

Aus dem Pathologischen Institut der  
Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Udo Löhrs

**K-RAS-Mutationen in ovariellen und  
extraovariellen Herden von serösen LMP-Tumoren  
(Borderline-Tumoren) des Ovars**

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

vorgelegt von

Florian Seemüller  
aus  
Berlin  
2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med J. Diebold

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Untch  
Prof. Dr. F. Willgeroth

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2005

	Abkürzungsverzeichnis	V
1.	Einleitung	1
1.1	Einleitung, Epidemiologie	1
1.2	Seröse Borderline-Tumoren (SBOT) des Ovars	2
1.3	Prognose der SBOT	3
1.4	Stadieneinteilung	5
1.5	Molekulare Pathogenese der serösen Borderline-Neoplasien	6
1.5.1	Prädisponierende Faktoren	6
1.5.2	DNA-Zytometrie	7
1.5.3	Chromosomale Aberrationen, Tumorsuppressorgene, Onkogene	7
1.6	Das RAS-Onkogen	8
1.6.1	Die RAS-Familie	8
1.6.2	Das Ras-Protein	9
1.7	Ziel der Studie	12
2.	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.	Charakterisierung der Patientinnen	14
2.2	Methoden	15
2.2.1	Versuchsablauf	15
2.2.2	Prinzip der Laser-Mikrodissektion	15
2.2.3	Die PCR	17
2.2.4	Die Denaturierende Gradienten Gel-Elektrophorese (DGGE)	18
2.2.5	Das Sequenzieren	19

2.2.5.1	Zyklische Sequenzierung	20
2.2.5.2	Automatisierte DNA-Sequenzierung	21
2.3	Protokolle	22
2.3.1	Vorbereitung der Objektträger zur Laser-Mikrodissektion	22
2.3.2	Entparaffinierung und Methylgrünfärbung	22
2.3.3	Laser-Mikrodissektion	22
2.3.4	DNA Extraktion mittels E.Z.N.A. Tissue Kit II	23
2.3.5	DGGE	24
2.3.5.1	DGGE-PCR	24
2.3.5.2	DGGE-Protokol	25
2.3.6	DNA-Sequenzierung	25
2.3.6.1	PCR	25
2.3.6.2	Cycle-Sequenzierung-PCR	27
2.4	Lösungen	28
2.4.1	PCR Gellauf	28
2.4.2	DGGE	28
2.5	Chemikalien	30
2.6.	Verwendete Kit-Systeme	31
2.7	Geräte	31
2.8	Verbrauchsmaterialien	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Die einzelnen Fälle	32
3.1.1	Fall 321	32
3.1.2.	Fall 123	32

3.1.3	Fall 302	33
3.1.4	Fall 127	34
3.1.5	Fall 304	34
3.1.6	Fall 107	35
3.1.7	Fall 320	35
3.1.8	Fall 322	37
3.1.9	Fall 323 und 324	38
3.1.9.1	Fall 323	38
3.1.9.2	Fall 324	38
3.1.10	Zusammenfassung der erhobenen Daten	38
3.1.10.1	Bilaterale Tumoren	38
3.1.10.2	Unterschiedliche Areale der gleichen Läsion	39
3.1.10.3	Extraovarielle Herde	39
4.	Diskussion	42
4.1	Einleitung	42
4.2	K-RAS Mutation als Marker zum Monoklonalitätsnachweis	44
4.3	K-RAS Mutationen bei ovariellen Tumoren	45
4.4	Die Multifokalitätstheorie	46
4.4.1	Das sekundäre Müllersche System	46
4.4.3	Hinweise für die Bedeutung des Feldeffektes in der Karzinogenese seröser Borderline-Tumoren	47
4.4.4	K-RAS Mutation als Feldeffekt	49
4.5	Diskussion der eigenen Ergebnisse im Zusammenhang des aktuellen Forschungsstandes	50
4.5.1	Zusammensetzung der Zellpopulation einzelner Läsionen	50
4.5.2	Endosalpingiose	50

4.5.3	Implantate und bilaterale SBOT	52
4.6	Klinische Relevanz	54
4.7	Schlußfolgerungen	55
5.	Zusammenfassung	56
6.	Literatur	57
7.	Danksagung	64
8.	Lebenslauf	65

## Abkürzungsverzeichnis

DGGE	<b>D</b> enaturierende <b>G</b> radienten <b>G</b> el <b>E</b> lektrophorese, ein sehr sensitives Verfahren zum Nachweis von Mutationen
DNA	<b>d</b> esoxyribonucleic <b>a</b> cid
FIGO	<b>F</b> édération <b>I</b> nternationale de Gynécologie et d' <b>Ó</b> bstétrique
GAP	<b>G</b> Tase <b>a</b> ctivating <b>p</b> roteins
GDP	<b>G</b> uanin <b>D</b> i- <b>P</b> hosphat
GEF	<b>g</b> uanin <b>n</b> ucleotide <b>e</b> xchange <b>f</b> actors
GTP	<b>G</b> uanin <b>T</b> ri- <b>P</b> hosphat
K-RAS Gen	<b>K</b> irsten <b>R</b> AS <b>O</b> nkogen
LMP-Tumore	low <b>m</b> alignant <b>p</b> otential Tumore, Synonym für Borderline-Tumoren.
LOH	loss <b>o</b> f <b>h</b> eterozygosity
MIC	<b>m</b> üllerian <b>i</b> nclusion <b>c</b> ysts
MPSC	<b>m</b> icropapillary <b>s</b> erous <b>c</b> arcinoma
PCR	<b>p</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction
PDGF	<b>p</b> latelet <b>d</b> erived <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
Primer	DNA-Fragmente, welche die zu amplifizierende Sequenz flankieren
SBOT	<b>s</b> erous <b>b</b> orderline <b>o</b> varian <b>t</b> umors
SOS	<b>s</b> on of <b>s</b> evenless, ein Protein der Ras Kaskade
SSCP	<b>s</b> ingle- <b>s</b> trand <b>c</b> onformational <b>p</b> olymorphism
VEGF	<b>v</b> ascular <b>e</b> ndothelial <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
WHO	<b>w</b> orld <b>h</b> ealth <b>o</b> rganisation

# 1. Einleitung

## 1.1 Einleitung, Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom rangiert in Deutschland bei den Malignomen des weiblichen Geschlechtstraktes nach dem Endometriumkarzinom an zweiter Stelle und macht etwa 28% aller malignen Erkrankungen des weiblichen Genitalbereichs aus. Im Laufe ihres Lebens erkrankt eine von siebzig Frauen an einem Ovarialkarzinom und stirbt mit einer Wahrscheinlichkeit von 65% innerhalb der ersten zehn Jahre nach Diagnosestellung (Tumorzentrum München, 2001b). Die Gründe für diese Zahlen liegen zum Teil in dem nur bruchstückhaften Verständnis von Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung. Insbesondere sind die frühen Phasen der ovariellen Karzinogenese morphologisch und molekularpathologisch wenig charakterisiert.

Ein gutes Modell der formalen Pathogenese maligner Neoplasien stellt die Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom dar. Dabei lassen sich den einzelnen morphologischen Veränderungen relativ gut definierte molekularpathologische Veränderungen zuordnen. Von besonderem Interesse sind dabei die frühen Stadien, die dem invasiven Karzinom voraus gehen. So findet man beim Übergang von kleinen zu größeren (>1cm) Adenomen häufig eine Mutation des K-RAS-Onkogen (Tumorzentrum München, 2001a). Kennzeichnend für eine Progression zu größeren Adenomen mit zellulären Atypien ist der Verlust des DCC-Genes (Deleted in Colorectal Cancer). Eine Mutation im pP53-Gen geht dann zumeist mit dem Übergang in ein invasives Karzinom einher. Das molekulare Verständnis der Adenom-Karzinom Sequenz stellt die wissenschaftliche Basis der aktuellen Diagnostik und Therapie von Kolon-Polypen dar. So gilt es heute als gesichert, daß die endoskopische Adenomabtragung das Risiko der Entstehung eines Kolonkarzinoms in den folgenden 6 Jahren um 50% senkt (Tumorzentrum München, 2001a).

Im Ovar ist die Existenz einer Adenom-Karzinom-Sequenz umstritten, jedoch kennt man bei den ovariellen Neoplasien eine Gruppe von Tumoren, die sowohl klinisch als auch epidemiologisch und morphologisch eine Mittelstellung zwischen den eindeutig gutartigen und den bösartigen Tumoren des Ovars einnehmen. Erstmals wurde diese Gruppe 1929 von Taylor beschrieben, bevor sie 42 Jahre später von der FIGO und 1973 von der WHO als eigene Entität mit der Bezeichnung Borderline-Tumoren in die Klassifikation aufgenommen wurde. Synonym spricht man auch von LMP (low malignant potential) Tumoren. Der Begriff



SBOT bezieht sich lediglich auf die Gruppe der serösen Borderline-Tumoren des Ovars (Serous Borderline Ovarian Tumors). Bis heute ist noch nicht hinreichend geklärt, ob es sich bei diesen Tumoren um echte Vorläuferläsionen der invasiven Karzinome des Ovars handelt, oder ob sie eine eigene, unabhängige Krankheitsentität repräsentieren. Histologisch unterscheidet sich diese Gruppe von den Zystadenomen durch ein mehrschichtiges Epithel, zunehmende mitotische Aktivität, Papillenbildung sowie nukleäre Atypien. Gegenüber den Karzinomen lassen sich die Borderline-Tumoren durch das Fehlen invasiven Wachstums sowie durch eine geringere mitotische Aktivität und eine weniger verschobene Kern-Plasma-Relation abgrenzen (Dietel et al, 2000). An Borderline-Tumoren erkrankte Frauen sind mit einem Durchschnittsalter von 45 Jahren deutlich jünger als Patientinnen mit invasiven Ovarialneoplasien, die im Schnitt 60 Jahre alt sind, aber älter als Patientinnen mit einer benignen Ovarialneoplasie (Iscovich et al, 1998; Trope et al, 1998).

Meistens werden LMP-Tumoren im Stadium I diagnostiziert (65%-90%) und haben eine sehr günstige Prognose mit Überlebensraten von nahezu 100%. Im Gegensatz dazu liegt bei etwa 70% aller Patienten mit einem Ovarialkarzinom ein fortgeschrittenes Stadium (FIGO III - IV) mit weitaus schlechterer Prognose vor (Link et al, 1996; Trope und Kaern, 1998; Tumorzentrum München, 2001).

Gliedert man die Borderline-Tumoren in die Gesamtgruppe der Ovarialkarzinome ein, so machen sie mit 10% bis 20% einen nicht unbedeutenden Anteil aus (Iscovich et al, 1998). In Deutschland betrug die Inzidenz für das Ovarialkarzinom im Jahr 1997 circa 19,5 je 100000 Frauen (Tumorzentrum München, 2001). Wie bei den invasiven Ovarialkarzinomen werden die Borderline-Tumoren ebenfalls in die großen histologischen Subgruppen der serösen (55%), muzinösen (40%), endometroiden (2%) und klarzelligen Tumoren (<1%) eingeteilt (Kaern et al, 1993a).

## 1.2 Seröse Borderline-Tumoren (SBOT) des Ovars

SBOT (serous borderline ovarian tumors) machen etwa 10% bis 25% von allen serösen Neoplasien des Ovars aus, sind im Durchschnitt etwa 7 bis 12 cm groß und treten in circa 37% Prozent beidseitig auf (Trimble et al, 1994). Im Vergleich dazu treten invasive Karzinome häufiger beidseitig auf (50%-60%), während Adenome in 70- 90% unilateral vorliegen.

Darüber hinaus ist diese Art von Tumoren gehäuft mit dem Auftreten von peritonealen Läsionen vergesellschaftet, deren Morphologie ein weites Spektrum umfaßt. Dieses reicht von eindeutig gutartigen Drüseneinschlüssen (Endosalpingiose, Müllersche-Inklusionszysten) bis hin zu sogenannten Implantaten, die morphologisch dem ovariellen

Borderline-Tumor weitgehend gleichen. Entsprechende Läsionen lassen sich in etwa 35% der Fälle nachweisen (Trope und Kaern, 1998). Die Frage nach der Pathogenese dieser Läsionen ist derzeit Gegenstand intensiver Diskussionen. Dabei haben sich zwei gegensätzliche Theorien herauskristallisiert. Einige Autoren sehen darin unabhängige Herde einer multifokalen, serösen Epithelproliferation, die sich von mesothelialen Zellen ableiten läßt, welche die ovarielle Oberfläche und das pelvine Peritoneum bedecken, und als sogenanntes sekundäres Müllersches System bezeichnet werden (Kadar et al, 1995).

Im Gegensatz dazu bevorzugen andere Autoren die Theorie, daß diese extraovariellen Herde das Ergebnis einer metastasenartigen Streuung des ovariellen Tumors sind (Moore et al, 2000). Diese Theorie mag für die SBOT passend sein, die an der Oberfläche des Ovars lokalisiert sind, aber die extraovariellen Läsionen, die mit zystischen SBOT assoziiert sind und sowohl von der ovariellen Oberfläche als auch von der peritonealen Höhle deutlich getrennt sind, lassen sich mit dieser Theorie nur schwer erklären (Segal et al, 1992).

### 1.3 Prognose der SBOT

FIGO-Stadium, Größe des Resttumors nach Operation, Patientinnenalter sowie histologischer Typ sind etablierte Prognosefaktoren für Rezidiv-Rate und Überleben von Ovarialkarzinom-Patientinnen.

Die überwiegende Mehrheit der Patientinnen mit serösen LMP-Neoplasien befindet sich zum Zeitpunkt der Diagnose im Stadium I. Dies erklärt die hervorragende 10-Jahres-Überlebensrate von etwa 95% (Seidman et al, 2000). Die Angaben über die Mortalitätsrate für LMP-Tumoren im Stadium III schwanken von 0% bis 50% (Kaern et al, 1993a; Seidman et al, 1996).

Wahrscheinlich liegt der weiten Streubreite dieser Zahlen die Tatsache zugrunde, daß die extraovariellen Läsionen bei LMP-Tumoren im Stadium III eine heterogene Gruppe bilden. Schließt man Patientinnen mit invasiven Implantaten aus, so ergibt sich bei gleichem Stadium eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 92% wie Kurman und Mitarbeiter (1993) anhand einer Metaanalyse mit 415 Patienten zeigen konnten. Die prognostische Bedeutung invasiver Implantate ist inzwischen allgemein anerkannt (Gilks et al, 2003; Dietel und Hauptmann, 2000; Kaern et al, 1993a; Seidman und Kurman, 2000; Trimble und Trimble, 1994; Trope und Kaern, 1998).

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie konnte nachgewiesen werden, daß das Vorhandensein von invasiven Implantaten mit einer um das siebenfache erhöhten Mortalitätsrate einhergeht (Seidman und Kurman, 2000). Sowohl nicht invasive Implantate als

auch Endosalpingiose-Herde scheinen dagegen keinen oder nur geringen Einfluß auf das Überleben zu haben (Menzin et al, 2000).

Als einen weiteren Versuch, die wenigen serösen LMP-Tumoren mit ungünstigem klinischen Verlauf (ca.10% - 20%) von der überwiegenden Mehrheit der gutartig verlaufenden Borderline-Tumoren abzugrenzen, muß man das von Burks und Mitarbeitern (1996) vorgeschlagene Konzept des "mikropapillären serösen Karzinom" (MPSC) auffassen.

Dieser Klassifikationsvorschlag fußt auf der Beobachtung, daß die Subgruppe von serösen Borderline-Neoplasien (ca. 5% - 12%), die ein mikropapilläres oder kribriiformes Wachstumsmuster aufweisen, eine geringere 10-Jahres-Überlebensrate aufweist als die übrigen serösen LMP-Tumoren. Des weiteren zeigt sie gehäuft ein bilaterales Wachstum und eine starke Assoziation mit invasiven Implantaten (Seidman und Kurman, 1996).

Wenn man allerdings bedenkt, daß die Prognose eines serösen LMP-Tumors mit nicht invasiven Implantaten genau so gut ist wie die Prognose eines mikropapillären serösen Karzinoms mit nicht invasiven Implantaten und eine ovarielle Stromainfiltration per definitionem fehlt, scheint die Bezeichnung "Karzinom" nicht ausreichend gerechtfertigt zu sein. Beim Nachweis von invasiven Implantaten läßt sich kein nennenswerter Unterschied zwischen mikropapillären und anderen serösen LMP-Tumoren im Hinblick auf die Prognose feststellen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es empfehlenswerter erscheint, diese Tumoren als Untergruppe der Borderline-Tumoren und nicht als eigenständige Entität zu klassifizieren (Dietel und Hauptmann, 2000; Eichhorn et al, 1999; Seidman und Kurman, 2000). Dieser Auffassung ist auch die WHO in ihrer aktuellsten Klassifikation der Ovarialtumoren gefolgt (Tavassoli und Fattaneh, 2003).

## 1.4 Stadieneinteilung

Die Festlegung des Tumorstadiums der SBOT entspricht der Einteilung für Ovarialkarzinome nach den Richtlinien der FIGO (FIGO 2000, UICC 1992)

FIGO-Stadium	Befund	TNM-Kategorie
<b>I</b>	<b>Begrenzt auf Ovarien,</b>	<b>T1</b>
IA	Ein Ovar, Kapsel intakt	T1a
IB	Beide Ovarien, Kapsel intakt, Kapselruptur,	T1b
IC	Tumor an der Oberfläche, maligne Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung	T1c
<b>II</b>	<b>Ausbreitung im Becken</b>	<b>T2</b>
IIA	Uterus, Tube(n)	T2a
IIB	Andere Beckengewebe	T2b
IIC	Maligne Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung	T2c
<b>III</b>	<b>Peritonealmetastasen jenseits des kleinen Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen</b>	<b>T3 und/oder N1</b>
IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen	T3a
IIIB	Makroskopische Peritonealmetastase(n)• 2cm	T3b
IIIC	Peritonealmetastase(n)>2cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen	T3c und/oder N1
<b>IV</b> (kommt bei LMP-Tumoren nicht vor)	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen),	<b>M1</b>

**Tabelle 1: FIGO und TNM Klassifikation**

## 1.5 Molekulare Pathogenese der serösen Borderline-Neoplasien

### 1.5.1 Prädisponierende Faktoren

Die Analyse von Prädispositions-Faktoren für die Entstehung von Ovarialtumoren hat bislang keinen eindeutigen Hinweis darauf ergeben, ob es sich bei der Gruppe der Borderline-Tumoren um eine eigenständige Krankheitsentität handelt oder ob diese ein Übergangsstadium im Verlauf einer Mehrschritt-Karzinogenese vom Adenom zum Karzinom darstellen.

