Zellproliferation einwirken, wie z.B. Ki67 und Cyclin D1. Dies muss in der Zukunft durch in-vivo Studien bestätigt werden [73].

Außerdem zeigen vorhergehende Daten, dass es zu einer Inhibition von Apoptosewegen kommt, wenn SOX2 in SOX2 negativen Ovarialkarzinomzelllinien überexprimiert wird (Lengerke et al., persönliche Mitteilung).

Zu einem weiteren interessanten Ergebnis führte die Färbung von Tubengewebe, welches als Kontrollgewebe mit in den TMA eingearbeitet wurde. Dabei ergab sich, dass das Tubenepithel positiv für das SOX2 Protein gefärbt war. Genauer gesagt waren es diejenigen Zellen im Epithel, die zilienträgend sind.

Gemeinsam betrachtet mit den aktuell diskutierten Theorien zu den Entstehungswegen der Ovarialkarzinomen, die in der Einleitung bereits dargelegt wurden, unterstützt diese Beobachtung die Theorie, die den Ursprung für einen Teil der serösen high-grade Ovarialkarzinome in der Tube vermutet.

Dies ist die erste Studie, die zeigt, dass SOX2 für einen Teil der Ovarialkarzinome einen günstigen prognostischen Effekt hat. Bisher wurden nur wenige Stammzellmarker in klinischen Proben von Ovarialkarzinomen analysiert. ALDH beispielsweise wird in der Mehrzahl der Ovarialkarzinome exprimiert und ist wie SOX2 in unserer Studie mit einer günstigeren Prognose assoziiert [74].

Notch3 wurde in genomweiten Analysen als Hauptzielregion der häufig amplifizierten Region 19q identifiziert [35]. Im Aszites von Patientinnen mit rezidivierendem Ovarialkarzinom fand man eine erhöhte Konzentration von Notch3. Dieses war mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert. Für Notch3 im Primärtumor ergab sich keine direkte Auswirkung auf die Prognose [75].

Für diese Studie wurde ein Gewebe Microarray mit Tumoren verschiedener histologischer Typen erstellt. Es wurden lediglich Fälle eingeschlossen, bei denen ein gut dokumentiertes klinisches Follow-up existierte. Nachfolgende Studien über andere Stammzellmarker an diesem Kollektiv werden zum weiteren Verständnis und zur Charakterisierung des möglichen Stammzellmarker-Phänotyps von Ovarialkarzinomen beitragen. Die Aussagekraft der Untersuchungen wird lediglich durch die geringe Repräsentation von low-grade Tumoren innerhalb der verschiedenen histologischen Typen im Kollektiv begrenzt. So müssen Fragen, die die verschiedenen pathogenetischen Pfade betreffen zurückgestellt werden, bis das Kollektiv um entsprechende Fälle erweitert wurde.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass das Protein SOX2 in einer signifikanten Anzahl von Ovarialkarzinomen exprimiert wird und mit einer Genamplifikation einhergehen kann. Überraschenderweise war es mit einer besseren Prognose bei den serösen high-grade Karzinomen als größte Gruppe assoziiert. Diese wurden mit einer platinhaltigen Chemotherapie behandelt.

Möglicherweise können bestimmte Stammzellmarker als prädiktive Marker für das Ansprechen auf eine bestimmte chemotherapeutische Substanz dienen und somit die Therapieauswahl für Patientinnen mit Ovarialkarzinom individuell verbessern. Andere Marker wiederum, wie z.B. der Faktor Notch3, sind eng mit einem hohen Risiko für ein Tumorrezidiv assoziiert.