So spricht die Tatsache, daß es Risikofaktoren gibt, die Ovarialkarzinome und Borderline-Tumoren nicht gemeinsam haben eher dafür, daß es sich um zwei voneinander unabhängige Krankheiten handelt. So ist zum Beispiel eine positive Familienanamnese für Ovarialkarzinome zwar mit einem erhöhten Risiko für invasive epitheliale Eierstock-Neoplasien assoziiert, nicht aber mit einem erhöhtem Risiko für LMP-Tumoren (Shushan et al, 1999).

Des weiteren finden sich bei Trägerinnen von BRCA1- oder BRCA2 Mutationen, die ein hohes Risiko für Ovarialkarzinome haben, nur selten Borderline-Tumoren (Modan et al, 1996).

Dagegen scheinen ovulationsfördernde Medikamente hauptsächlich die Entstehung von Borderline-Tumoren zu begünstigen (Shushan et al, 1999). Eine mögliche Erklärung bietet die Beobachtung, daß sich bei Borderline-Tumoren regelmäßig eine Expression des Östrogenrezeptors nachweisen läßt (Abu-Jawdeh et al, 1996).

Auf der anderen Seite sind protektive Faktoren beschrieben, die nachweisbar mit einer verminderten Inzidenz beider Krankheiten verbunden sind, zum Beispiel der Gebrauch von Ovulationshemmern, Laktation und die Zahl durchgemachter Schwangerschaften.

Den theoretischen Hintergrund bietet die sogenannte „Ovulationshypothese“. Ihr liegt die Annahme zugrunde, daß das Risiko für die Entstehung von Ovarialtumoren von der Zahl der Ovulationen abhängt. Dies wird mit den besonderen biologischen Eigenschaften des einschichtigen ovariellen Deckepithels erklärt.

Im Vergleich zu den meisten anderen Epithelien des Körpers zeichnet sich das Deckepithel des Ovars dadurch aus, daß eine Stammzellschicht, wie man sie z.B. bei der Haut oder den Darmepithelien kennt, fehlt. Während der reproduktiven Phase der Frau kommt es mit jedem Eisprung zu einem Aufreißen jener Epithelschicht. Die anschließende Wundheilung muß von den Zellen des Deckepithels ausgehen. Die damit verbundene erhöhte Zellteilungsrate erleichtert das Entstehen genetischer Alterationen, die dann sowohl persistieren können als auch exponentiell an die Tochterzellen weitergegeben werden können, so daß es schließlich

über eine Akkumulation der genetischen Schäden zur neoplastischen Transformation der Zellen kommt (Murdoch, 1996; Godwin et al, 1993).

### 1.5.2 DNA-Zytometrie

Bei invasiven Ovarialkarzinomen ist die prognostische Bedeutung des nukleären DNA-Gehalts gut belegt (Diebold et al, 1996d). Es ist daher naheliegend, daß die Methode der DNA-Zytometrie auch auf die Borderline-Tumoren mit dem Ziel angewendet wurde, durch die Bestimmung des DNA-Gehalts der Tumorzellen eine prognostische Aussage zu erreichen. Da diese Methode sich hauptsächlich zur Erfassung grober genetischer Alterationen eignet und solche bei Tumoren von Borderline-Dignität nur selten vorkommen, erscheint es schon von methodischer Seite her betrachtet fragwürdig, ob diese Technik klinische Relevanz hat.

Bis zum heutigen Tage sind die Daten zu diesem Thema kontrovers. Eine Ursache könnte darin begründet liegen, daß viele Studien nicht zwischen serösen und muzinösen Borderline-Neoplasien differenzieren. Es besteht berechtigter Grund zur Annahme, daß hier Unterschiede bestehen. So fanden Kaern und Mitarbeiter (1993b) bei muzinösen Neoplasien deutlich häufiger Aneuploidie (18 von 38 Fälle) als bei serösen Neoplasien (4 von 26 Fälle). Unter den Studien, die nicht histologisch differenzieren, gibt es auf der einen Seite solche, die einen Zusammenhang zwischen Prognose und DNA-Gehalt herstellen (Drescher et al, 1993), auf der anderen Seite jedoch auch Studien, die zum gegenteiligen Ergebnis kommen (Demirel et al, 1996). In keiner der wenigen Studien, die ausschließlich seröse Borderline-Tumoren untersuchten, konnte ein Zusammenhang zwischen Aneuploidie und Prognose oder anderen klinischen Parametern hergestellt werden (de Nictolis et al, 1992).

### 1.5.3 Chromosomale Aberrationen, Tumorsuppressorgene, Onkogene

Numerische chromosomale Aberrationen treten bei serösen Borderline-Tumoren am häufigsten bei den Chromosomen 6 und 7 auf. Seltener sind die Chromosome 1, 3 und X betroffen, wohingegen die Chromosomen 17 und 8 nur vereinzelt Aberrationen aufweisen (Diebold et al, 1996b).

Obwohl das Tumorsuppressorgen p53 bei den invasiven Karzinomen des Ovars in bis zu 80% in der mutierten Form nachweisbar ist (Kupryjanczyk et al, 1993), scheinen Mutationen dieses Gens bei den serösen Borderline-Neoplasien nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Chan et al, 2000; Fujita et al, 2003).

Auf der Proteinebene wurde in der Studie von Gershenson und Mitarbeitern (1999) in ca. 30% eine p53-Akkumulation gesehen und ein prognostischer Zusammenhang für fortgeschrittene SBOT beobachtet. Die Mehrheit der zu diesem Thema an SBOT durchgeführten Studien findet nur in Einzelfällen eine p53-Überexpression (Chan et al, 2000; Diebold et al, 1996d; Harlozinska et al, 1997).

Der Apoptose-Inhibitor Bcl-2 hingegen scheint bei Borderline-Tumoren und bei Adenomen deutlich häufiger exprimiert zu werden als dies bei den Karzinomen des Ovars der Fall ist (Chan et al, 2000).

Von der Gruppe der Protoonkogene sind für die SBOT vor allem das HER-2/neu sowie das K-RAS-Onkogen von Bedeutung. Bei den invasiven Karzinomen des Ovars ist in etwa einem Drittel der Fälle eine HER2/neu-Überexpression zu beobachten. Bei SBOT fanden Eltabbakh und Mitarbeiter (1997) in 8 von 25 Fällen (32%) und Haaften-Day und Mitarbeiter (1996) in 7 von 11 Fällen (63%) eine Überexpression dieses Wachstumsfaktorrezeptors.

Das Kirsten-RAS-Gen gehört zu den am besten untersuchten Protoonkogenen bei Neoplasien des Ovars. Verglichen mit den serösen Zystadenomen und den serösen Karzinomen tritt bei den serösen LMP-Tumoren eine Punktmutation dieses Gens mit 30% der Fälle am häufigsten auf. Dabei handelt es sich in 60% der Fälle um eine GGT nach GTT (Glycin zu Valin) Mutation und in etwa 26% um eine GGT nach GAT (Glycin zu Asparagin) Mutation. Wie beim Kolonkarzinom herrscht auch bei den SBOT allgemeine Übereinstimmung darüber, daß die RAS-Mutation wahrscheinlich zu den frühen Ereignissen in der Tumorentwicklung der SBOT gehört.

## 1.6 Das RAS-Onkogen

Im nachfolgenden soll näher auf die physiologische Rolle und pathologische Veränderungen des RAS-Gens eingegangen werden und vor allem seine Bedeutung für die Kanzerogenese beleuchtet werden.

### 1.6.1 Die RAS-Familie

Ursprünglich wurden die RAS-Onkogene (v-Ha-RAS, v-Ki-RAS) als tumorinduzierende Gene des Kirsten und Harvey Virus identifiziert, das bei Ratten Sarkome verursacht (Watzinger et al, 1999).

Weitere Forschung hat ergeben, daß eine nicht-tumorinduzierende Form jener RAS-Gene auch in menschlichen Zellen vorhanden ist und sich lediglich durch einen einzigen Basenaustausch von der onkogenen Form unterscheidet. Schließlich fand man noch ein weiteres Mitglied der RAS-Familie in Fibrosarkom- und Neuroblastom-Zelllinien, welches aber kein virales Gegenstück besitzt: das N-RAS Gen.

Alle drei RAS-Gene gleichen sich sowohl in der Struktur als auch in der Funktion. Sie bestehen aus vier codierenden Exons und unterscheiden sich beträchtlich in der Größe und Sequenz ihrer Introns. Lediglich das K-RAS Gen besitzt zwei verschiedene vierte Exons (K-RAS-A, K-RAS-B). Die entsprechenden Proteine unterscheiden sich am carboxyterminalen Ende um 25 Aminosäuren.

Bemerkenswert ist, wie sehr sich die Sequenz durch die Evolution hindurch konserviert hat. Die große Ähnlichkeit bei so verschiedenen Spezies wie Hefe und Menschen und die Tatsache, daß zumindest eines der vier RAS-Gene in sämtlichen menschlichen Geweben exprimiert wird, weist auf die wichtige Funktion des RAS-Gens im zellulären Stoffwechsel hin (Malumbres et al, 1998; Watzinger F. et al, 1999).

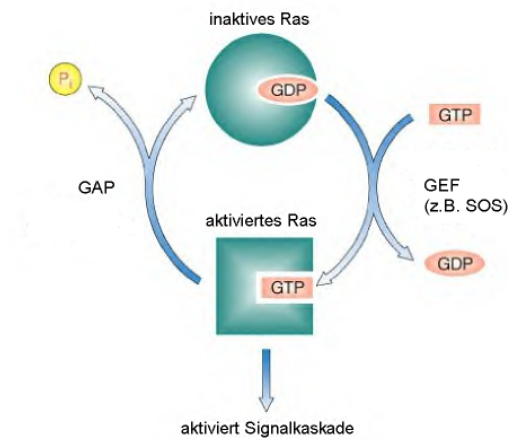
### 1.6.2 Das Ras-Protein

Die Protein-Produkte aller genannten RAS-Gene bestehen aus 188 (H-Ras, K-RasA, N-Ras) oder 189 (K-rasB) Aminosäuren und haben eine Größe von 21 kD (p21). Das Ras-Protein ist ein an der inneren Seite der Zellmembran lokalisiertes G-Protein, welches Signale von verschiedenen Rezeptoren (Tyrosinkinase-, T-Zell-, Zytokin-Rezeptoren) an das Zellinnere weitergibt und an der Proliferation, Differenzierung, Transformation und Apoptose von Zellen beteiligt ist. Je nachdem, ob ein GTP- oder ein GDP-Molekül gebunden ist, liegt es in seiner aktiven oder passiven Form vor. Des weiteren verfügt das Ras-Protein über eine geringfügige intrinsische GTPase-Aktivität ( $10^{-5} \text{ Mol s}^{-1}$ ) (Malumbres und Pellicer, 1998). Eine schnellere Hydrolyse, wie sie für eine effektive Signaltransduktion unabdingbar ist, wird über andere Faktoren geregelt. Daraus erklärt sich die Notwendigkeit von zwei unterschiedlichen Arten von Regulatoren.

Zum einen gibt es GAPs (GTPase aktivierende Proteine), die rasch zum inaktivierten GDP-gebundenen Zustand führen, und zum anderen gibt es aktivierende Faktoren, welche als GEFs bezeichnet werden (Guanin nukleotide Exchange Factors). Normalerweise befinden sich die meisten Ras-Proteine in der GDP gebundenen, inaktiven Form. Bei Aktivierung des Rezeptors wird GDP gegen GTP ausgetauscht. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, die es ihm ermöglicht, mit weiteren Effektor-Molekülen zu interagieren und so das Signal zu verstärken und weiterzuleiten (siehe Abb.1). Dabei beschränkt sich der



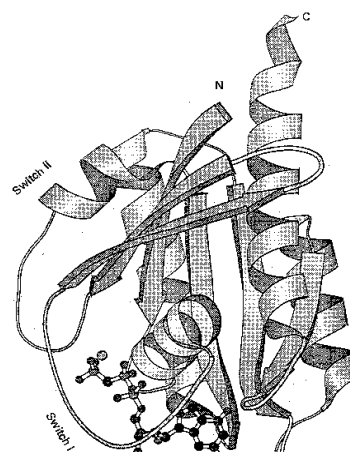
Hauptunterschied zwischen der GTP- und der GDP-gebundenen Form auf zwei Regionen, der sogenannten Switch I (Position 30-38) und Switch II (Position 60-76) Region. Beide Regionen liegen an der Außenseite nahe der GTP  $\gamma$ -phosphat-Gruppe und beinhalten hydrophile



**Abbildung 1: Schema des P21 Proteins in aktiviertem bzw. inaktiviertem Zustand**

Seitenketten. Je nachdem, ob nun GTP oder GDP gebunden ist, ändern sie ihre Konformation und sind somit für die Bindung von Regulator- und Effektor-Molekülen mitverantwortlich. Die Switch I Region interagiert mit GAPs und Proteinen, die das Signal in Richtung Zellkern weiterleiten, die Switch II Region hingegen mit GEFs (siehe Abb.2).

Die physiologische Aktivierung des Ras-Proteins soll nun am Beispiel des PDGF-Rezeptors (platelet derived growth factor) dargestellt werden (siehe Abb.3). Ist der Rezeptor durch einen passenden Liganden aktiviert, so bindet ein als GRB2 bezeichnetes Adapterprotein an die SH2-Domäne und rekrutiert einen GEF namens SOS (= engl. „son of sevenless“ bezeichnet nach einem verwandten Protein bei Drosophila). Dieses SOS-Protein bindet an das inaktive

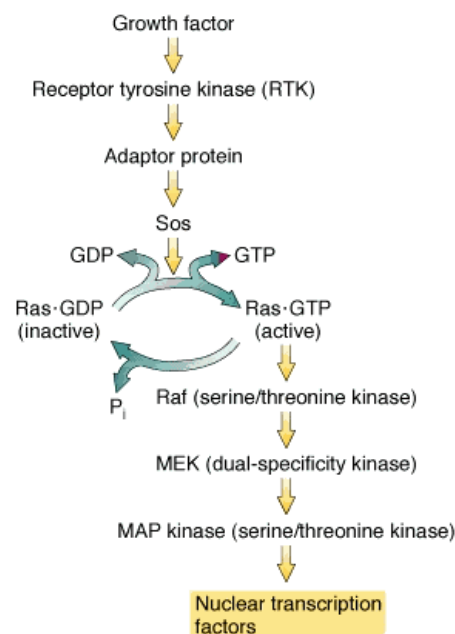


**Abbildung 2: Struktur des P21 Proteins**

Ras-Protein und führt zu einer Dissoziation des GDPs. Das GDP Molekül wird aufgrund des hohen intrazellulären GTP/GDP-Verhältnisses sofort durch GTP ersetzt. Damit ist das Ras-Protein aktiviert und SOS löst sich aus der Ras-Bindung. Nun aktiviert GTP-Ras eine als Raf

bezeichnete Proteinkinase, die ihrerseits nach MAPKK und MAPK-Aktivierung letztendlich über Transkriptionsfaktoren die Proliferation der Zelle induziert (Malumbres und Pellicer, 1998; Watzinger und Lion, 1999; Denhardt, 1996). Eine pathologische Aktivierung hingegen ist meist durch eine Punktmutation bedingt und lässt sich in etwa 30 % aller menschlichen Malignome nachweisen (Bos, 1989).

Prinzipiell kann solch eine onkogene Mutation zwei Folgen haben. Entweder wird dadurch die intrinsische GTPase-Aktivität vermindert und das Protein unempfindlich für GAPs gemacht (codon 12, 13, 59, 61, 63), was zu einem dauernd aktiven Ras-Protein in der Zelle führt oder



**Abbildung 3: Ras Signalkaskade am Beispiel des Tyrosinkinase Rezeptors**

das Protein wird durch die Mutation empfindlicher für GEFs (codon 16, 17, 116, 117, 119, 144, 146).

Eine weitere Möglichkeit zur Ras-Aktivierung ohne Punktmutation ist die Überexpression des RAS-Genes. Im Tiermodell konnte in Mäusen gezeigt werden, daß eine N-Ras-Überexpression zu Bildung von Tumoren führt (Mangues et al, 1992). In einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigten Orsulic und Kollegen (2002), wie mit Hilfe von gentechnisch veränderten ovariellen Deckepithel-Zellen in Mäusen ovarielle Tumoren, die morphologisch denen des Menschen ähneln, induziert werden konnten. Die transfizierten Zellen besaßen sowohl eine p53-Mutation als auch eine Ki-RAS- oder eine MYC-Mutation. Gleich ob die Zellen intraperitoneal, subkutan oder direkt an das Ovar appliziert wurden, es bildeten sich in jedem Experiment Karzinome des Ovars.

## 1.7 Ziel der Studie

Aufgrund des nur bruchstückhaften Verständnisses der Biologie seröser ovarieller Borderline-Tumoren herrscht nach wie vor große Unsicherheit bezüglich der optimalen Therapie, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien. Entscheidendes Problem bleibt die Abschätzung des malignen Potentials der Tumoren. Dies kann sowohl zur „Unter-“ als auch zur „Übertherapie“ führen. Wird es fälschlicherweise zu niedrig eingeschätzt, werden die Tumoren nicht aggressiv genug behandelt und man riskiert eine Progression der Krankheit. „Übertherapie“ läge vor, wenn es sich um eine völlig gutartige Krankheit handelte, die z.B. aggressiv mit Chemotherapie angegangen würde. In diesem Fall würden die Patientinnen unnötigerweise den Risiken der Operation und einer postoperativen Chemotherapie mit resultierender Unfruchtbarkeit und z.B. dem Risiko von Sekundärmalignomen ausgesetzt (Linket et al, 1996; Menzinet al, 2000; Trope und Kaern, 1998).

Vor allem die Therapie für Patienten mit extraovariellen Läsionen von serösen Borderline-Tumoren ist Thema einer intensiven Diskussion (Sutton et al, 1991). Nicht invasive Implantate sprechen kaum auf eine konventionelle Chemotherapie an. Es scheint sich dabei um relativ indolente Läsionen zu handeln, die auch ohne therapeutische Intervention für lange Zeit stabil bleiben können. Im Gegensatz dazu werden invasive Implantate wie fortgeschrittene Ovarialkarzinome mit peritonealen Metastasen behandelt.

Die Genese und Pathobiologie extraovarieller Läsionen von serösen Borderline-Tumoren ist bis heute ungeklärt. Einige Autoren sehen darin unabhängige Herde als Ausdruck einer multifokalen serösen Epithelproliferationen (Kadar und Krumerman, 1995).

Andere bevorzugen die Theorie, daß diese extraovariellen Herde das Ergebnis einer metastasenartigen Streuung des ovariellen Tumors sind (Moore et al, 2000).

In der Vergangenheit war die molekulare Analyse extraovarieller Herde von SBOT aufgrund ihrer kleinen Größe und Lokalisation und der damit verbundenen Schwierigkeiten in der Isolierung praktisch unmöglich. Fortschritte in der Laser-assistierten Mikrodissektion machten es möglich, diese Hindernisse zu umgehen. Mit Hilfe dieser Technologie konnten Studien anhand des X-chromosomalen Inaktivierungs-Musters Argumente für eine multifokale Entwicklung zumindest einiger fortgeschrittener Borderline-Tumoren finden (Gu et al, 2001; Lu et al, 1998).

Ausgangspunkt der hier vorgelegten Studie ist die Annahme, daß die Analyse des K-RAS-Mutations-Status die Frage weiter klären könnte, in welchem Zusammenhang die ovariellen und extraovariellen Läsionen von SBOT stehen. Kürzlich berichteten Alvarez und Kollegen über K-RAS-Mutationen in Müller-Inklusionszysten, die mit SBOT assoziiert sind (Alvarez et al, 2001). In zwei von drei Fällen wurden identische Mutationen gefunden. Um einen

umfassenden und detaillierteren Einblick in den Mutations-Status von fortgeschrittenen Borderline-Tumoren gewinnen zu können, wurden in unserer Studie multiple Proben von 40 mikrodisssezierten extraovariellen Läsionen und 8 kontralateralen Tumoren von insgesamt 10 serösen Borderline-Tumoren untersucht. Vier dieser zehn SBOT sind in einer vorrausgehenden Studie analysiert worden, die den K-RAS-Mutations-Status in benignen, Borderline- und malignen serösen Ovar-Tumoren untersuchte (Haas et al, 1999a). In der aktuellen Studie fanden wir Hinweise dafür, daß bilaterale und fortgeschrittene LMP-Tumoren mit K-RAS-Mutationen identische Mutationen in allen kontralateralen Tumoren und einer Großzahl der extraovariellen Läsionen aufweisen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Charakterisierung der Patientinnen

Untersucht wurde archiviertes, formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe von 10 Patientinnen mit serösen Borderline-Tumoren, die zusätzlich noch mindestens einen zweiten Herd, entweder kontralateral oder extraovariell (im Sinne einer Endosalpingiose oder eines Implantates) aufwiesen. Gewebeproben wurden aus den inneren weiblichen Geschlechtsorganen, dem pelvinen Peritoneum, pelvinen Lymphknoten, dem Dickdarm und dem Dünndarm, sowie dem pelvinen Omentum entnommen. Vier von diesen Tumoren wurden bereits in einer früheren Studie auf RAS-Mutationen hin untersucht. Vier weitere wurden in die Studie eingeschlossen, nachdem eine RAS-Mutation im Ovar nachgewiesen werden konnte, und zwei weitere Fälle ohne RAS-Mutation wurden als Kontroll-Fälle herangezogen. Die histologische Klassifizierung wurde nach den Kriterien der WHO durchgeführt, die Stadieneinteilung entsprach gemäß der FIGO-Einteilung bei drei Fällen FIGO I (Nummer. 123, 302, 321), bei drei Fällen FIGO II (Nummer 320, 322, 324) sowie bei vier Fällen FIGO III (Nummer 107, 127, 304, 323). Insgesamt konnten aus 58 Läsionen 97 Gewebeproben gewonnen und untersucht werden, die sich wie folgt zusammensetzten:

10 LMP-Tumoren:	35 Gewebeproben
8 Kontralaterale Tumoren:	19 Gewebeproben
25 Implantate:	28 Gewebeproben
15 Endosalpingiose:	15 Gewebeproben

---

58 Läsionen: 97 Gewebeproben

#### **Tabelle 2: Aufstellung der untersuchten Gewebeproben**

Sämtliche Patientinnen wurden in der Frauenklinik des Klinikum Großhaderns in der Zeit von 1983 bis 2000 operiert. Im Durchschnitt waren die Patientinnen 46,3 Jahre alt. Die zum Zeitpunkt der Operation jüngste Patientin war 26 Jahre, die älteste 78 Jahre alt.

## 2.2 Methoden

Nachfolgend soll auf den Versuchsablauf im ganzen eingegangen werden, um anschließend die Prinzipien der verwendeten Techniken zu erklären, bevor am Schluß dieses Kapitels die verwendeten Protokolle sowie die benützten Materialien im einzelnen beschrieben werden.

### 2.2.1 Versuchsablauf

Nach Vorbereitung der Objektträger für die Mikrodissektion sowie nach Entparaffinierung und Färbung des Schnittes wurden pro Schnitt mittels Laser-Mikrodissektion zwischen einer und sieben Proben gewonnen. Zusätzlich wurden für jeden Fall zwei Proben mit Normalgewebe als Negativkontrolle isoliert (meist Stroma-Gewebe in der Nähe einer Läsion). Bei technischem Ausfall einer Probe wurde die Mikrodissektion einmal wiederholt. Nach dem Verdau, der DNA-Isolierung und –Konzentrierung folgte zunächst die PCR mit GC-Primern für Codon 12 und 13 des Exon 1 des RAS-Gens. Die Produkte der PCR wurden mit einer Agarosegel-Elektrophorese verifiziert. Es folgte die DGGE zum K-RAS-Mutations-Screening. Zum Ausschluß von Artefakten wurden PCR und DGGE mindestens einmal wiederholt. Alle in der DGGE verifizierten, positiven Resultate wurden auf die Art der Punktmutation hin mittels direkter Sequenzierung von Codon 12 des Exon 1 untersucht. Für jede Probe wurde eine up- und down-Sequenz bestimmt.

### 2.2.2 Prinzip der Laser-Mikrodissektion

Die Anwendung dieser von der Firma P.A.L.M.(Bernried, Deutschland) entwickelten Technik war die Voraussetzung für die Durchführbarkeit dieser Studie. Es war erforderlich, einzelne Zellpopulationen, die von gesundem Gewebe umgeben waren, isolieren zu können. Wir benutzten das Robot Microbeam System von P.A.L.M zusammen mit Polyethylen beschichteten Objektträgern. Die Anordnung der Geräte ist aus Abbildung 4 ersichtlich.

Ein Mikroskop überträgt eine vergrößerte Aufnahme des histologischen Schnittes mit Hilfe einer digitalen Kamera an den Computer. An dieses Mikroskop ist ebenfalls der Laser angeschlossen. Bei aktivierten Laser kann nun über Bildschirmkontrolle das gewünschte Gewebeareal umfahren und so herausgelöst werden (siehe Abb.5). Dies bietet zwei Vorteile, Zum einen minimiert die „no touch“ Technik das Risiko einer Kontamination, zum anderen wird durch den Laser das Gewebe direkt ionisiert, ohne daß es dabei zu einer Wärmeentwicklung kommt und somit das Risiko für einen dadurch bedingten Schaden der Zellen ebenfalls abnimmt. Mit Hilfe eines Roboter Armes wird daraufhin ein sauberer, mit einem Tropfen Puffer benetzter, Tube-Deckel wenige Millimeter oberhalb des Objektträgers, im Fokus des

Mikroskops in Position gebracht. Nach Defokussieren des Lasers wird die herausgelöste Gewebeprobe mit maximaler Laserenergie durch eine Photonen-Wolke in das Reaktionsgefäß katapultiert und ist nun der weiteren Analytik zugänglich (siehe Abb. 6). Es ist mit dieser Methode z.B. möglich aus Metaphasen-Zellkernen einzelne Chromosome zu isolieren. In unserer Studie wurde mit Paraffin-Material gearbeitet und es wurden pro Probe mindestens 20-40 Zellen isoliert.



Abbildung 4: Mikroskop, Laser und Computer von der Firma P.A.L.M. wie in dieser Studie benutzt

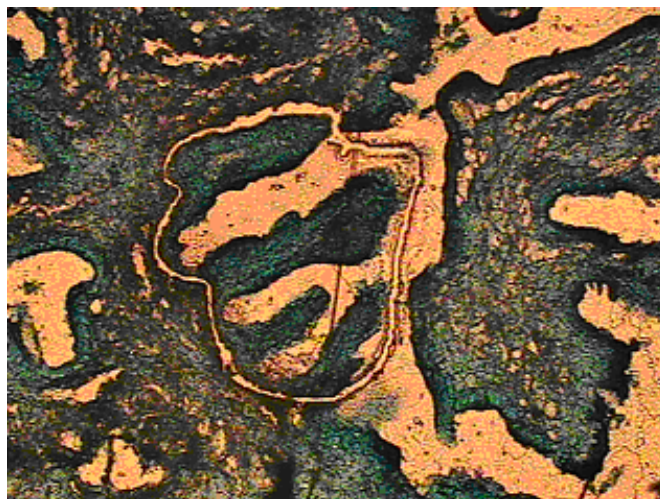


Abbildung 5: herausgelöstes, mikrodissiziertes Epithel eines serösen Borderline Tumors

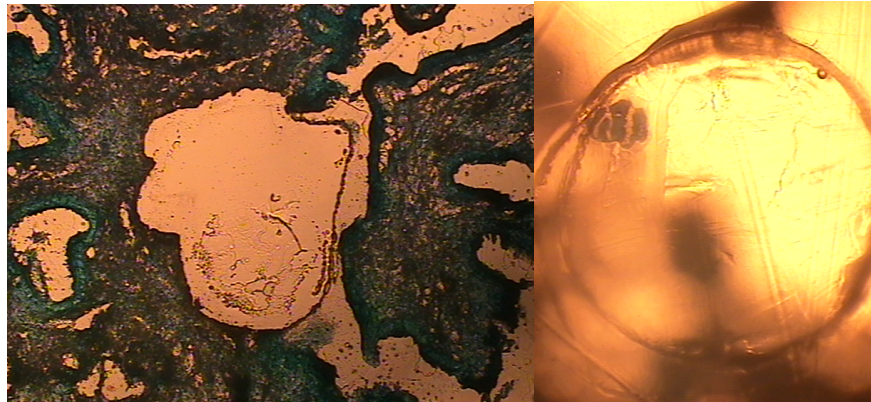


Abbildung 6: links: Areal nach Katapultieren, rechts: mikrodissiziertes Areal im Tube-Deckel (links oben)

### 2.2.3 Die PCR

Die Polymerasen-Ketten-Reaktion, kurz PCR, dient zur Vervielfältigung (Amplifikation) spezifischer DNA Abschnitte. In der vorliegenden Studie wurden damit die geringen DNA Mengen, die mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion aus Paraffinmaterial gewonnen wurden, amplifiziert, um anschließend die eigentlichen Mutationsanalysen durchführen zu können. Das Prinzip dieser Technik wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt, 1990 veröffentlicht und drei Jahre später mit dem Nobel-Preis gewürdigt (Mullis, 1990).

Diese Methode besteht aus drei wesentlichen Schritten:

Im ersten Schritt wird die DNA auf ca. 95 Grad Celsius erhitzt, was die Doppelhelix trennt, sowie sämtliche enzymatische Reaktionen stoppt (Denaturierung). Daraufhin wird das Reaktionsgemisch auf ca. 40-60 Grad abgekühlt (Annealing). Hierbei bilden sich Ionenbindungen zwischen den Primern und der DNA, aus. Nun kann ein Enzym (Polymerase) an diesem kleinen Stückchen doppelsträngiger DNA andocken und beginnen, den komplementären Strang mit Hilfe der im Reaktionsgemisch vorhandenen Nukleotide (dNTP) zu bilden. Sobald ein paar Basen von der Polymerase synthetisiert wurden, bleibt die Ionenbindung stabil und bricht nicht mehr auf.

Beim dritten Schritt (Extension) wird die optimale Arbeitstemperatur der Polymerase (c.a.72°C) erreicht. Nicht exakte Primer-Bindungen werden bei dieser höheren Temperatur wieder gelöst, die stabilen hingegen werden bis zur Komplementierung des fehlenden DNA-Stranges weiter verlängert. Nun ist ein Zyklus abgeschlossen und kann sooft wiederholt werden, bis die gewünschte Menge an Kopien vorliegt. Da das Material bei jedem Zyklus verdoppelt wird, ergibt sich ein exponentielles Wachstum. Die genaue Anzahl der vorliegenden Kopien lässt sich nach der Gleichung  $(2^n - 2n) \cdot x$  berechnen. Hierbei steht n für die Anzahl der Zyklen und x für die Anzahl der ursprünglich vorhandenen Kopien der Matrize.



### 2.2.4 Die Denaturierende Gradienten Gel-Elektrophorese (DGGE)

Die DGGE ist ein gut etabliertes Screening Verfahren zum Aufspüren von Punktmutationen. Erstmals wurde die Methode von Fischer und Lerman (1983) beschrieben und sie ist seitdem ständig verbessert und ausgebaut worden.

Der erste Schritt besteht aus einer PCR mit einer GC Klammer am 3'-Ende. Die mit Hilfe der PCR gewonnenen Amplifikate werden auf ein Polyacrylamidgel mit eingegossenem, denaturierendem Gradienten (meist Harnstoff oder/und Formamid) aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Dabei passiert folgendes:

Exponiert man doppelsträngige DNA einem physikalischen, denaturierendem Gradienten so bricht diese mit zunehmenden Gradienten nicht kontinuierlich, ähnlich einem Reißverschluss, sondern subsequent, in einzelnen Etappen auf. Damit das doppelsträngige Amplikon überhaupt in Etappen denaturieren kann und nicht völlig in zwei Einzelstränge auseinanderbricht, benötigt man die GC-Klammer. Diese "Etappen" werden als Schmelzdomänen bezeichnet. Wann eine Domäne denaturiert hängt, abgesehen von der Konzentration des denaturierenden Agens, auch von der spezifischen Basenabfolge ab. In einem Polyacrylamidgel wandert ein teilweise aufgebrochenes DNA Molekül langsamer als ein intaktes. Eine Punktmutation führt zur Änderung der Schmelzeigenschaften der entsprechenden Domäne, das heißt, sie denaturiert bei einer anderen Konzentration als der Wildtyp, was sich durch die unterschiedliche Laufeigenschaften zeigt. Ob bei der interessierenden Probe nun eine Mutation vorliegt oder nicht, läßt sich durch den direkten Vergleich der Banden von Wildtyp DNA und Probe feststellen (siehe Abb. 7 und 8):

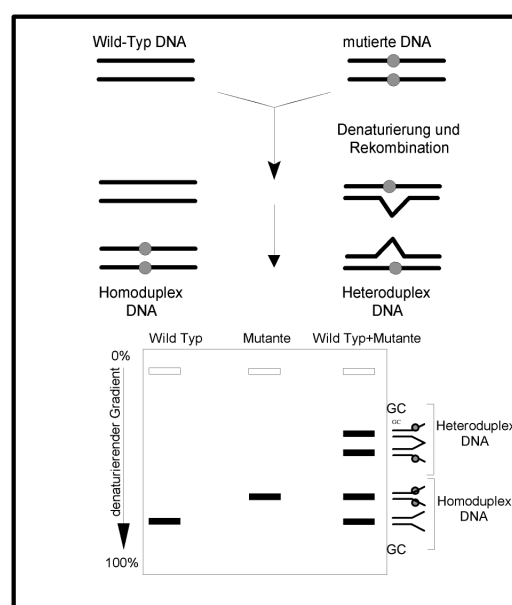
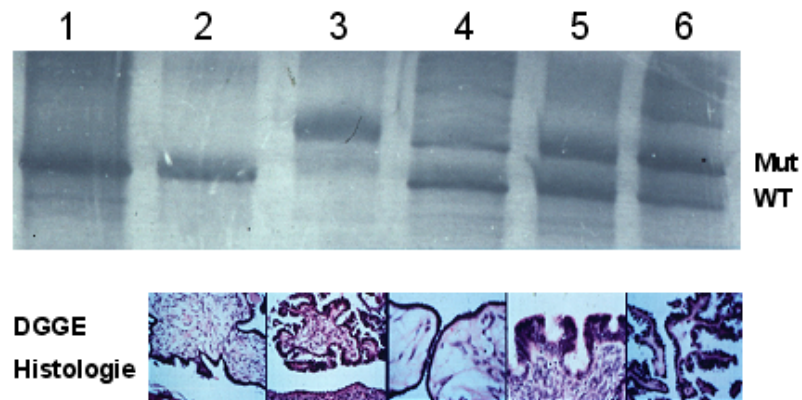


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Laufverhaltens mutierter und nicht mutierter DNA in der DGGE (modifiziert nach BioRad (1983))



**Abbildung 8:** Beispiel einer DGGE in Korrelation zur Histologie von Fall 302. In Bahn Nummer 1 läuft die Kontrolle mit Normalgewebe, Bahn 3 bis fünf zeigen eine Mutation des Ki-RAS Gens. Die Sequenzierung dieser Proben erbrachte eine GGT • GTT Mutation.

**Histologie:** Bahn zwei und drei zeigen Anteile eines oberflächlichen LMP-Tumors des linken Ovars. Bahn vier bis sechs zeigen zystische Anteile des LMP-Tumors des rechten Ovars

Die hier verwendete Vorgehensweise deckt sich im wesentlichen mit der in der Vorgängerstudie verwendeten Methode (Haas et al, 1999a). Die Primer-Sequenzen für die DGGE PCR sind bei Imai und Kollegen (1994) beschrieben und im Anhang aufgeführt.

### 2.2.5 Das Sequenzieren

Das Sequenzieren war in dieser Studie aus zwei Gründen erforderlich. Zum einen mußte die in der DGGE festgestellte Mutation bestätigt werden. Zum anderen war es erforderlich die genaue Art der Mutation festzustellen. Nur so ließ sich ein Zusammenhang zwischen den Läsionen und den ovariellen Tumoren herstellen bzw. ausschließen. Das Sequenzieren wird heutzutage im allgemeinen mit Hilfe von Automaten durchgeführt und läuft in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt wird der entsprechende DNA-Abschnitt vervielfältigt und fluoreszenzmarkiert. Im zweiten Arbeitsschritt wird die Sequenz automatisiert eingelesen und ausgewertet.

## 2.2.5.1 Zyklische Sequenzierung

Diese Technik entspricht einer modifizierten PCR und unterscheidet sich von dieser durch das Einsetzen von nur einem Primer, sowie neben den üblichen dNTPs, durch die zusätzliche Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden. Das Benützen eines einzelnen Primers führt zu einer linearen Vermehrung des DNA Stranges (siehe Abb 9). Immer wenn ein markiertes Nukleotid eingebaut wird, bricht die Polymerase die Kettenverlängerung ab. Auf diese Weise entstehen im Laufe mehrerer Zyklen unterschiedlich lange Kopien eines DNA Stranges, die an ihrem Synthese Ende (3'Ende) ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid tragen. In dieser Studie wurden für die PCR Reaktion die gleichen Primer benutzt, wie sie bei Sarkar und Kollegen (1995) beschrieben wurden (Sequenz siehe Anhang).