In Zukunft muss eine Standardisierung der Marker stattfinden, welche für eine potentielle diagnostische Anwendung geeignet sind. Anschließend kann die mögliche prädiktive Aussagekraft, die die Expression von Stammzellfaktoren für das klinische Verhalten von Tumoren haben könnte, in prospektiven Studien evaluiert werden.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung: Das Ovarialkarzinom ist aktuell der maligne Tumor der Frau mit der schlechtesten Überlebensprognose [14]. Trotz Änderung der Behandlungsleitlinien, hat sich die Prognose für Betroffene nur minimal verbessert. Die molekularbiologische Entschlüsselung von Pathomechanismen, die bei Tumorentstehung und -progredienz ursächlich beteiligt sind, ist ein wesentlicher Schritt, um effektivere Methoden zur Früherkennung und Therapie zu entwickeln. Die Entdeckung vielfältiger chromosomaler Aberrationen bei serösen high-grade Ovarialkarzinomen in jüngsten Studien wies den Weg zur Fragestellung der vorliegenden Arbeit [35-37]. Sie zeigten, dass die Region 3q26 insbesondere bei dieser Gruppe häufig in amplifizierter Form auftritt. Andere Studien ordneten diesem Gen als zugehöriges Produkt den embryonalen Stammzellfaktor SOX2 zu und zeigten, dass er in anderen soliden Tumoren exprimiert wird [39, 40]. Diese Arbeit sollte Ovarialkarzinome auf eine vorhandene SOX2 Expression untersuchen und herausfinden, ob diese Expression auf genetischer Ebene determiniert ist, welche weiteren Faktoren dazu beitragen und welche prognostische Bedeutung der SOX2 Expression zukommt.

Material und Methoden: Durch die Erstellung eines TMA wurde ein Set von 215 Ovarialtumoren verschiedener histologischer Typen zusammengefasst. An diesem Array wurde eine IHC Färbung auf SOX2 durchgeführt. Anschließend wurde an der größten homogenen Gruppe des Kollektivs, den serösen high-grade Ovarialkarzinomen eine FISH Untersuchung vorgenommen, um diejenigen Tumoren zu identifizieren, welche eine Amplifikation der Region 3q26 aufwiesen, dem SOX2 tragenden Genlokus.

Ergebnis: Die Analysen der IHC zeigten, dass 60.5% der Ovarialkarzinome SOX2 exprimieren. Ein Zusammenhang zwischen Expression und histologischem Typ wurde nicht gefunden. Jedoch konnte eine signifikante Zunahme der SOX2 Expression in höheren Tumorstadien (41.4% SOX2 positive Fälle in FIGO Stadium I vs. 60.6% in Stadium II-IV; $p=0.023$) und bei geringer differen-

zierten Tumoren gefunden werden. (41,2% SOX2 positive Fälle mit Differenzierungsgrad Grad 1 vs. 68.2% bei Grad 3; $p=0,001$).

Bei der FISH Analyse zeigten 21,2% der Fälle eine Amplifikation des SOX2 Gens. Dabei war ein Trend zu häufigerer Amplifikation bei Tumoren mit hoher SOX2 Proteinexpression zu erkennen (23.7% der Fälle mit IHC Score 1 und 2 vs. 33.3% bei Score 3). Auch unter den IHC SOX2 negativen Tumoren fand sich ein kleiner Teil (9%) mit SOX2 Amplifikation. Gleichwohl zeigten viele Tumoren mit hoher SOX2 Expression keinerlei Hinweis auf eine Genamplifikation.

Überlebensanalysen zeigten, dass in der Gruppe der serösen high-grade Karzinome eine Expression von SOX2 mit einem längeren Gesamtüberleben (39 vs. 25 Monate ($p = 0.062$)) und einem signifikant längeren rezidiv-freien Intervall assoziiert war (27 vs. 21 Monate ($p=0,041$)).

Schlussfolgerung: In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Entität der Ovarialkarzinome zu den soliden Tumoren gehört, die den embryonalen Stammzellfaktor SOX2 exprimieren. Da die SOX2 tragende Region 3q26 aber nur bei einem Teil der Tumoren amplifiziert ist, steht fest, dass neben Genamplifikation weitere Faktoren zur Expression dieses Proteins beitragen. So z.B. der Faktor Dachshund1, der die Expression von SOX2 und Nanog, einem weiteren embryonalen Stammzellfaktor über die Unterdrückung ihrer Promotorregion reguliert. Überraschenderweise ist die SOX2 Expression mit einer besseren Prognose in der größten Gruppe des Kollektivs, den serösen high-grade Karzinomen assoziiert, welche mit einer platinhaltigen Chemotherapie behandelt wurden. Weitere Studien müssen evaluieren, welche Rolle die SOX2 Expression für den Verlauf und die Prognose von Ovarialkarzinomen hat.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Therapieempfehlungen für die Behandlung des Ovarialkarzinoms basierend auf den aktuellen Leitlinien der AGO [7].	10
Tabelle 2: Zusammensetzung des Studienkollektivs aufgeschlüsselt nach histologischem Typ und den klinisch-pathologischen Parametern Tumorstadium, Tumorgrad und Lymphknotenstatus	12
Tabelle 3: Punktesystem zur Bewertung der immunhistochemischen Färbung für SOX2 Protein.	18
Tabelle 4: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung auf SOX2.....	25
Tabelle 5: SOX2 in Ovarialkarzinomen des Kollektivs, aufgeschlüsselt nach Tumorstadium, histologischen Subtypen und Tumorgrad	31
Tabelle 6: SOX2 Amplifikationsstatus der serösen high-grade Ovarialkarzinome - aufgeschlüsselt nach SOX2 Expression Score 0, Score 1-2 und Score 3	32