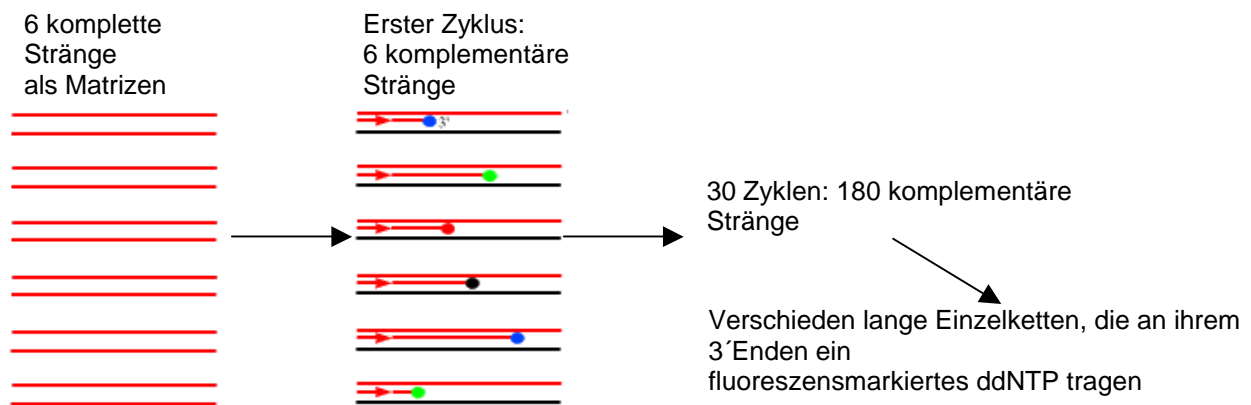


Abbildung 9: Lineare Amplifikation während einer zyklischen Sequenzierung.

## 2.2.5.2 Automatisierte DNA-Sequenzierung

Mit Hilfe eines Systems bestehend aus einer Elektrophorese-Einheit, einem Laser, einer Detektions-Kamera sowie einem zur Datenauswertung angeschlossenen Computer lässt sich die spezifische Basenfolge ermitteln. Mit Hilfe der Elektrophorese werden die markierten Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei laufen die kleinsten Fragmente am schnellsten. Ein Laser tastet laufend das "untere" Ende der Elektrophorese-Einheit ab und bringt die markierten Nukleotide zum Fluoreszieren. Dies wird von einer speziellen Kamera erfasst und digital an den Computer weitergeleitet. Wenn die größten Fragmente den Laserstrahl passiert haben, ist die Sequenz eingelesen, und die Signale werden vom Computer in auswertbare Daten übersetzt (siehe Abb. 10 und 11)

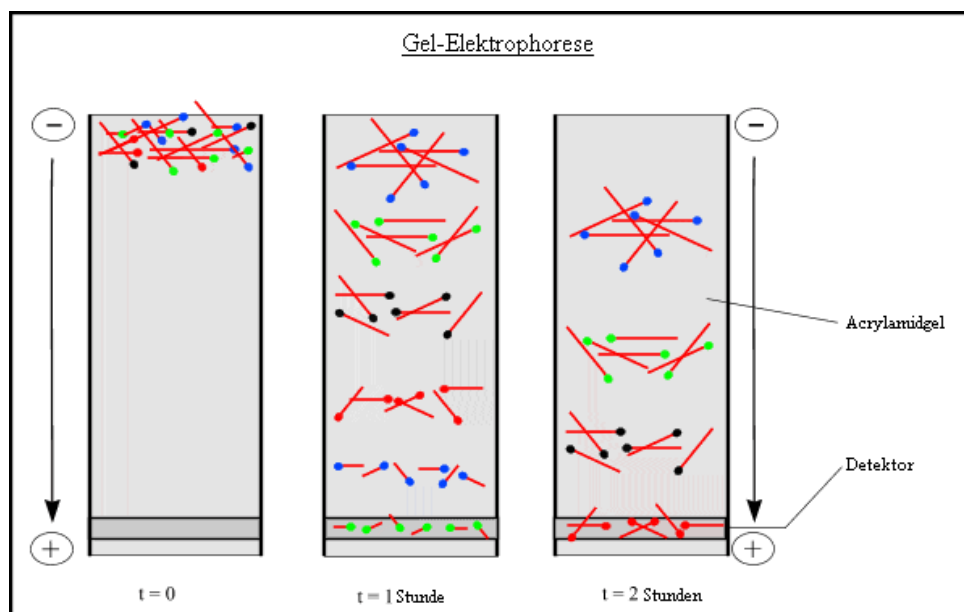


Abbildung 10: Automatisierte, elektrophoretische Auftrennung und Ablesung der Sequenz

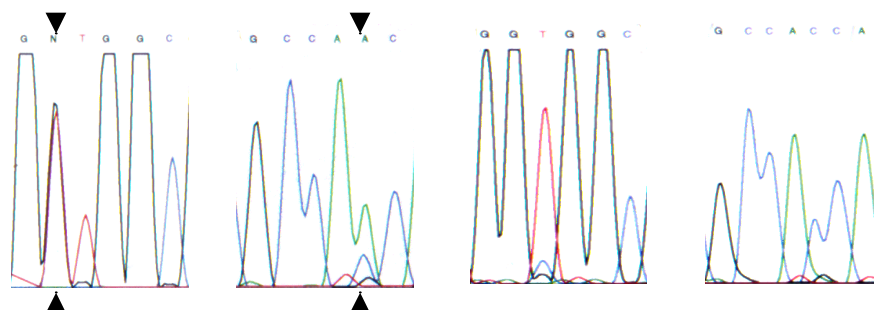


Abbildung 11: up und down Sequenz einer GGT nach GTT Mutation in Fall 304 1 (links), zum Vergleich Normalgewebe vom selben Fall (rechts)

## 2.3 Protokolle

### 2.3.1 Vorbereitung der Objektträger zur Laser-Mikrodissektion

1. Membran Applikation
  - Folie in ca. 2x4 cm große Stücke schneiden
  - Objektträger in 95% Ethanol tauchen über Folienstück halten, Folie haftet über Elektrostetik an OT
  - Fixieren mittels Nagellack
2. Poly-L-lysine Auftrag
  - 5 Tropfen 1% Poly-L-lysin auf Objektträger mit Pinsel auf der Folie verteilen, trocknen
3. Gewebeschnitte (ca. 6-8 • m dick) aufziehen
  - Trocknen bei 40-50°C (12 h)

### 2.3.2 Entparaffinierung und Methylgrünfärbung

1. Entparaffinierung
  - 2 mal 15 min Xylol
  - 2 mal 5 min abs. Alkohol, dann mit 94% und mit 70%
2. Methylgrün
  - 1 min färben, dann 3 mal gründlich spülen in Aqua dest.
3. aufsteigende Alkoholreihe
  - 10 Sekunden 70% Alkohol, 10 Sekunden 96% Alkohol
  - Lufttrocknen, Mikrodissektion

### 2.3.3 Laser-Mikrodissektion

1. Vorbereitungen
  - P.A.L.M. Tubes (Handschuhe, Pinzette!) entnehmen, Deckel und Tubes beschriften, 200 • l TL-Puffer (E.N.Z.A. Kit) dazu pipettieren und mit sauberer Schere Deckel abschneiden
  - Objektträger einspannen, Kontrolle, ob Mikromanipulator parallel zum Mikroskopiertisch
2. Mikrodissektion
  - Gerät anschalten, mittels Okular durch Vergleich mit HE-Schnitt gewünschte Areale suchen und speichern
  - Binokel-Schutzklappe schließen, Laser-Energie und Fokus je nach benutztem Objektiv (Liste am Gerät) einstellen
  - Jedes Areal ansteuern, unter Bildschirmkontrolle Areal mit aktiviertem Laser umfahren, bis Gewebe ganz herausgelöst, Bild speichern
3. Katapultieren
  - Einen • l TL-Puffer in Tube-Deckel pipettieren, Deckel in Mikromanipulator einlegen, Mikromanipulator unter Sichtkontrolle positionieren
  - Mikroskop defokussieren, mittels Laser-Energie Areal in Tube katapultieren, Bild speichern
  - Mikroskop auf Tube-Deckel fokussieren, Kontrolle, ob Gewebe im Deckel

4. Zentrifugieren

- Proben 30 sec bei 10000 rpm zentrifugieren, 25 •l Prot K zugeben
- bei 55 C/450rpm im Thermomixer inkubieren (12h)

2.3.4 DNA Extraktion mittels E.Z.N.A. Tissue Kit II

Das Kit-System wurde ohne Modifikation nach den Angaben des Herstellers benutzt

## 2.3.5 DGGE

## 2.3.5.1 DGGE-PCR

1. GC-Primer nach (Imai et al, 1994):

c-K-RAS Kodon 12 sense Primer:

5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCGTCTGAATATAAACTTGTGG-3'

antisense Primer:

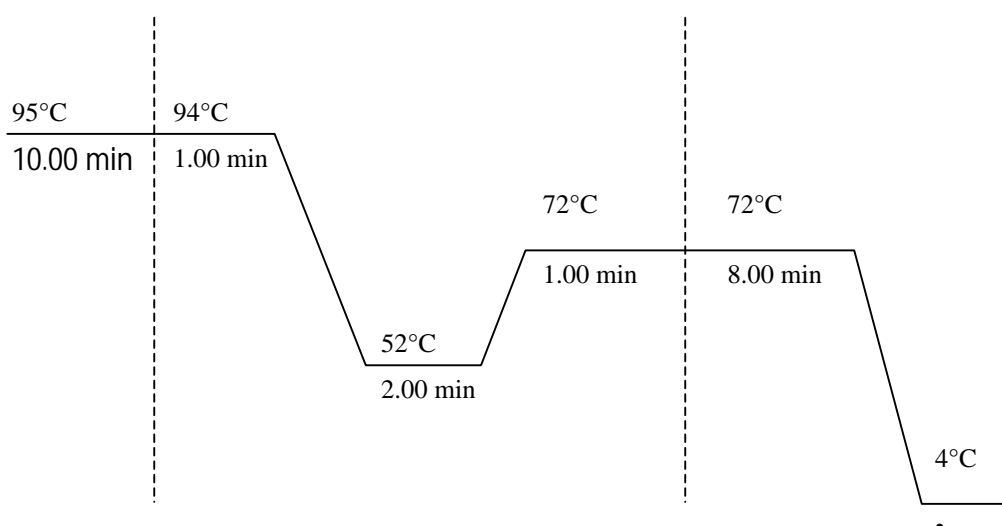
5'-CTATTGTTGGTCATATTCG-3'

2. PCR-Ansatz:

20•l-Ansatz:		entspricht einer Konzentration von:	
10x buffer	2.0 •l	Tris HCl	10 mM(PH8.3), 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub>	1.6 •l	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTP-Mix	0.2 •l	für jedes dNTP	200 •M
Primer 1	0.4 •	Primer 1	0.4 pmol/•l
Primer 2	0.4 •l	Primer 2	0.4 pmol/•l
AmpliTaqGold	0.1 •l	AmpliTaqGold	0.025 U/•l
DNA-Template	0.2-0.5 •l	Template	20-40 •g
H <sub>2</sub> O	ad 20 •l		

3.PCR-Bedingungen:

45 Zyklen



4. Gießen von 4% Agarose-Gelen (25 ml)

- 1 g Agarose auf 50 ml 1xTAE Puffer
- Gemisch 1 min in Mikrowelle bei max Leistung, Lösung kurz abkühlen lassen, gießen

5. Agarosegel-Elektrophorese

- 420ml 1xTAE Laufpuffer
- 50 Standart BP-Ladder mit Ladepuffer versetzen
- 4 •l PCR-Produkt mit 1 •l Ladepuffer, Gel laden
- 30 Minuten, 100V laufen lassen
- Gel 10 Min in Ethidiumbromid färben
- Unter UV-Licht photographieren

2.3.5.2 DGGE-Protokol

1. Vorbereitungen

- Laufpuffer 7l 1xTAE auf 60°C vorheizen
- Gelplatten und Spacer mit Methanol reinigen, in Klemmen einspannen, mit der dafür vorgesehenen Bio-Rad-Karte ausrichten
- Gel je nach Konzentration laut Tabelle (siehe Anhang) vorbereiten
- 60 •l APS und 10 •l TEMED zugeben, kurz mischen
- rasch und gleichmäßig das Gel gießen
- Gel in der Gießstation auspolymerisieren lassen (45-60 min)

2. Gellauf

- Gel auf 60°C vorheizen
- Proben 1:2 mit Ladepuffer versetzen
- Geltaschen 2x mit Puffer ausspülen, Proben auftragen
- Bei 150 Volt über 4 Stunden laufen lassen

3. Silberfärbung

- Gel in Färbewanne überführen
- 3-5 min Fixierlösung, 6 Min Färbelösung
- Entwickler + 1/1000 Formaldehyd zugeben bis Banden sichtbar werden
- 5 min Fixierlösung
- 10 min H<sub>2</sub>O waschen, archivieren

2.3.6 DNA-Sequenzierung

2.3.6.1 PCR

1. Primer nach: Sarkar und Mitarbeitern (1995)

sense Primer:

5'-ATGACTGAATATAAACTTGT-3'



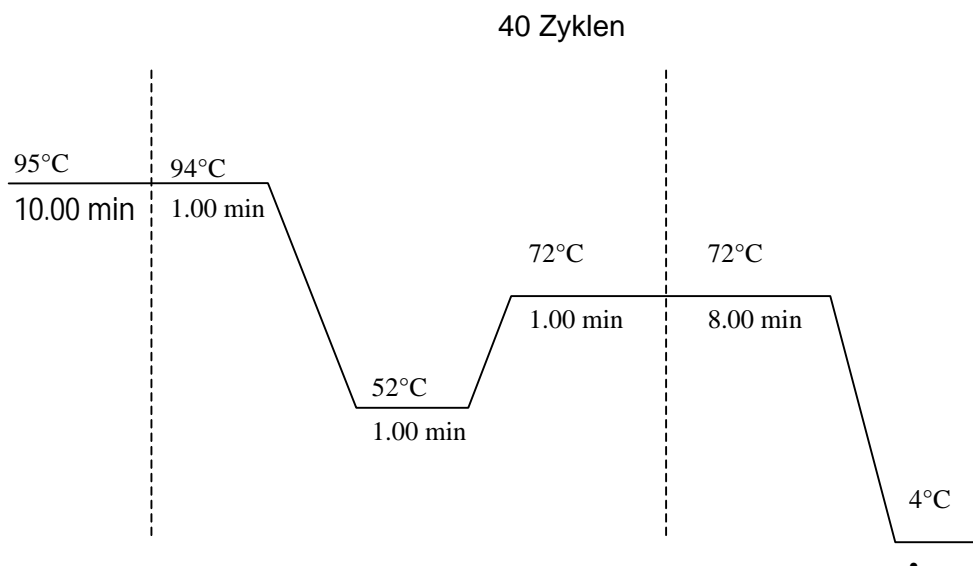
antisense Primer

5'-CTCTATTGTTGGATCATATT-3'

## 2. K-RAS PCR Ansatz

100•l-Ansatz:		entspricht einer Konzentration von:	
10x buffer	10.0 • l	Tris HCl	10 mM(PH8.3), 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub>	8 • l	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTP-Mix	0.2 • l	für jedes dNTP	200 • M
Primer 1	2.0 •	Primer 1	0.4 pmol/• l
Primer 2	2.0 • l	Primer 2	0.4 pmol/• l
AmpliTaqGold	0.5 • l	AmpliTaqGold	0.025 U/• l
DNA-Template	0.5-0.1 • l	Template	40-80 • g
H <sub>2</sub> O	ad 100 • l		

## 3. PCR – Bedingungen



4. Agarosegel-Elektrophorese (siehe 4. und 5. unter 2.3.5.1)

5. Aufreinigung mit QIA quick Purifikation Kit, nach den Angaben des Herstellers

6. DNA-Konzentrierung mittels Microcon nach den Angaben des Herstellers

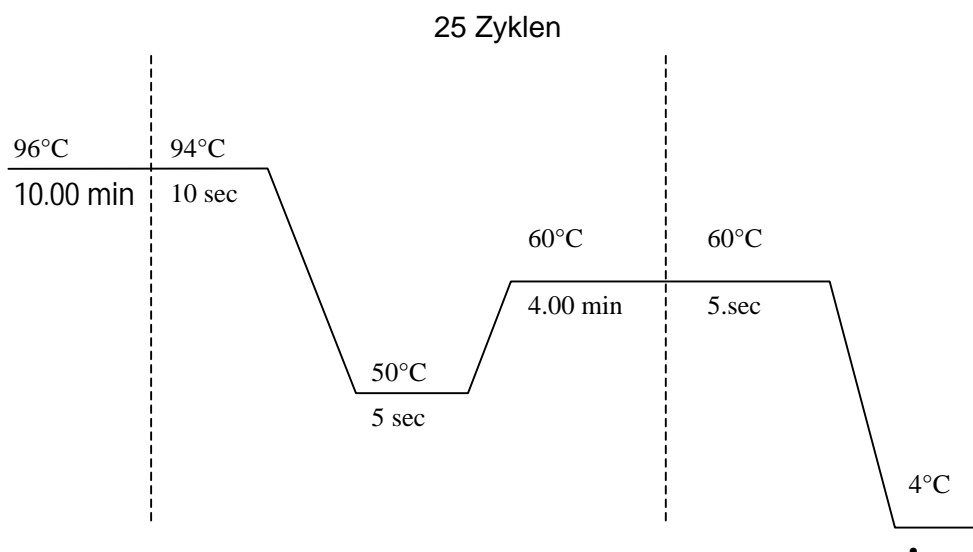
## 2.3.6.2 Cycle-Sequenzierung-PCR

1. Primer siehe 2.3.6.1

2. PCR-Ansatz:

10 • l Ansatz		entspricht einer Konzentration von:	
TRM	2.0 • l	DNA	20-30 ng
DNA	5,5 • l	Primer(up/down)	3.2 pmol
Primer(up oder down)	2.5 • l		

3. PCR-Bedingungen



4. Aufreinigung der Sequenzierreaktion mittels Centrie-Sep nach den Angaben des Herstellers

5. Sequenzierung auf ABI PRISM 310 nach den Angaben des Herstellers

## 2.4 Lösungen

### 2.4.1 PCR Gellauf

20x TAE	Trisbase	96.80 g
	Essigsäure	23 ml
	0.5m EDTA pH 8	40 ml
	Aquabidest.	Ad 1000ml
Ethidiumbromid	Aqua bidest	300 ml
	Ethidiumbrmoid	300 • l

### 2.4.2 DGGE

50x TAE	Trisbase	242 g
	Essigsäure	57.1g
	0.5m EDTA pH 8	100 ml
	Aqua bidest	ad 1000ml
Ladepuffer 2x	Bromphenolblau	0.25 ml(0.05%)
	Xylen-Cyanol	0.25 ml(0.05%)
	Glycerol 100%7 ml(70%)	
	Aqua bidest	ad 10 ml

Fixierlösung (10% Ethanol, 0.5% Eisessig)

Ethanol	100 ml
Eisessig	5 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

Färbelösung (10% Ethanol, 0.5% Eisessig, 0.2%AgNO<sub>3</sub>)

Ethanol	100 ml
Eisessig	5 ml
Silbernitrat	2 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

Entwickler(3%NaOH, 0.1 HCOH)

NaOH	30 g
Aqua bidest	1000 ml
Frisch zugeben (37%) Formaldehyd	1/1000

Denat. Lösung	10%	20%	40%	60%	80%
Harnstoff	0.4g	0.8g	1.6g	2.4g	3.2g
Formamid	4ml	8ml	20ml	28ml	36ml
50 x TAE-Puffer	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
40% Acrylamid/bis	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Aqua ad 10ml	ad 10ml	ad 10ml	ad 10ml	ad 10ml	ad 10ml

Tabelle 3: Acrylamid/Bis Lösungen mit denaturierendem Agens

## 10% Ammoniumpersulfat

0.05g APS

500•l Aqua bidest.