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der histologischen Typen im Gesamtkollektiv.....	13
Abbildung 2: Der Weg vom Paraffinblock über den Gewebe Microarray bis zum histologischen Schnitt.....	15
Abbildung 3: Prinzip der Immunhistochemie	17
Abbildung 4A-D: Immunhistochemische Färbung auf SOX2 Expression an serösen high-grade Ovarialkarzinomen	26
Abbildung 5: Prozentsatz der immunhistochemisch SOX2 positiven Tumoren jeder histologischen Gruppe.....	28
Abbildung 6: Prozentsatz immunhistochemisch SOX2 positiver Tumoren niedriger (FIGO I) und hoher (FIGO II-IV) Tumorstadien.....	29
Abbildung 7: Prozentsatz immunhistochemisch SOX2 positiver Tumoren der verschiedenen Differenzierungsgrade. Je geringer der Differenzierungsgrad eines Tumors ist, desto höher ist der Anteil an SOX2 positiven Tumorzellen ..	30
Abbildung 8 oben und unten: Mit der FISH Methode gefärbte Schnittpräparate unter dem Fluoreszenz Mikroskop	33
Abbildung 9: SOX2 Amplifikationsstatus von serösen high-grade Ovarialkarzinomen untersucht mit FISH.....	34
Abbildung 10A und B: Kaplan-Meier Kurve für die serösen high-grade Karzinome der fortgeschrittenen Stadien (FIGO II-IV) – Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben.....	36
Abbildung 11: Tubenepithel, dessen zilienbesetzte Zellen positiv für SOX2 angefärbt sind.....	38
Abbildung 12: Kontrollgewebe des Ovars, welches in der SOX2 Färbung keine positive nukleäre Färbung aufweist	38

8 Literaturverzeichnis

1. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
2. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
3. Engel, J., et al., *Moderate progress for ovarian cancer in the last 20 years: prolongation of survival, but no improvement in the cure rate*. Eur J Cancer, 2002. **38**(18): p. 2435-45.
4. Heintz, A.P., et al., *Carcinoma of the ovary*. Int J Gynaecol Obstet, 2003. **83 Suppl 1**: p. 135-66.
5. van der Burg, M.E., *Advanced ovarian cancer*. Curr Treat Options Oncol, 2001. **2**(2): p. 109-18.
6. Benedet, J.L., et al., *FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology*. Int J Gynaecol Obstet, 2000. **70**(2): p. 209-62.
7. Kommission Ovar, A.G.O.e.V. *Empfehlungen für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren*. 2011; Available from: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/ovar/ovar_empfehlungen_maligner_tumoren_de_11.pdf.
8. van der Burg, M.E. and I. Vergote, *The role of interval debulking surgery in ovarian cancer*. Curr Oncol Rep, 2003. **5**(6): p. 473-81.
9. Hunter, R.W., N.D. Alexander, and W.P. Soutter, *Meta-analysis of surgery in advanced ovarian carcinoma: is maximum cytoreductive surgery an independent determinant of prognosis?* Am J Obstet Gynecol, 1992. **166**(2): p. 504-11.
10. Griffiths, C.T., *Surgical resection of tumor bulk in the primary treatment of ovarian carcinoma*. Natl Cancer Inst Monogr, 1975. **42**: p. 101-4.
11. Bristow, R.E., et al., *Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis*. J Clin Oncol, 2002. **20**(5): p. 1248-59.
12. du Bois, A., et al., *Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and*