## Deionisiertes Formamid

Deionisierungsharz 50mg

Formamid 1ml

1h schütteln lassen, Harz entfernen, bei -80°C lagern

6-7ml Aliquots herstellen

## 2.5 Chemikalien

Acrylamid/Bis	Biorad, München	1610148(500ml)
Agarose	Biozym, Oldendorf	840004(500g)
Ammoniumpersulfat	Sigma, München,	A9164-25G(25g)
Ampli Taq Gold-Polymerase	Perkin Elmer, Norwalk, USA	N8080241
50 Base-Pair Ladder	Amersham, Freiburg	27400501
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt	111746
DNA Sequencing Polymer	Perkin Elmer, Norwalk, USA	402091(25ml)
EDTA	Sigma, München,	E5134-500G(500g)
Essigsäure(100%)	Merck, Darmstadt	1.0063.2500(2,5l)
Ethanol	Merck, Darmstadt,	1.00983.2500(2.5l)
Formaldehyd	Sigma, München,	F1635-25ML(25ml)
Formamid	Merck, Darmstadt	1.9684.1000(1l)
Genetic Analyser Buffer	Perkin Elmer, Norwalk, USA	401884
Glycerol 100%	Sigma, München,	G6279
Harnstoff	Sigma, München,	U270-9(500g)
Magnesiumchlorid	Perkin Elmer	N8080241
Methanol	Merck, Darmstadt	1.6009.1000(1l)
Methylgrün	Merck, Darmstadt	115944
Nagellack(long lasting)	Jade, Deutschland	
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt	1.06469.1000(1kg)
Poly-L-Lysin Lösung	Sigma, München,	P9416-(100ml)
Proteinase K	Sigma, München,	P6556
Reaction Buffer(10x)	PerkinElme, Norwalk, USA r	N8080241 Kit
Silbernitrat	Merck, Darmstadt	101510(250g)
TEMED	Merck, Darmstadt,	110732
Trisbase	Sigma, München,	T1503(1kg)
TRM-Mix	Perkin Elmer, Norwalk, USA	402080
Xylol	Merck, Darmstadt	1.08685.2500(2.5l)

## 2.6. Verwendete Kit-Systeme

QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen	28104
Microconcentrators, Amicom	Milipore	42410
Centrisep Spincolumns	Perkin Elmer	401762
E.N.Z.A. Tissue Kit II	Peqlab, München	12-3496-02

## 2.7 Geräte

Brutschrank	Heraeus Hannau	T5042E
DGGE-Apparatur	DCode Universal	Biorad, München
Gelkammer	Mupid-21	Cosmo Bio Co. LTD, Japan(Tokyo)
Mikrodissektion	Robot-Microbeam	P.A.L.M, Bernried
Sequenzierer	ABI 310	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Speedvac	DNA110	SAVANT, Farmingdale, USA
Thermocycler	Primus	MWG Biotech, Ebersberg
Thermocycler	TC2400	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Thermocycler	TC480	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Vortex Genie2	Bender & Hohbein Ag, Zürich
Waage mg/g	P1200N	Mettler, Giessen
Waage • g	BL150	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge	Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

## 2.8 Verbrauchsmaterialien

Pipetten	P2-P1000	Gilson, Bad Camberg
Filterspitzen	Safeseal Tips, 2.5 –1000• I	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Super Frost/Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Tubes(Primus)	0.2 ml Gefäß	Eppendorf, Hamburg
Tubes (TC480)	Perkin Elmer	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Tubes (TC24000)	Perkin Elmer	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Tubes 1ml/0.5ml	Safelock	Eppendorf, Hamburg
Tubes	P.A.L.M	P.A.L.M. Bernried

## 3. Ergebnisse

Insgesamt konnten zehn Fälle analysiert werden. Acht davon hatten eine bekannte K-RAS-Mutation, zwei weitere Fälle ohne RAS-Mutation wurden zum Vergleich analysiert. Die DNA-Extraktion war in 97 einzelnen Proben, die von 58 Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten und laser-mikrodissezierten ovariellen und extraovariellen Läsionen stammten, erfolgreich. In Tabelle 2 (Seite 40-41) sind alle untersuchten Proben mit den dazugehörigen Läsionen, zusammengefasst.

### 3.1 Die einzelnen Fälle

#### 3.1.1 Fall 321

Bei der 78 jährigen Patientin lag ein zystischer, seröser LMP-Tumor des linken Ovars vor, der mit Implantaten des Uterus, Mesenterium und Douglaschen Raumes assoziiert war. Da die Gewebeproben 10 Jahre alt waren und nur wenig Tumormaterial enthielten, konnte aus technischen Gründen lediglich aus dem LMP-Tumor zwei Proben mit Tumorzellmaterial für eine Analyse gewonnen werden. In diesen zwei Proben zeigte sich dieselbe RAS-Mutation (GGT• GAT).

#### 3.1.2. Fall 123

Diese Patientin wurde erstmals im Alter von 47 Jahren am linken Ovar operiert und sechs Jahre später ein zweites Mal auf der kontralateralen Seite. Beide Male wurde die Diagnose eines zystischen serösen LMP-Tumors gestellt. Von dem linken LMP-Tumor konnten drei Proben gewonnen werden, von dem rechten fünf. Die K-RAS-Mutationsanalyse erbrachte eine identische Punktmutation (GGT• GTT) auf beiden Seiten. Auch bei Analyse verschiedener Bereiche aus den zwei Tumoren fand sich in beiden Tumoren jeweils in drei Entnahmen dieselbe Mutation, in zwei Proben des Tumors der rechten Seite ließ sich keine Mutation nachweisen. (siehe Abb. 12)

## 3.1.3 Fall 302

Am linken Ovar der 58-jährigen Frau fand sich ein oberflächlicher seröser LMP-Tumor. Auf der kontralateralen Seite hingegen zeigte sich ein zystischer seröser Borderline-Tumor. Insgesamt konnten fünf DNA-Proben isoliert werden, zwei davon links und drei rechts. Alle drei Tumorproben der rechten Seite wiesen die identische Mutation auf (GGT• GTT). Links fand sich bei einer Probe ebenfalls eine GGT• GTT Mutation, die zweite Probe hingegen war bezüglich einer RAS-Mutation negativ. (siehe Abb. 13)

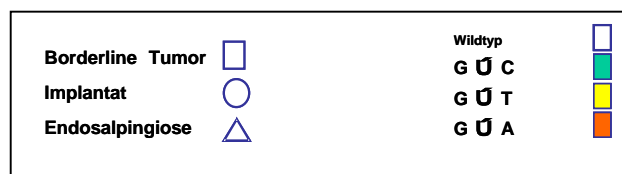
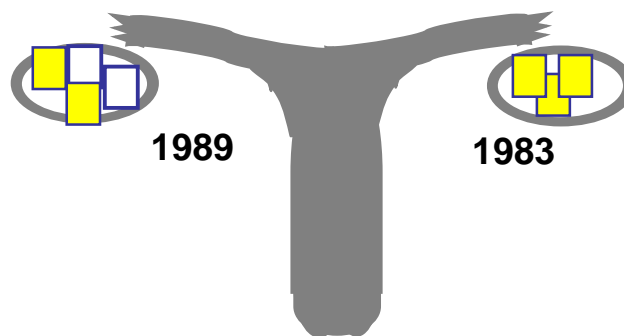


Abbildung 12: Fall 123

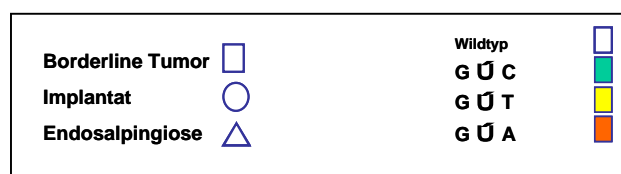
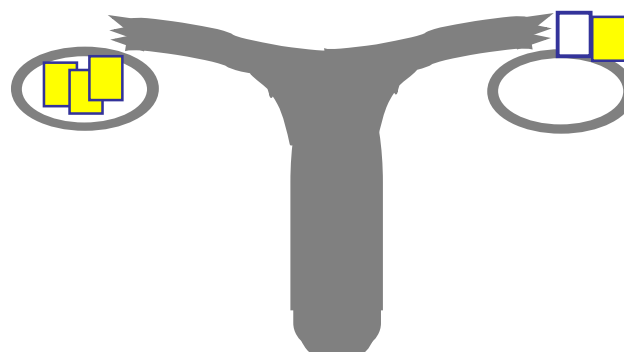


Abbildung 13: Fall 302



## 3.1.4 Fall 127

In dem Fall der 48-jährigen Patientin wurden Proben eines zystischen LMP-Tumors aus beiden Ovarien gewonnen, drei davon ließen sich rechts und zwei links isolieren. Zusätzlich konnten drei extraovarielle Läsionen untersucht werden. Diese umfaßten einen Endosalpingiose-Herd des Uterus und zwei Implantate vom Peritoneum des Darms bzw. dem Bereich der rechten Tube. Bei der Mutationsanalyse zeigte sich in allen ovariellen Tumorgewebsproben dieselbe RAS-Mutation (GGT• GCT). Die drei extraovariellen Herde entsprachen genetisch dem Wildtyp (siehe Abb. 14)

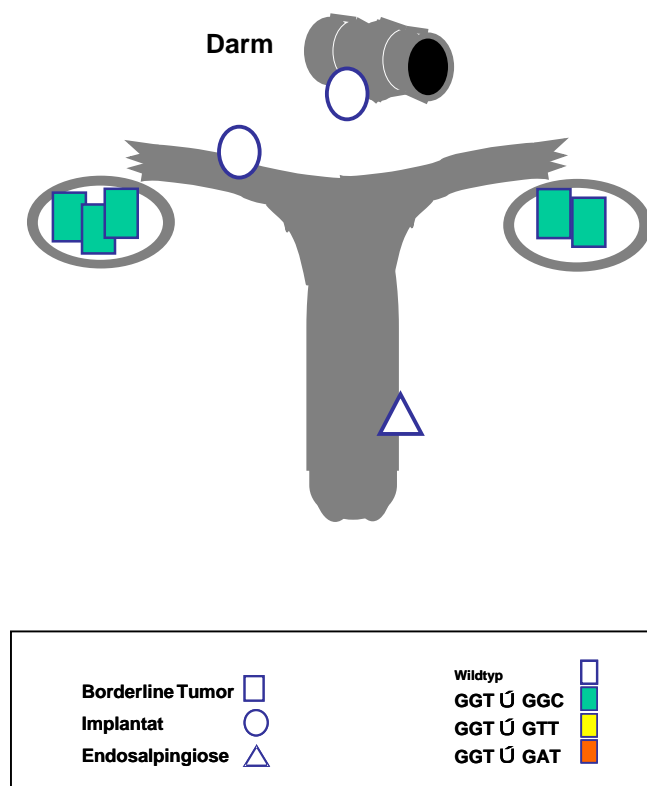


Abbildung 14: Fall 127

## 3.1.5 Fall 304

Bei diesem ausgedehnt untersuchten Fall einer 49-jährigen Patientin wurden insgesamt elf Proben von sieben verschiedenen Läsionen analysiert, die sich wie folgt zusammensetzten: je zwei DNA Proben eines oberflächlichen LMP-Tumors des linken bzw. rechten Ovars, insgesamt fünf Proben aus drei Implantaten, eines davon im Ovar, und zwei im Omentum, sowie zwei weitere Herde im Netz mit Endosalpingiose.

Lediglich ein Endosalpingiose-Herd im Netz und ein Implantat des rechten Ovars wiesen keine Mutation auf. Alle anderen Läsionen zeigten die identische Punktmutation (GGT• GTT).

Hervorzuheben ist, dass alle drei Proben, die aus unterschiedlichen Anteilen des gleichen Implantates gewonnen wurden, die identische Punktmutation aufwiesen (siehe Abb. 15.).

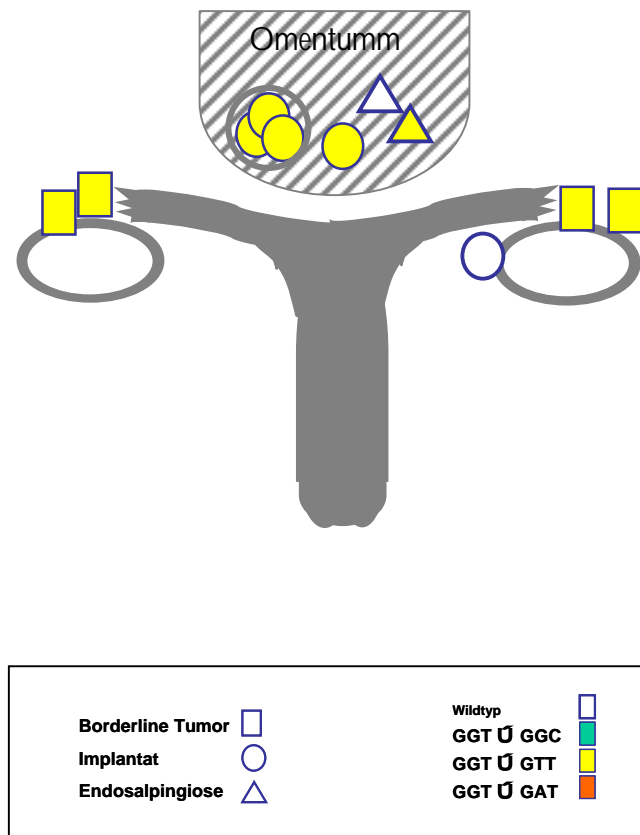


Abbildung 15: Fall 304

### 3.1.6 Fall 107

Insgesamt zehn Proben aus neun Läsionen konnten von dieser jungen Frau (26 Jahre) isoliert werden. Auch in diesem Fall war der Basenaustausch im Codon 12 des RAS-Gens stets der gleiche (GGT• GTT). Diese RAS-Mutationen wurden dabei sowohl in den zwei oberflächlichen Bereichen, als auch in dem zystischen Anteil des Tumors des rechten Ovars nachgewiesen. Darüber hinaus fanden sich drei RAS-positive Implantate im Ligamentum Latum sowie eines am Dickdarm. Ein Endosalpingiose-Herd im Ligament sowie zwei Implantate, die aus Darmgewebe gewonnen wurden, zeigten keine Mutation (siehe Abb. 16).

### 3.1.7 Fall 320

Bei dieser 40-jährigen Frau waren zwei Areale des zystischen LMP-Tumors des rechten Ovars positiv bezüglich einer RAS-Mutation, auf der linken Seite war nur ein Areal von zwei

analysierten positiv. An der rechten Tube konnte ein RAS-positives Implantat nachgewiesen werden. Alle sechs untersuchten Endosalpingiose-Herd, von welchen fünf in Lymphknoten und einer im Douglasschen Raum lokalisiert waren, zeigten keinen Basenaustausch im Codon 12 des Ras Gens (siehe Abb. 17)

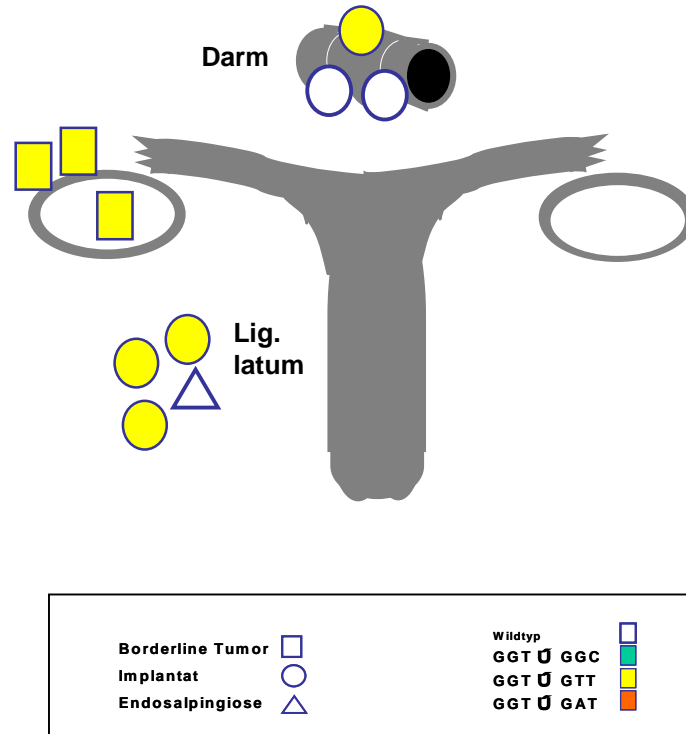


Abbildung 16: Fall 107

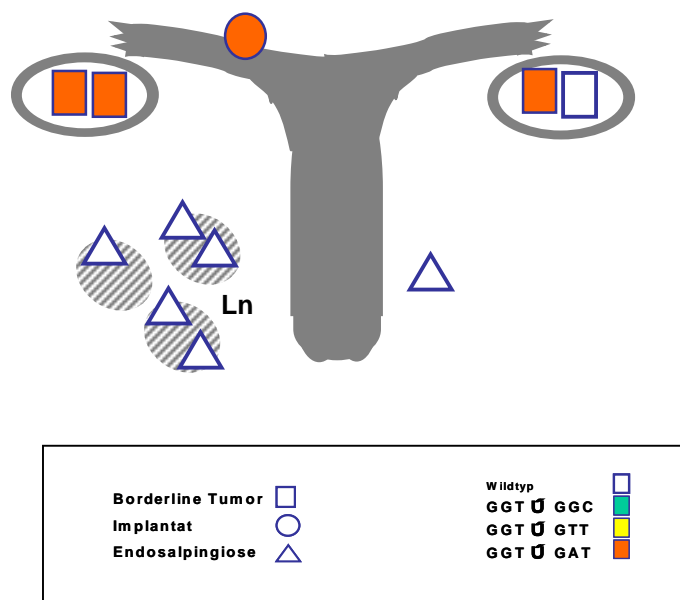


Abbildung 17: Fall 320

## 3.1.8 Fall 322

Bei den untersuchten Läsionen der 34-jährigen Frau, ist besonders hervorzuheben, daß hier zwei verschiedene Punktmutationen an unterschiedlichen Läsionen der inneren weiblichen Geschlechtsorgane nachweisbar waren.