- the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO)*. Cancer, 2009. **115**(6): p. 1234-44.
13. Chobanian, N. and C.S. Dietrich, 3rd, *Ovarian cancer*. Surg Clin North Am, 2008. **88**(2): p. 285-99, vi.
 14. Sant, M., et al., *EUROCORE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94-- results and commentary*. Ann Oncol, 2003. **14 Suppl 5**: p. v61-118.
 15. Griffiths, C.T., R.H. Grogan, and T.C. Hall, *Advanced ovarian cancer: primary treatment with surgery, radiotherapy, and chemotherapy*. Cancer, 1972. **29**(1): p. 1-7.
 16. Wils, J.A., *Long-term follow-up of patients with advanced ovarian carcinoma treated with debulking surgery and chemotherapy consisting of cisplatin, doxorubicin, and cyclophosphamide*. Gynecologic Oncology Group of the Comprehensive Cancer Center. Oncology, 1990. **47**(2): p. 115-20.
 17. Hacker, N.F. and M.E. van der Burg, *Advanced ovarian cancer. Debulking and intervention surgery*. Ann Oncol, 1993. **4 Suppl 4**: p. 17-22.
 18. Bristow, R.E., I. Puri, and D.S. Chi, *Cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer: a meta-analysis*. Gynecol Oncol, 2009. **112**(1): p. 265-74.
 19. Randall, M.E., et al., *Chemotherapy, early surgical reassessment, and hyperfractionated abdominal radiotherapy in stage III ovarian cancer: results of a gynecologic oncology group study*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **34**(1): p. 139-47.
 20. Chan, J.K., et al., *The potential benefit of 6 vs. 3 cycles of chemotherapy in subsets of women with early-stage high-risk epithelial ovarian cancer: an exploratory analysis of a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecol Oncol, 2010. **116**(3): p. 301-6.
 21. Hogberg, T., B. Glimelius, and P. Nygren, *A systematic overview of chemotherapy effects in ovarian cancer*. Acta Oncol, 2001. **40**(2-3): p. 340-60.
 22. *SEER Cancer Statistics Review 1973-1997*, 2001, National Cancer Institute: <http://seer.cancer.gov/>.
 23. Partridge, E., et al., *Results from four rounds of ovarian cancer screening in a randomized trial*. Obstet Gynecol, 2009. **113**(4): p. 775-82.
 24. Tavassoli FA, D.I.P., *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. Lyon: IARC Press, 2003.
 25. Kobel, M., et al., *Diagnosis of ovarian carcinoma cell type is highly reproducible: a transcanadian study*. Am J Surg Pathol, 2010. **34**(7): p. 984-93.

26. Kobel, M., et al., *A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(1): p. 14-21.
27. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. Am J Surg Pathol, 2010. **34**(3): p. 433-43.
28. Cho, K.R. and M. Shih Ie, *Ovarian cancer*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 287-313.
29. Cheng, W., et al., *Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract*. Nat Med, 2005. **11**(5): p. 531-7.
30. Dubeau, L., *The cell of origin of ovarian epithelial tumours*. Lancet Oncol, 2008. **9**(12): p. 1191-7.
31. Kuhn, E., et al., *Shortened telomeres in serous tubal intraepithelial carcinoma: an early event in ovarian high-grade serous carcinogenesis*. Am J Surg Pathol, 2010. **34**(6): p. 829-36.
32. Mehrad, M., et al., *A pathologist's road map to benign, precancerous, and malignant intraepithelial proliferations in the fallopian tube*. Adv Anat Pathol, 2010. **17**(5): p. 293-302.
33. Piek, J.M., R.H. Verheijen, and P.J. van Diest, *Tubal and ovarian pathways to pelvic epithelial cancer: a pathological perspective*. Histopathology, 2009. **54**(4): p. 494-5.
34. Crum, C.P., et al., *Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer*. Clin Med Res, 2007. **5**(1): p. 35-44.
35. Park, J.T., et al., *Notch3 gene amplification in ovarian cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(12): p. 6312-8.
36. Staebler, A., et al., *Chromosomal losses of regions on 5q and lack of high-level amplifications at 8q24 are associated with favorable prognosis for ovarian serous carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(10): p. 905-17.
37. Hussenet, T., et al., *SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8960.
38. Takahashi, E., et al., *Mapping of the MYC gene to band 8q24.12----q24.13 by R-banding and distal to fra(8)(q24.11), FRA8E, by fluorescence in situ hybridization*. Cytogenet Cell Genet, 1991. **57**(2-3): p. 109-11.
39. Bass, A.J., et al., *SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas*. Nat Genet, 2009. **41**(11): p. 1238-42.