Alle untersuchten zystischen Anteile des ovariellen Tumors (zwei Anteile links, einer rechts) wiesen eine GGT• GTT Mutation auf, die oberflächlichen Anteile (vier rechts) dagegen zeigten eine GGT• GGC Mutation bzw. (einer rechts) keine Mutation. Aus dem Uterusgewebe konnten fünf Implantate isoliert werden. Drei davon wiesen die GGT• GTT Mutation auf, die restlichen zwei rechts gelegenen, zeigten eine GGT• GCT Mutation. Aus dem Bereich des rechten Mesovars wurden vier Proben von drei Implantaten gewonnen. Auch hier zeigte sich ein heterogenes Mutationsmuster. Zwei Anteile eines Implantates, sowie ein weiteres Implantat zeigten eine GGT• GCT Mutation, wohingegen das dritte Implantat eine GGT• GTT Mutation aufwies. Zwei untersuchte Lymphknoten (iliaka externa rechts, obturatorius rechts) mit Endosalpingiose-Herden wiesen die identische Mutation wie der gleichseitige oberflächliche LMP-Tumor auf (s. Abb. 18).

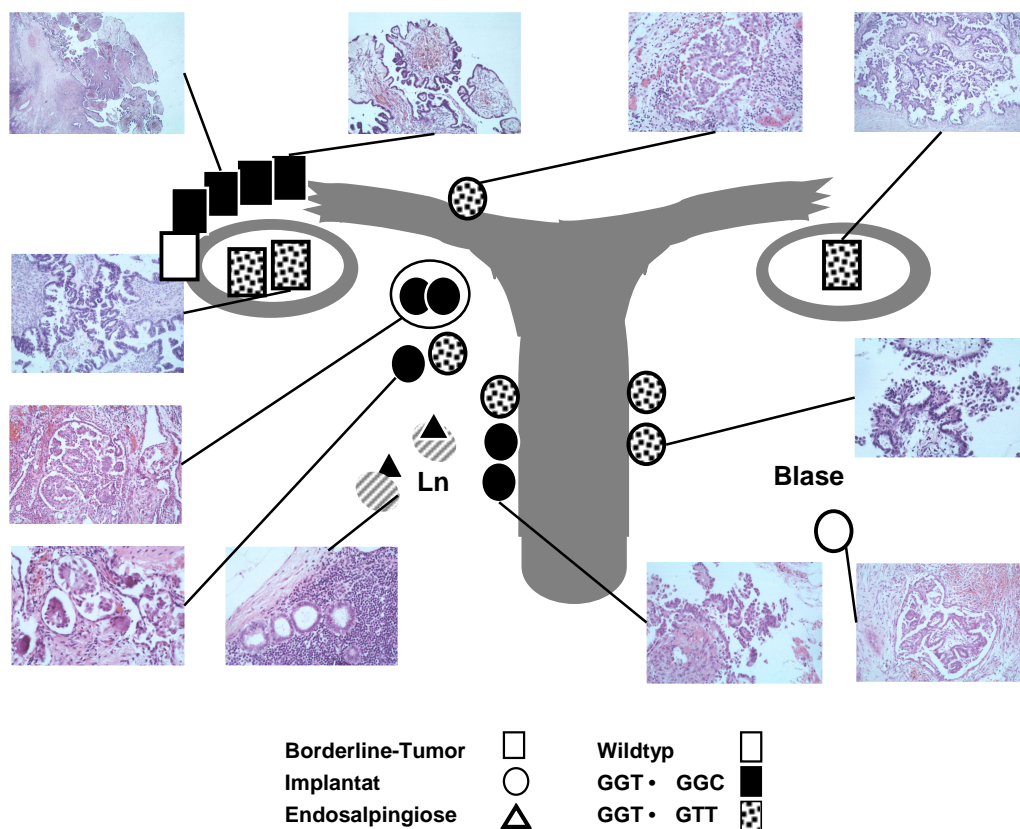


Abbildung 18: Fall 322

### 3.1.9 Fall 323 und 324

Diese beiden Fälle wiesen in keinem der ovariellen Tumoren eine RAS-Mutation auf und zeigten zahlreiche extraovarielle Herde. Diese Fälle wurden vergleichend untersucht, um die die Frage zu klären, ob RAS-Mutationen in extraovariellen Läsionen auch unabhängig vom Ovar tumor entstehen können.

#### 3.1.9.1 Fall 323

Bei dieser 38-jährigen Patientin wurden sechs Proben verschiedener Tumoranteile des rechten oberflächlichen LMP-Tumors sowie vier weitere des linken zystischen Tumors untersucht. Drei Implantate konnten aus dem Peritoneum des Dickdarms isoliert werden und ein weiteres aus dem Omentum. Lediglich in einem Kolon-Implantat ließ sich eine GGT• GTT Mutation nachweisen, alle anderen untersuchten Läsionen waren negativ bezüglich einer RAS-Mutation.

#### 3.1.9.2 Fall 324

Insgesamt fünf Areale eines bilateralen, zystischen LMP-Tumors, davon eines links und vier weitere rechts, der 45-jährigen Patientin, sowie ein Endosalpingiose-Herd der linken Tube und zwei weitere des Uterus wiesen keine RAS-Mutation auf.

### 3.1.10 Zusammenfassung der erhobenen Daten

Nach Art der Läsionen gegliedert lassen sich die Ergebnisse der Mutationsanalyse in drei Gruppen einteilen:

#### 3.1.10.1 Bilaterale Tumoren

Insgesamt acht Fälle in der Studie zeigten einen bilateralen Befall der Ovarien. Jedes Mal ließ sich in beiden Ovarien im Hinblick auf das Codon 12 des K-RAS Genes der gleiche Genotyp nachweisen. In zwei Fällen handelte es sich dabei um den Wildtyp. In den restlichen sechs Fällen ließ sich die identische Punktmutation auch im kontralateralen Ovar nachweisen. Eine

Sonderstellung nimmt dabei Fall 322 ein, da sich zusätzlich unilateral in den oberflächlichen Anteilen eine zweite Mutation fand.

#### 3.1.10.2 Unterschiedliche Areale der gleichen Läsion

Von 19 Herden insgesamt wurden jeweils zwischen zwei und sechs Proben entnommen. Es handelt sich um 17 ovarielle Tumor-Areale und zwei Implantate. Von den multipel untersuchten ovariellen LMP-Tumoren waren 14 RAS positiv, und davon wiederum wiesen 12 Tumoren an mehreren Stellen innerhalb des Tumors die identische Mutation auf. Die drei Tumor-Areale der Kontrollfälle waren in allen Proben identisch und wiesen einen Wildtyp auf. Von den zwei Implantaten konnten zwei bzw. drei Proben gewonnen werden. Innerhalb der Implantate ließ sich in beiden Fällen jeweils an allen untersuchten Stellen dieselbe Mutation nachweisen.

#### 3.1.10.3 Extraovarielle Herde

In sieben Fällen waren extraovarielle Läsionen vorhanden, fünf davon hatten mindestens einen ovariellen LMP-Tumor mit RAS-Mutation. Von diesen fünf Fällen wiederum hatten vier RAS-positive Läsionen. Alle gefundenen Mutationen von extraovariellen Herden waren mit der Mutation des zugehörigen ovariellen Tumors identisch (18/18).

Von allen Läsionen waren 18 von 26 (ohne Kontrollfälle 17 von 22) Implantaten RAS-positiv. In den Endosalpingiose-Herden ließ sich bei 3/15 (ohne Kontrollfälle 3/12) eine RAS-Mutation nachweisen.

Tabelle 2: K-RAS Mutationsanalyse von insgesamt 97 Proben aus 10 serösen LMP-Tumoren des Ovars und assoziierter extraovarieller Herde

Fall- und Proben Nummer.	Lokalisation	Morphologie	K-RAS-Mutation
321 / Probe 1-2	Linkes Ovar	Zystischer LMP-Tumor	GGT → GAT
123 / Probe 1-3	Linkes Ovar	Zystischer LMP-Tumor (1983)	GGT → GTT
123 / Probe 4-5	Rechtes Ovar	Zystischer LMP-Tumor (1989)	GGT → GTT
123 / Probe 6-7	Rechtes Ovar	Zystischer LMP-Tumor (1989)	Wildtyp
302 / Probe 1	Linkes Ovar	Oberflächlicher LMP-Tumor	GGT → GTT
302 / Probe 2	Linkes Ovar	Oberflächlicher LMP-Tumor	Wildtyp
302 / Probe 3-5	Rechtes Ovar	Zystischer LMP-Tumor	GGT → GTT
127 / Probe 1-2	Linkes Ovar	Zystischer LMP-Tumor	GGT → GCT
127 / Probe 3-5	Rechtes Ovar	Zystischer LMP-Tumor	GGT → GCT
127 / Probe 6	Rechte Tube	Implantat	Wildtyp
127 / Probe 7	Dünndarm	Implantat	Wildtyp
127 / Probe 8	Uterus	Endosalpingiose	Wildtyp
304 / Probe 1-2	Linkes Ovar	Oberflächlicher LMP-Tumor	GGT → GTT
304 / Probe 3-4	Rechtes Ovar	Oberflächlicher LMP-Tumor	GGT → GTT
304 / Probe 5	Linkes Ovar	Implantat	Wildtyp
304 / Probe 6-8	Omentum	Implantat	GGT → GTT
304 / Probe 9	Omentum	Implantat	GGT → GTT
304 / Probe 10	Omentum	Endosalpingiose	GGT → GTT
304 / Probe 11	Omentum	Endosalpingiose	Wildtyp
107 / Probe 1	Rechtes Ovar	Zystischer LMP-Tumor	GGT → GTT
107 / Probe 2-3	Rechtes Ovar	Oberflächlicher LMP-Tumor	GGT → GTT
107 / Probe 4-5	Dickdarm	2 Implantate	GGT → GTT
107 / Probe 6	Dickdarm	Implantat	Wildtyp
107 / Probe 7-9	Ligamentum latum	3 Implantate	GGT → GTT
107 / Probe 10	Ligamentum latum	Endosalpingiose	Wildtyp
322 / Probe 1	Linkes Ovar	Zystischer LMP-Tumor	GGT → GTT
322 / Probe 2-3	Rechtes Ovar	Zystischer LMP-Tumor	GGT → GTT
322 / Probe 4-7	Rechtes Ovar	Oberflächlicher LMP-Tumor	GGT → GCT
322 / Probe 8	Rechtes Ovar	Oberflächlicher LMP-Tumor	Wildtyp
322 / Probe 9	Rechte Tube	Implantat	GGT → GTT
322 / Probe 10-11	Rechtes Mesovar	Implantat	GGT → GTT
			GGT → GCT

Fall- und Proben Nummer.	Lokalisation	Morphologie	K-RAS-Mutation
322 / Probe 12	Rechtes Mesovar	Implantat	GGT → GCT
322 / Probe 13	Rechtes Mesovar	Implantat	GGT → GCT
322 / Probe 14-16	Uterus	3 Implantate	GGT → GTT
322 / Probe 17-18	Uterus	2 Implantate	GGT → GCT
322 / Probe 19	Blase	Implantat	Wildtyp
322 / Probe 20-21	Lymphknoten	2 Endosalpingiose-Herde	GGT → GCT
323 / Probe 1-6	Linkes Ovar	Oberflächlicher LMP-Tumor	Wildtyp
323 / Probe 7-10	Rechtes Ovar	Zystischer LMP-Tumor	Wildtyp
323 / Probe 11	Dickdarm	Implantat	GGT → GTT
323 / Probe 12-13	Dickdarm	2 Implantate	Wildtyp
323 / Probe 14	Omentum	Implantat	Wildtyp
324 / Probe 1	Linkes Ovar	Zystischer LMP-Tumor	Wildtyp
324 / Probe 2-5	Rechtes Ovar	Zystischer LMP-Tumor	Wildtyp
324 / Probe 6-7	Uterus	2 Endosalpingiose-Herde	Wildtyp
324 / Probe 8	Linke Tube	Endosalpingiose	Wildtyp



## 4. Diskussion

### 4.1 Einleitung

Viele tumorbiologische Aspekte der serösen Borderline-Tumoren (SBOT) sind nach wie vor ungeklärt und werfen viele Fragen auf. Das besondere Interesse an den SBOT liegt zum einen darin begründet, daß diese mit 55-70% den Großteil der LMP-Tumoren ausmachen (Zanetta et al, 2001). Zum anderen ist die Herkunft und Bedeutung der Implantate, die in bis zu 40% bei diesen Tumoren zu finden sind, noch immer unbekannt (Trimble und Trimble, 1994). Morphologisch nehmen SBOT zwischen den gutartigen Adenomen des Ovars und den invasiven ovariellen Karzinomen eine Mittelstellung ein. Auch hinsichtlich der Bilateralität liegt diese Gruppe von Tumoren mit ungefähr 24-50% deutlich über der Prozentzahl der Adenome und unter der Prozentzahl seröser Karzinome (Dietel und Hauptmann, 2000). Der Altersgipfel der SBOT liegt ebenfalls zwischen dem gutartiger seröser Neoplasien und dem invasiver seröser Karzinome (Okugawa et al, 2001). Bei circa 15-30% der Patienten mit LMP-Tumoren liegt zum Zeitpunkt der Diagnose ein fortgeschrittenes Stadium vor (FIGO II-III). Ungefähr 10-30% davon bekommen ein Rezidiv und 10 % sterben an dieser Krankheit. Bei bis zu 5% aller Patienten kann sich im Verlauf der Erkrankung ein invasives Ovarialkarzinom entwickeln (Ortiz et al, 2001). Die gute 10-Jahres-Überlebensrate von etwa 95% grenzt die SBOT wiederum deutlich von den Karzinomen ab (Trope et al, 2000). Die Tatsache, daß bei einigen SBOT invasive Implantate nachweisbar sind (Gershenson et al, 1998), sowie der Nachweis von LMP-Arealen innerhalb seröser Karzinome (Gramlich et al, 1990) spricht ebenfalls für die Einordnung der SBOT zwischen den serösen Adenomen und den serösen Karzinomen des Ovars.

Trotz dieser pathologisch und klinisch sinnvollen Einordnung bleibt die Frage offen, ob diese Tumorgruppe damit auch ein Vorläuferstadium der invasiven Neoplasien oder eher eine eigene Entität darstellt. Molekularpathologisch unterscheiden sich nämlich seröse Borderline-Tumoren deutlich von invasiven Ovarialkarzinomen. So sind beispielsweise p53-Mutationen, der vermehrte Nachweis von LOH und komplexe Karyotypen bei SBOT selten anzutreffen (Diebold et al, 1996b). In die gleiche Richtung weist auch die Studie von Ortiz und Mitarbeitern (2001), die auf einen eigenen Entstehungsweg seröser Borderline-Tumoren hindeutet. Die Autoren untersuchten p53 und K-RAS-Mutationen an dem Gewebe von acht Patientinnen, die zunächst an einem serösen Borderline-Tumor litten und später ein invasives seröses Karzinom entwickelt hatten. Von beiden Tumoren wurde Gewebe mittels Laser-Mikrodissektion gewonnen. Bei sieben von acht Patientinnen unterschied sich das Mutationsmuster der Borderline-Tumoren von dem des später entwickelten Karzinoms (Ortiz et al, 2001).

Wie eingangs erwähnt ist unklar, welche Rolle den Implantaten von SBOT zukommt. Handelt es sich dabei um echte Metastasen oder um assoziierte Läsionen, die unabhängig von dem Primärtumor entstanden sind? Sind diese Läsionen eventuell Ausdruck eines Feldeffektes, welcher der Entstehung von LMP-Tumor und extraovariellen Herden zu Grunde liegt?

Mittels des Nachweises genetischer Charakteristika, sogenannter „molekularer Marker“, läßt sich molekularbiologisch Monoklonalität von Tumorzellen nachweisen. Dazu untersucht man Zellen aus unterschiedlichen Arealen eines Tumors. Findet man stets die identischen Charakteristika, so ist eine monoklonale Zusammensetzung des Tumors wahrscheinlich. Gleiches gilt für den Vergleich von Zellen aus dem Primärtumor und Metastasen. Für derartige Vergleiche wurden in der Vergangenheit Mutationsanalysen von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen wie p53 und K-RAS, sowie die Analyse des Musters der X-chromosomalen Inaktivierung anhand des Androgen-Rezeptors (HUMARA) verwendet. Für invasive Ovarialkarzinome wurde schon 1992 durch molekularpathologische Analysen der Nachweis erbracht, daß sich extraovarielle Läsionen von dem ovariellen Primärtumor ableiten lassen. So konnten im p53-Gen Jacobs und Mitarbeiter (1992) sowie Mok und Mitarbeiter (1992) identische Mutationen in verschiedenen Arealen der Ovarialkarzinome nachweisen.

Mittels Analyse des X-chromosomalen Inaktivierungsmusters konnte bei 49 Tumoren, darunter 18 Ovarialkarzinomen, Monoklonalität nachgewiesen werden (Enomoto et al, 1994).

Vor diesen Hintergründen hatte unsere Studie zwei Ziele:

1. Zum einen wollten wir der Frage nach der klonalen Abstammung der mit serösen Borderline-Tumoren assoziierten Implantate nachgehen. Dazu wurde der K-RAS-Mutations-Status von assoziierten Läsionen und ovariellen Tumoren einer Gruppe von 10 SBOT, davon 8 mit bekannter RAS-Mutation, analysiert.
2. Zum anderen sollte untersucht werden, ob die ovariellen Tumoren und die Läsionen aus einer homogenen, monoklonalen Zellpopulation bestehen. Hierfür wurden mehrere Proben einzelner Läsionen und Tumoren gewonnen und getrennt voneinander untersucht.

## 4.2 K-RAS Mutation als Marker zum Monoklonalitätsnachweis

Punktmutationen im Onkogen K-RAS standen im Mittelpunkt zahlreicher Studien, die der Erforschung der Biologie menschlicher Neoplasien dienten. Das K-RAS Gen wurde, zumeist in Kombination mit einem zweiten Marker, beispielsweise zur Klonalitätsanalyse von Neoplasien des Kolon, des Pankreas, der Lunge und des Magens benutzt (Dix et al, 1995).

Die alleinige Verwendung von K-RAS Mutationen als Klonalitätsmarker bringt gewisse Einschränkungen hinsichtlich der Aussagekraft der Ergebnisse mit sich. So entspricht die Art des Nukleotid-Austausches an Kodon 12 in serösen LMP-Tumoren des Ovars nicht einer zufälligen Verteilung. Theoretisch wäre die a priori -Wahrscheinlichkeit bei vier möglichen Basen z.B. eine GGT zu GTT Transversion zu erhalten 33%.

Betrachtet man allerdings die Mittelwerte der bis jetzt an SBOT durchgeführten Studien, so ergibt sich eine charakteristische Verteilung der spezifischen Basenaustausche (siehe Tabelle 3, Seite 45). Mit circa 60% ist die Punktmutation von GGT nach GTT die mit Abstand häufigste Mutation. An zweiter Stelle liegt mit etwa 26% der Basenaustausch von GGT zu GAT.

Am Beispiel eines bilateralen LMP-Tumors wie im Fall 304 würde dies bedeuten, daß eine im kontralateralen Tumor zufällig entstandene RAS-Mutation mit höherer Wahrscheinlichkeit ein G nach T Basenaustausch als eine andere Mutation wäre.

Dies muß bei der Schlußfolgerung, daß bei identischer Mutation der kontralaterale Tumor dem gleichen Zellklon wie der Primärtumor entstammt, berücksichtigt werden.

Eine Möglichkeit die Hypothese zu stützen, besteht darin, gleichzeitig weitere Marker zu untersuchen.

In diesem Zusammenhang bietet sich vor allen der HUMARA-Assay an. Allerdings erfordert die Untersuchung auf Monoklonalität mittels des HUMARA Rezeptors erheblich größere DNA-Mengen, als aus dem Ausgangsmaterial in der vorliegenden Studie zu gewinnen war. Andere genetische Alterationen, die häufig genug auftreten, um als Marker dienen zu können, sind neben der K-RAS-Mutation bisher nicht beschrieben worden.

Eine weitere Möglichkeit, die Hypothese einer monoklonalen Herkunft der Implantate zu untermauern, ist die Untersuchung einer möglichst großen Anzahl von Herden und Fällen. Die hier untersuchten 18 extraovariellen Läsionen an insgesamt acht Fällen sind absolut gesehen zwar eine kleine Stichprobe, relativ gesehen stellt diese Studie aber das bisher größte untersuchte und publizierte Kollektiv dar.

SBOT	GGT• GTT	GGT• GCT	GGT• GAT	GGT• CGT	GGT• TGT	GGT• GGC
Teneriello et al.1993			3/3(100%)			
Mok et al. 1993	7/9(78%)		1/9(12%)		1/9(12%)	
Haas et al.1999	4/7(57%)		3/7(43%)			
Ortiz et al. 2001	2/4(50%)			2/4(50%)		
Alvarez et al(2000)	2/3(67%)		1/3(33%)			
Diebold et al. (2002)	5/8(63%)	1/8(13%)	1/8(13%)			1/8(13%)
Total	20/34(59%)	1/34(3%)	9/34(26%)	2/34(6%)	1/34(3%)	1/34(3%)

**Tabelle 3: Kodon12 Punktmutationen bei SBOT**

Berücksichtigt man die genannten Einschränkungen, so erscheint die RAS-Mutationsanalyse als eine vergleichsweise zuverlässige Methode, um die Frage nach Monoklonalität verschiedener Tumorherde anzugehen. So benutzten Cuatrecasas und Mitarbeiter (1996) das K-RAS Gen, um die Beziehung zwischen muzinösen Tumoren des Ovars einerseits und einem synchronen Appendixtumor sowie damit vergesellschaftetem Pseudomyxoma peritonei andererseits zu klären. Sie fanden in vier Fällen an unterschiedlichen Lokalisationen eine GGT nach GAT und in einem Fall eine GGT nach GTT Mutation und leiteten daraus einen direkten Zusammenhang zwischen dem Eierstock-Tumor und den synchron auftretenden Tumoren der Appendix ab .

Diese Vermutung konnte inzwischen durch nachfolgende Studien weitgehend bestätigt werden (Shih et al, 2001).

### 4.3 K-RAS Mutationen bei ovariellen Tumoren

Die Neoplasien des Ovars sind bereits umfassend auf RAS-Mutationen untersucht. Die Mutationen dieses Onkogens sind in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp unterschiedlich häufig nachweisbar. In Tabelle 4 (Seite 46) sind alle relevanten Studien seit 1993, die Ovarialtumoren getrennt nach ihrer Histologie untersucht haben, zusammengefaßt.

RAS-Mutationen werden im allgemeinen als frühe genetische Alteration in der Tumorgenese menschlicher Neoplasien angesehen (Cuatrecasas et al, 1996).

Setzt man bei den invasiven Ovarialneoplasien eine schrittweise Entwicklung vom Adenom bis hin zum Karzinom voraus, so würde man erwarten, daß mit Zunahme des malignen Potentials auch RAS-Mutationen entsprechend häufiger nachweisbar sind. Aus Tabelle 4 geht aber hervor, daß dies weder bei serösen noch bei den muzinösen Tumoren des Ovars der Fall ist.

Dagegen fällt auf, daß eine RAS-Mutation am häufigsten bei den LMP-Tumoren aufzutreten scheint (Hogdall et al, 2003).

Etwas weniger häufig lassen sich RAS-Mutationen bei den zugehörigen Karzinomen nachweisen. Das könnte auf das Vorhandensein anderer Entstehungswege hindeuten, die zur Entwicklung von Karzinomen führen. Dennoch schließt diese Tatsache die Möglichkeit nicht aus, daß zumindest ein Teil der LMP-Tumoren das Potential besitzt, in ein invasives Karzinom überzugehen.

Darüber hinaus fällt auf, daß RAS-Mutationen nur sehr selten bei serösen Zystadenomen nachweisbar sind. Dies stützt die von einigen Autoren favorisierte Annahme, daß seröse LMP-Tumoren eine eigene Entität bilden und in den meisten Fällen nicht Teil eines Kontinuums einer Adenom-Karzinom-Sequenz darstellen (Ortiz et al, 2001).

	Zystadenom Muzinös	Zystadenom Serös	LMP Muzinös	LMP Serös	Karzinom Muzinös	Karzinom Serös
Varras et al. 1999	0/12 (0%)	0/8 (0%)	0/2 (0%)	1/1 (100%)	1/8 (13%)	7/29 (24%)
Mandai et. al.1998	1/7 (14%)	0/2 (0%)	4/14 (29%)	0/2 (0%)	4/10 (40%)	1/22 (5%)
Cuatrecasas et. al1997	35/60 (58%)	4/30 (14%)	19/22 (86%)	3/11 (27%)	11/13 (85%)	15/38 (39%)
Ichikawa et al.1993	4/30 (13%)	0/22 (0%)	4/12 (33%)	0/8 (0%)	7/15 (46%)	1/17 (6%)
Teneriello et al.1993	1/9 (11%)	0/11 (0%)	2/8 (25%)	3/11 (27%)	0/2 (0%)	1/21 (5%)
Mok et al. 1993			12/19 (63%)	9/25 (36%)	3/4 (75%)	4/14 (29%)
Haas et al.1999		0/7 (0%)		7/20 (35%)		2/17 (11%)
Total	41/118 (35%)	4/80 (5%)	41/77 (53%)	23/78 (29%)	26/52 (50%)	31/158 (20%)

**Tabelle 4: K-RAS Mutationen in ovariellen Neoplasien**

## 4.4 Die Multifokalitätstheorie

### 4.4.1 Das sekundäre Müllersche System

Die Herkunft der mit SBOT assoziierten Läsionen sowie deren klinische Bedeutung ist nach wie vor Thema einer bis heute andauernden, wissenschaftlichen Debatte. Bei dieser Diskussion haben sich zwei unterschiedliche Hypothesen herausgebildet.

Einige Autoren gehen davon aus, daß sich diese Läsionen, genauso wie Metastasen invasiver Karzinome, durch eine Streuung von Zellen aus den ovariellen Primärtumoren entwickeln

(Moore et al, 2000), andere postulieren einen Feldeffekt, der eine unabhängige Transformation epithelialer Zellen an unterschiedlichen Lokalisationen des sogenannten sekundären Müllerschen Systems zur Folge haben soll.

Der Begriff des sekundären Müllerschen Systems wurde 1990 von Lauchlan geprägt und stellt ein neues theoretisches Konzept dar.

Aus der Embryologie ist bekannt, daß sich die weiblichen Geschlechtsorgane ab der sechsten Woche aus den Müller-Gängen entwickeln. Dabei verschmelzen die kaudalen Anteile und bilden Uterus, Cervix und das obere Drittel der Vagina. Die proximalen Anteile bleiben getrennt und werden zu linker bzw. rechter Tube. Noch weiter proximal liegende Anteile entwickeln sich vermutlich nicht weiter und werden als sekundäres Müllersches System bezeichnet.

Diesem System sind alle Strukturen außerhalb von Tube, Uterus, Cervix und Vagina zuzuordnen, die, wie beispielweise das ovarielle Deckepithel und auch Endosalpingiose- oder Endometriose-Herde, eine Differenzierungspotenz wie das primäre Müllersche Gangsystem besitzen.

Die Zellen des sekundären Müllerschen Systems sollen der Theorie nach durch bisher unbekannte Faktoren zu Proliferation und Differenzierung angeregt werden. Ein Feldeffekt, wie beispielsweise hormonelle Faktoren, könnte nun eine weitere Progression bis hin zu LMP-Neoplasien begünstigen (Dubeau, 1999; Lauchlan, 1990).

Dieses Konzept bietet eine Erklärung für einige schwer verständliche Aspekte der ovariellen Neoplasien. So könnte man sich die Genese der seltenen primären LMP-Neoplasien des Peritoneums bei Frauen mit Hilfe dieser Theorie vorstellen (Girao et al, 1998). Auch Endosalpingiose-Herde, die häufig in pelvinen Lymphknoten auftreten, wären gut mit diesem Konzept vereinbar.

### 4.4.3 Hinweise für die Bedeutung des Feldeffektes in der Karzinogenese seröser Borderline-Tumoren

Die ersten Vermutungen, daß ein Feldeffekt an der Entstehung ovarieller epithelialer Neoplasien beteiligt sein könnte, gehen bis in die siebziger Jahre zurück.

In einer Studie an 13 invasiven Ovarkarzinomen konnten in 10 Fällen Talk-Partikel in Fremdkörpergranulomen nachgewiesen werden (Henderson et al, 1971). Als Quelle wurde Talkpuder aus den Handschuhen der Chirurgen vermutet.

In Tierversuchen wurden in Ratten nach Talk-Exposition Foci papillärer Proliferationen des ovariellen Epithels nachgewiesen, die mikroskopisch sichtbare Talk-Partikel enthielten (Hamilton et al, 1984).

Da Talk-Puder auch von vielen Frauen in der Intimhygiene benutzt wird, wurde dies als zweite mögliche Quelle von Talk in der peritonealen Höhle verdächtigt (Longo et al, 1979). In der größten prospektiven Studie zum diesen Thema konnte an einer Kohorte von rund 79000 Frauen jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Talkpuder-Gebrauch in der Intimhygiene und einem Ovarialkarzinom-Risiko festgestellt werden. Lediglich in einer Subgruppenanalyse, die getrennt nach histologischen Typus durchgeführt wurde, konnte ein gering erhöhtes Risiko für invasive seröse Neoplasien nachgewiesen werden (Gertig et al, 2000).

Zum Thema LMP-Neoplasien und Talk gibt es bisher nur eine Studie. Harlow et al. (1989) untersuchten retrospektiv ein Kollektiv von 116 Patientinnen mit serösen und muzinösen Borderline-Tumoren. Frauen, die Talk-Puder benutzten, hatten dabei ein 2.8 fach erhöhtes Risiko eine LMP-Neoplasie zu entwickeln.

Bei einer weiteren Hypothese, die einen Feldeffekt postuliert, stehen Hormone im Mittelpunkt. Dafür sprechen insbesondere die Ergebnisse einer Studie, in der eine vermehrte Östrogen-Rezeptor-Expression sowohl in ovariellen serösen LMP-Tumoren als auch in assoziierten Implantaten nachgewiesen werden konnte (Abu-Jawdeh et al, 1996).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte ein Zusammenhang zwischen Gonadotropinen und dem Wachstumsfaktor VEGF nachgewiesen werden. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Peptid, welches die Proliferation von Endothelzellen fördert. Mit einer In-vitro-Studie an Zellkulturen von Zystadenomen, Borderline-Tumoren und Karzinomen konnten Wang und Mitarbeiter (2002) zeigen, daß sich die VEGF-Expression sowohl in den Borderline-Tumoren als auch in den Karzinomen durch Gonadotropine stimulieren läßt. Dies könnte bedeuten, daß erhöhte Gonadotropin-Werte wie man sie z.B. in der Menopause findet über eine Verbesserung der Blutversorgung der Tumor-Zellen zu einem beschleunigten Tumorwachstum oder zu einer erhöhten Rezidivrate führen.

Einen weiteren Hinweis auf den Einfluß von Hormonen auf die Tumorentwicklung seröser LMP-Tumoren liefern Fall-Berichte schwangerer Frauen. Bei einem primär peritonealen serösen LMP-Tumor mit mehreren Arealen der Mikroinvasion konnten zwei Monate nach Beendigung der Schwangerschaft bei einer Kontroll-Laparoskopie keine Tumor-Residuen mehr nachgewiesen werden.

Bei einer weiteren Patientin wurde im Gestationsalter von 24 Wochen ein SBOT reseziert. Zwei Monate post partum zeigte sich ein deutlicher Rückgang der epithelialen Proliferation (Mooney et al, 1997).

#### 4.4.4 K-RAS Mutation als Feldeffekt

Sucht man in der Literatur nach möglichen Faktoren, die als Feldeffekt eine RAS-Mutation begünstigen können, so gibt es die am besten belegten Hinweise bei Studien an Adenokarzinomen der Lunge. In einigen Studien konnte dort eine signifikante Korrelation zwischen Rauchen und K-RAS Mutation nachgewiesen werden. Daraus leiten einige Autoren einen direkten kausalen Zusammenhang ab (Sarkar et al, 1995; Wang et al, 2002).

Der Nachweis von RAS-Mutationen in SBOT, Implantaten und Endosalpingiose spricht dafür, daß K-RAS-Mutationen frühe Ereignisse in der Entwicklung ovarieller und extraovarieller seröser Proliferationen sind.

In anderen Epithelien, wie zum Beispiel im Pankreasgang-Epithel, sind K-RAS-Mutationen ebenfalls nicht nur in Karzinomen, sondern auch in eindeutig gutartigen Läsionen, wie zum Beispiel in normalem, hyperplastischem und metaplastischem Epithel beschrieben worden. Izawa und Mitarbeiter (2001) fanden bei mehreren Herden mit duktaler Hyperplasie im Pankreas unterschiedliche K-RAS-Mutationen und verschiedene X-chromosomale Inaktivierungs-Muster. Sie schlossen aus diesen Daten auf einen zugrundeliegenden Feldeffekt.

Im Kolon-Epithel konnte man einen Zusammenhang zwischen einer defekten Funktion eines Reparatur Proteins, der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) und dem gehäuften Vorkommen von GGT zu GAT RAS-Mutationen nachweisen. Dies spricht dafür, daß das gehäufte Vorkommen dieses Basenaustausches bei Kolontumoren sich zum Teil auch auf epigenetische Veränderungen zurückführen läßt (Esteller et al, 2000).

Bezüglich der Läsionen seröser LMP-Tumoren würde ein solcher Entstehungsmodus bedeuten, daß das Auftreten von identischen K-RAS-Mutationen in Implantaten und Ovar-Tumor Ausdruck eines „Feld-Defektes“ ist, der durch bisher noch unbekannte Faktoren hervorgerufen wird.

Zum Beispiel wäre eine genetische Prädisposition ähnlich der beim familiären Kolonkarzinom denkbar, die gleichzeitig eine Tumorentstehung im Ovar und extraovariellen Geweben induziert. Für das K-RAS Gen gibt es allerdings von epidemiologischer Seite noch keine Hinweise in diese Richtung, und Keimbahn-Mutationen sind bisher noch nicht beschrieben worden. Im einzigen bisher berichteten Fall, in dem eineiige Zwillinge an muzinösen Appendix-Tumoren erkrankten und sich bei einer von beiden Patientinnen ein Pseudomyxoma Peritonei entwickelte, zeigten sich unterschiedliche K-RAS-Mutationen in den Appendix-Tumoren der beiden Frauen. Eine identische Mutation fand sich allerdings bei einem Zwilling im Appendix-Tumor und dem assoziierten peritonealen Tumor. Die Autoren leiteten daraus den Schluß ab, daß K-RAS-Mutationen erst im Laufe der Karzinogenese entstehen und in diesen Fällen nicht als Keimbahnmutation vorlagen (Shih et al, 2001).



Auch die Tatsache, daß in keiner bisher publizierten K-RAS-Studie eine Mutation im Normalgewebe gefunden wurde, schließt eine Keimbahnmutation praktisch aus.

## 4.5 Diskussion der eigenen Ergebnisse im Zusammenhang des aktuellen Forschungsstandes

### 4.5.1 Zusammensetzung der Zellpopulation einzelner Läsionen

In der vorgelegten Studie nutzten wir K-RAS-Punktmutationen, um eine große Anzahl laser-mikrodissezierter ovarieller und extraovarieller Läsionen von SBOT auf molekularer Ebene miteinander zu vergleichen.

An 16 Läsionen konnten wir mehrere Proben desselben Herdes getrennt voneinander untersuchen. Der Nachweis der identischen Mutation bei der überwiegenden Mehrheit der untersuchten Proben läßt eine monoklonale Zusammensetzung sowohl der SBOT als auch der damit assoziierten Implantate annehmen, was in gutem Einklang mit den X-chromosomalen Klonalitäts-Studien zu diesem Thema steht (Gu et al, 1998).

Es besteht die Annahme, daß die Induktion einer Metaplasie im Epithel des sekundären Müllerschen Systems ein früher Schritt in der Genese seröser Borderline-Tumoren darstellt. Unsere Daten zeigen, daß seröse Borderline-Tumoren und deren Implantate nicht reaktive Veränderungen darstellen, sondern vielmehr neoplastische Läsionen repräsentieren (Diebold et al, 2003).