40. Wilbertz, T., et al., *SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer*. *Mod Pathol*, 2011. **24**(7): p. 944-53.
41. Maier, S., et al., *SOX2 amplification is a common event in squamous cell carcinomas of different organ sites*. *Hum Pathol*, 2011. **42**(8): p. 1078-88.
42. Sholl, L.M., et al., *Sox2 protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage I lung adenocarcinoma*. *Am J Surg Pathol*, 2010. **34**(8): p. 1193-8.
43. Sinclair, A.H., et al., *A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif*. *Nature*, 1990. **346**(6281): p. 240-4.
44. Werner, M.H. and S.K. Burley, *Architectural transcription factors: proteins that remodel DNA*. *Cell*, 1997. **88**(6): p. 733-6.
45. Wolffe, A.P., *Architectural transcription factors*. *Science*, 1994. **264**(5162): p. 1100-1.
46. Yuan, H., et al., *Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3*. *Genes Dev*, 1995. **9**(21): p. 2635-45.
47. Avilion, A.A., et al., *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. *Genes Dev*, 2003. **17**(1): p. 126-40.
48. Bani-Yaghoob, M., et al., *Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex*. *Dev Biol*, 2006. **295**(1): p. 52-66.
49. Collignon, J., et al., *A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2*. *Development*, 1996. **122**(2): p. 509-20.
50. Pevny, L.H., et al., *A role for SOX1 in neural determination*. *Development*, 1998. **125**(10): p. 1967-78.
51. Ambrosetti, D.C., et al., *Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(30): p. 23387-97.
52. Uwanogho, D., et al., *Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development*. *Mech Dev*, 1995. **49**(1-2): p. 23-36.
53. Mizuseki, K., et al., *Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction*. *Development*, 1998. **125**(4): p. 579-87.

54. Rex, M., et al., *Dynamic expression of chicken Sox2 and Sox3 genes in ectoderm induced to form neural tissue*. Dev Dyn, 1997. **209**(3): p. 323-32.
55. Wegner, M., *From head to toes: the multiple facets of Sox proteins*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(6): p. 1409-20.
56. Episkopou, V., *SOX2 functions in adult neural stem cells*. Trends Neurosci, 2005. **28**(5): p. 219-21.
57. Schmitz, M., et al., *Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy*. Br J Cancer, 2007. **96**(8): p. 1293-301.
58. Hemmati, H.D., et al., *Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15178-83.
59. Gangemi, R.M., et al., *SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity*. Stem Cells, 2009. **27**(1): p. 40-8.
60. Fong, H., K.A. Hohenstein, and P.J. Donovan, *Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(8): p. 1931-8.
61. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
62. de Jong, J., et al., *Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications*. J Pathol, 2008. **215**(1): p. 21-30.
63. Kommos, S. *Zur prognostischen Bedeutung des transitionalzelligen Typs und der immunhistochemisch bestimmten Proliferationsaktivität bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen*. 2006.
64. Guesdon, J.L., T. Ternynck, and S. Avrameas, *The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques*. J Histochem Cytochem, 1979. **27**(8): p. 1131-9.
65. Lengerke, C., et al., *Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 42.
66. Pardue, M.L. and J.G. Gall, *Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1969. **64**(2): p. 600-4.
67. Ye, F., et al., *Expression of Sox2 in human ovarian epithelial carcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2011. **137**(1): p. 131-7.

68. Zhang, J., et al., *Sex-determining region Y-box 2 expression predicts poor prognosis in human ovarian carcinoma*. Hum Pathol, 2012.
69. Baltus, G.A., et al., *Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells*. Stem Cells, 2009. **27**(9): p. 2175-84.
70. Rodriguez-Pinilla, S.M., et al., *Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer*. Mod Pathol, 2007. **20**(4): p. 474-81.
71. Ben-Porath, I., et al., *An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 499-507.
72. Wu, K., et al., *Cell fate determination factor Dachshund reprograms breast cancer stem cell function*. J Biol Chem, 2011. **286**(3): p. 2132-42.
73. Chen, Y., et al., *The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer*. J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 17969-78.
74. Chang, B., et al., *ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers*. Mod Pathol, 2009. **22**(6): p. 817-23.
75. Park, J.T., et al., *Notch3 overexpression is related to the recurrence of ovarian cancer and confers resistance to carboplatin*. Am J Pathol, 2010. **177**(3): p. 1087-94.

9 Anhang

FIGO Klassifikation

I		Tumor begrenzt auf Ovarien
	la	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
	lb	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche der beiden Ovarien
	lc	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur; Tumor an der Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites/bei Peritonealspülung
II		Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
	Ila	Ausbreitung auf und/oder Implantate Uterus und/oder Tube(n)
	IIb	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
	IIc	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
III		Tumor befällt ein oder beide Ovarien, mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
	IIIa	mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
	IIIb	makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung 2cm
	IIIc	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung > 2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
IV		Fernmetastasen (Peritonealmetastasen ausgenommen)

10 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits veröffentlicht in:

Pham, D.L., Scheble, V., et al., *SOX2 expression and prognostic significance in ovarian carcinoma*. Int J. Gynecol Pathol, 2013. **32**(4): p. 358-67

11 Erklärungen zum Eigenanteil

Deborah Lan Pham: Unter wissenschaftlicher Leitung von Frau PD Dr. Annette Staebler erfolgte Studiendesign, Rekrutierung des Archivmaterials, Sichten der histologischen Schnitte, die Zusammenstellung des TMAs, die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen, die Integrierung der FISH Untersuchung, die statistische Auswertung und Überlebensanalyse.

AG Perner (Leitung Prof. Dr. Sven Perner) mit Dr. Veit Scheble: Etablierung der FISH Färbung für SOX2 und Auswertung am TMA.

AG Fehm (Leitung PD Dr. Tanja Fehm) mit Dr. Cornelia Bachmann: Bereitstellung der Daten für das Patientinnenkollektiv, Erfassung von follow-up Daten.

Christine Beschorner: Unterstützung bei der technischen Umsetzung des TMAs.

Anne Adam: Etablierung der immunhistochemischen SOX2 Färbung.

12 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Falko Fend, unter dessen Leitung als Ärztlicher Direktor des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Tübingen die Untersuchungen für diese Arbeit erst möglich waren.

Zu außerordentlichem Dank bin ich insbesondere Frau Privatdozentin Dr. Annette Staebler verpflichtet, die diese Arbeit als Doktormutter, Betreuerin und Ideengeberin erst realisierbar machte. Sie unterstützte mich zu jeder Zeit mit ihrer fachlichen Kompetenz, Begeisterung für die Forschung und außerordentlicher Aufopferungsbereitschaft.

Frau Christine Beschorner danke ich für die große Hilfe, die sie mir bei der Erstellung des TMAs war. Ebenfalls danke ich den Mitarbeitern des immunhistochemischen Labors des Pathologischen Instituts, die mich bei den Färbungen unterstützten, insbesondere Frau Brigitte Bachmann und Frau Anne Adam.

Zu großem Dank bin ich auch der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Sven Perner verpflichtet. Vor allem Herrn Dr. Veit Scheble und Frau Karen Petersen, die mir bei der FISH Färbung und Auswertung eine große Hilfe waren.

Der Arbeitsgruppe von Frau Privatdozentin Dr. Tanja Fehm der Universitätsfrauenklinik Tübingen mit Frau Dr. Cornelia Bachmann danke ich für die Bereitstellung von klinischen und follow-up Daten, ohne die die Überlebensanalyse nicht möglich gewesen wären.

Meiner Familie danke ich für bedingungslose Unterstützung, Ermutigung und Rückhalt. Sie gab mir in jeder Situation Vertrauen und die nötige Kraft. Meinen Geschwistern Sarah und Privatdozent Dr. Mirko Pham danke ich ganz besonders für die Hilfe bei der Korrektur in fachlichen und sprachlichen Belangen. Außerdem danke ich Jan Wanger für seinen Beitrag, der einen wichtigen Teil zur graphischen Ausreifung der Arbeit darstellte.