### 4.5.2 Endosalpingiose

Wenige Studien haben sich bislang auf molekularer Ebene mit der Endosalpingiose beschäftigt. Geht man von der Annahme aus, es handele sich hierbei um den Anfang eines Spektrums von Läsionen, das bis hin zum invasiven Implantat reicht (Moore et al, 2000), so gewinnt die Frage nach der Herkunft dieser eindeutig gutartigen Läsionen an Gewicht. Hinzu kommt, daß die Endosalpingiose die zweithäufigste Form von laproskopisch gefundenen, peritonealen Epithelproliferationen darstellt (Hesseling et al, 2000).

Alvarez und Mitarbeitern (2001) gelang es, bei einer K-RAS-Analyse in zwei von drei Borderline-Tumoren und den assoziierten Müller-Inklusionszysten eine identische Punktmutation nachzuweisen (Alvarez et al, 2001).

Dieses Ergebnis legt eine monoklonale Abstammung der Zysten nahe, jedoch weist diese Studie einige Einschränkungen auf. So wurde zum einen gepoolte DNA von multiplen Einschlußzysten verwendet, was es wahrscheinlicher erscheinen läßt, daß Zysten ohne RAS-Mutation nicht erkannt werden.

Zum anderen wurden die Sequenzen nicht über eine direkte Sequenzierung ermittelt, sondern es wurden die SSCP-Gel Banden ausgeschnitten. Ein Fehler der Taq-Polymerase in der SSCP-PCR kann so nicht bemerkt werden. Darüber hinaus ist die Zahl der untersuchten Fälle mit nur drei Fällen relativ klein.

Im Gegensatz dazu konnten in unser eigenen Studie sämtliche Läsionen einzeln untersucht werden und die Mutationen durch direktes Sequenzieren bestätigt werden. In unserer Studie wurden 12 Endosalpingiose-Herde von fünf Patienten analysiert. In zwei Fällen (40%) war bei insgesamt drei Zysten eine RAS-Mutation nachweisbar. Obwohl methodische Probleme nie ganz auszuschließen sind, so scheint es, daß selbst in den Fällen mit RAS-positiven Inklusionszysten diese Mutation nicht bei allen Zysten vorhanden ist.

Moore und Mitarbeiter (2000) näherten sich von einer anderen Seite diesem Thema. Sie analysierten 62 Fälle mit Endosalpingiose-Herden und verglichen diese mit allen gynäkologischen Lymphadenektomien innerhalb eines 6 Jahreszeitraumes (Moore et al, 2000). Insgesamt wurden 6154 Lymphknoten analysiert. In ihrer Studie konnte eine statistisch signifikante Assoziation von Müllerschen Einschlußzysten mit SBOT nachgewiesen werden, die bei keinem anderen Tumor des weiblichen Geschlechts-Traktes bestand. Des weiteren beobachteten sie, daß die Zysten hauptsächlich im Drainage Gebiet der Ovarien aufzufinden waren. Aus diesen Beobachtungen leiteten die Autoren die Schlußfolgerung ab, daß dies auf eine metastasenartige Entstehung hindeute.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch Studien zur Endometriose, einer der Endosalpingiose verwandten Läsion, die sich lediglich durch eine charakteristische Stroma-Komponente von der Endosalpingiose unterscheidet. Die Ergebnisse von X-chromosomalen Inaktivierungs-Studien wiesen bisher in Richtung eines monoklonalen Zusammenhanges (Jimbo et al, 1999; Jimbo et al, 1997; Mutter et al, 1995). Vor kurzem konnten allerdings mit einer sensitiveren Methodik eindeutig die Polyklonalität von Endometriose-Herden nachgewiesen werden (Mayr et al, 2003).

Zusammenfassend betrachtet scheint es unzweifelhaft, daß ein Zusammenhang zwischen Endosalpingiose und serösen Borderline-Tumoren besteht. Ob der Zusammenhang darin besteht, daß beide Läsionen die gleiche Ursache haben, oder ob eine Läsion die andere bedingt, bleibt unklar, wobei sich diese beiden Möglichkeiten nicht gegenseitig ausschließen müssen.

### 4.5.3 Implantate und bilaterale SBOT

Hinsichtlich ihres Ras-Mutations-Status sind bisher noch nie Implantate, die mit serösen Borderline-Tumoren assoziiert sind, untersucht worden. Wir konnten in vier von fünf serösen Borderline-Tumoren RAS-Mutationen in den assoziierten Implantaten nachweisen. Darüber hinaus fanden sich in allen kontralateralen Ovarialtumoren ebenfalls identische RAS-Mutationen.

Der Nachweis identischer Mutationen in den Implantaten von SBOT spricht auf den ersten Blick für einen metastasenartigen Entstehungsmechanismus. Einen ähnlichen Zusammenhang postulierten auch Segal und Hart (1992), die von der Hypothese ausgingen, daß oberflächlich wachsende LMP-Tumoren leicht in die peritoneale Höhle streuen können. Diese Autoren konnten eine statistisch signifikante Korrelation zwischen einem exophytischen, oberflächlichen Wachstum seröser Borderline-Tumoren und dem Auftreten von peritonealen Implantaten nachweisen.

Für einen metastasenartigen Entstehungsmodus der Implantate sprechen ferner die seltenen in der Literatur beschriebenen Fälle, in denen Implantate in extrapelvin gelegenen Lymphknoten gefunden wurden (Malpica et al, 2001).

In einem kürzlich veröffentlichten Fallbericht von Chamberlin und Mitarbeitern (2001) beispielsweise lag ein Implantat in einem Lymphknoten an der Arteria mammaria interna vor und wurde zufällig bei der Bypass-Operation einer 74-jährigen Frau 7-Jahre nach der Exzision eines SBOT gefunden.

Parallel dazu ließe sich auch Fall 123 unserer Studie interpretieren. Sechs Jahre nach Entfernen des SBOT im linken Ovar trat auf der kontralateralen Seite ein zweiter Tumor auf. In beiden Tumoren konnte die identische RAS-Punktmutation nachgewiesen werden. Die Interpretation, daß dieser Zweittumor als echte Tochtergeschwulst anzusehen ist, muß zumindest in Betracht gezogen werden.

Im Gegensatz dazu lieferten die Analyse von X-chromosomalen Inaktivierungsmustern an fortgeschrittenen, serösen Borderline-Tumoren Hinweise für die multifokale Entwicklung von bilateralen Tumoren und extraovariellen Implantaten. Lu und Mitarbeiter (1998) wiesen unterschiedliche Inaktivierungsmuster in drei von acht Fällen nach. Die Tatsache, daß die restlichen fünf Fälle gleiche Inaktivierungsmuster aufwiesen, mag auf reinem Zufall beruhen, könnte aber auch ein Hinweis auf einen monoklonalen Entstehungsweg sein.

Mit der gleichen Methode fanden Gu und Mitarbeiter (2001) unterschiedliche Inaktivierungsmuster bei 3 von 7 bilateralen Tumoren, sowie an 6 von 7 unilateralen Tumoren, die mit Implantaten assoziiert waren. Obwohl diese Ergebnisse klar auf eine multifokale

Genese hindeuten, schließen sie die Entstehung aus einer gemeinsamen Vorgängerzelle zumindest bei einem Teil der Läsionen nicht aus.

Zwei kritische Einschränkungen müssen bei diesen Studien bedacht werden. Zum einen läßt sich mit diesem Ansatz nur eine Minderheit der LMP-Tumoren untersuchen. Zum anderen mehrten sich die Zweifel an der Aussagekraft des HUMARA Ansatzes (Mayr et al, 2003), insbesondere bei der Untersuchung der Klonalität prä maligner Läsionen. So fanden Sakurazawa und Mitarbeiter (2000) bei der Klonalitätsanalyse durch K-RAS Mutationsmuster und X-chromosomaler Inaktivierung (HUMARA) an abberanten Krypten des Kolons zwar identische RAS-Mutationen jedoch ein polyklonales Inaktivierungs-Muster.

Diese Forschergruppe leitete daraus die Schlußfolgerung ab, daß das X-chromosomale Methylierungsmuster in präkanzerösen Läsionen möglicherweise instabil sein könnte und bestätigten dies durch den Nachweis der de novo Methylierung des HUMARA Rezeptors an 47 von 119 aberranten Krypten männlicher Patienten.

Die Multifokalitätstheorie alleine ist wohl kaum im Stande, diejenigen Fälle unserer Studie zu erklären, die sowohl in den ovariellen als auch in den assoziierten extraovariellen Herden die seltenere Glycin zu Alanin RAS-Mutation aufwiesen. Obwohl diese Daten insgesamt betrachtet in erster Linie für eine monoklonale Abstammung der Implantate sprechen, so schließen sie jedoch die Multifokalitäts-Theorie nicht mit letzter Sicherheit aus.

Wie oben erwähnt wären auch zufällig entstandene Punktmutationen in voneinander unabhängigen Läsionen theoretisch denkbar. Als Hinweis darauf mag die RAS-Mutation in einem Implantat des ansonsten RAS-negativen Falls Nr.323 dienen.

Eine ähnliche Beobachtung machten Garrett und Mitarbeiter (2000) im Falle des primären papillären serösen Karzinoms des Peritoneum. Sie fanden in einem Fall eine RAS-Mutation lediglich an einer von vier untersuchten Tumorstellen und schlossen daraus auf eine multifokale Entstehung.

Der Fall 322 unserer Studie, der zwei unterschiedlichen Mutationen an mehreren Lokalisationen aufwies, ist durch Multifokalität alleine schwer zu erklären. Betrachtet man die anatomischen Gegebenheiten, so kann man die Läsionen mit der Glycin zu Alanin Mutation dem oberflächlichen Tumor des rechten Ovars zuordnen.

Eine plausible Erklärung für das Auftreten der Mutation (Glycin zu Asparagin) in den zystischen Anteilen des gleichen Tumors und in vier Lymphknoten ist die Annahme eines zweiten Zellklones mit unabhängiger Streuung in extraovarielle Lokalisationen.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß die Frage nach der Herkunft und Bedeutung der mit SBOT assoziierten Implantate auch durch die eigenen Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden kann. Fest steht, daß es gute Argumente für beide Entstehungsmodelle gibt. Des weiteren schließt kein Modell das andere kategorisch aus. Ein

Nebeneinander beider Entstehungswege ist gut vorstellbar und würde die Ungereimtheiten und Widersprüchlichkeiten der früheren Untersuchungen erklären.

## 4.6 Klinische Relevanz

Nach wie vor ist die korrekte Behandlung der LMP-Neoplasien strittig und sehr uneinheitlich wie Menzin und Mitarbeiter (2000) mit einer Umfrage bei Mitgliedern der Society of Gynecologic Oncologists zeigen konnten.

Bei anderen Tumoren wie beispielsweise dem nicht-kleinzelligem Karzinom der Lunge oder dem Kolonkarzinom gibt es bereits Hinweise auf eine prognostische Aussagekraft sowohl bezüglich des Vorhandenseins als hinsichtlich der Art der RAS-Mutationen (Broermann et al, 2002; Font et al, 2001; Pajkos et al, 2000). Dabei scheint nach den Ergebnissen der RASCALL II-Studie an 3439 Patienten mit Kolonkarzinom, ein Glycin zu Valin Austausch mit einer schlechteren Prognose einherzugehen als die übrigen Mutationen (Andreyev et al, 2001). Für die serösen LMP-Neoplasien konnte bisher kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer K-RAS-Mutation und der Überlebensrate hergestellt werden (Cuatrecasas et al, 1998).

Zieht man die Ergebnisse der eigenen Studie in Betracht, erscheint die Bezeichnung „Implantat“ zumindest in einigen Fällen als gerechtfertigt. Eine klonale Abstammung der kontralateralen und peritonealen Läsionen seröser Borderline-Tumoren könnte weitreichende klinische Konsequenzen nach sich ziehen. Obwohl die Prognose eines fortgeschrittenen SBOT weitaus günstiger ist als die eines invasiven Ovarialkarzinoms, berichten einige Autoren von 15-Jahres-Mortalitätsraten von bis zu 27% (Leake et al, 1992).

So wäre es durchaus vorstellbar, daß manche Patientinnen von einer engeren Überwachung oder einer adjuvanten Therapie profitieren könnten. Da bisher jedoch nicht bewiesen werden konnte, daß eine adjuvante Chemotherapie einen Vorteil für Patientinnen mit nicht invasiven Implantaten bringt (Buttini et al, 1997), bleibt eine Chemotherapie für Patientinnen mit invasiven Implantaten reserviert.

Eine neue vielversprechende therapeutische Strategie könnten die Farnesyltransferase-Inhibitoren darstellen. Diese hemmen die posttranslationale Prozessierung des Ras-p21-Proteins und somit auch seine onkogene Aktivität. In-vitro-Studien konnten bereits die Wachstums-Inhibierung von RAS-transformierten Zellen sowie die Induktion einer Tumor-Regression in RAS-abhängigen Tumoren nachweisen (Mazieres et al, 2004). Erste klinische Phase II Studien zur Monotherapie mit Farnesyltransferase-Inhibitoren zeigen Wirksamkeit bei hämatologischen Erkrankungen wie akuter und chronischer myeloischer Leukämie, dem myelodysplastischen Syndrom sowie beim Mammakarzinom und bei Gliomen, wohingegen die

Ergebnisse bei Tumoren mit hoher RAS-Mutationsrate wie Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom und Blasenkarzinom bisher eher enttäuschend ausfielen (Sebti et al, 2004). Klinische Studien zum Einsatz dieser Substanzgruppe bei serösen Borderline-Tumoren des Ovars erscheinen aufgrund ihres molekularen Wirkmechanismus durchaus sinnvoll.

## 4.7 Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse dieser sowie anderer Studien legen die Vermutung nahe, daß SBOT eine heterogene Gruppe von Tumoren sind. K-RAS-Mutationen werden nur in einem Drittel der Fälle nachgewiesen, Mikrosatelliten-Instabilitäten (meist auf niedrigem Niveau) zeigen hingegen zwei Drittel (Haas et al, 1999c). Beide Phänomene könnten miteinander in Beziehung stehen (Diebold, 2001a), wie es für Kolonkarzinome bereits beschrieben wurde (Jass et al, 1999).

Fälle mit K-RAS-Mutationen weisen in der Regel dabei eine besonders niedrige Rate an LOH (Loss of heterozygosity) auf. Die Autoren schlossen daraus, daß diese Untergruppe in Folge der charakteristischen RAS-Onkogen-Aktivierung einen anderen molekularpathologischen Entwicklungsweg durchläuft und deshalb seltener mit LOH vergesellschaftet ist. Insgesamt wird Loss of heterozygosity bei SBOT selten beobachtet und komplexe genetische Aberrationen sind nur in einigen wenigen Fällen nachgewiesen worden (Diebold et al, 1996e; Diebold et al, 1996a; Diebold et al, 1996c; Diebold, 2001b; Haas et al, 1999b; Teneriello et al, 1993)

Die Ergebnisse der von uns durchgeführten Studie deuten daraufhin, daß die Wege, auf denen sich extraovarielle Manifestationen bei SBOT entwickeln, ebenfalls variieren können. In SBOT mit K-RAS-Mutationen könnte die Mehrheit der extraovariellen Herde aufgrund metastasenartiger Streuung entstanden sein, in den restlichen Fällen hingegen könnte ein multifokaler Entwicklungsmodus im Vordergrund stehen.

Möglicherweise liegt hier ein morphologisches Spektrum vor, das von primären peritonealen LMP-Tumoren bis hin zu serösen Borderline-Tumoren mit extrapelvinalen Metastasen reicht. Zumindest ein Fall unserer Studie weist daraufhin, daß eine multifokale Entwicklung und eine metastasenartige Streuung vom ovariellen Tumor gleichzeitig nebeneinander bestehen können. Offensichtlich müssen sich diese zwei Entstehungswege nicht notwendigerweise ausschließen.

Um die Frage nach der Herkunft extraovarieller Läsionen endgültig klären zu können, wäre eine Studie notwendig, in der mit mehreren unterschiedlichen genetischen Markern die ovariellen Herde sowie die assoziierten Läsionen vergleichend untersucht werden.

## 5. Zusammenfassung

K-RAS-Mutationen sind die häufigsten genetischen Veränderungen bei serösen Borderline-Tumoren des Ovars. Nach wie vor ist die Pathogenese der assoziierten ovariellen und extraovariellen Läsionen, die ein Spektrum von Müller-Inklusionszysten (Endosalpingiose) über Implantate bis hin zu kontralateralen LMP-Tumoren umfassen, ungeklärt. Um eine multifokale Entstehung dieser Herde von metastasenartiger Streuung zu unterscheiden, wurden diese Läsionen auf eine Mutation im K-RAS Onkogen hin untersucht.

Acht Fälle mit bekannter K-RAS-Mutation und zwei RAS-negative Fälle ohne RAS-Mutation wurden zum Vergleich analysiert. Insgesamt wurde DNA aus 58 in Paraffin eingebetteten und laser-mikrodissezierten ovariellen und extraovariellen Herden extrahiert (10 SBOT, 8 kontralaterale Tumoren, 25 Implantate, 15 Inklusionszysten, insgesamt 97 Proben). Es wurde das Codon 12 des Exon 1 des K-RAS-Onkogens auf Mutationen mit einer DGGE voruntersucht und die genaue Art der Mutation durch direkte Sequenzierung bestimmt.

In 12 von 14 SBOT und in 2 von 2 extraovariellen Implantaten konnte die K-RAS Mutation in verschiedenen Bereichen der gleichen Läsion gefunden werden. Sämtliche RAS-positive ovariellen Borderline-Tumoren, die mit einem kontralateralen Tumor assoziiert waren, wiesen in beiden Tumoren die identische Mutation auf (in einem Fall enthielt die oberflächliche Komponente des Borderline-Tumors eine zusätzliche zweite Punktmutation). In 4 von 5 RAS-positiven SBOT mit extraovariellen Läsionen wurden RAS-Mutationen auch in Implantaten (15/21 Implantate 71%) gefunden und seltener in Inklusionszysten (3/12 Läsionen, 25%). Alle extraovariellen Mutationen waren mit der des Ovars identisch (18/18 Läsionen, 100%). Bei den RAS-negativen Kontroll-Fällen ließ sich nur bei einem einzelnen Implantat eine RAS-Mutation nachweisen.

Die Tatsache, daß sich K-RAS-Mutationen in Müller-Inklusionszysten und Implantaten von SBOT nachweisen lassen, weisen daraufhin, daß es sich dabei um einen sehr frühen Schritt in der neoplastischen Transformation von ovariell und extraovariell serösem Epithel handelt. Die Ergebnisse dieser Studie legen die Vermutung nahe, daß die zwei postulierten pathogenetischen Mechanismen, die zur Entwicklung von Implantaten und Inklusionszysten führen sollen, nebeneinander koexistieren.

## 6. Literatur

Abu-Jawdeh GM, Jacobs TW, Niloff J, and Cannistra SA (1996). Estrogen receptor expression is a common feature of ovarian borderline tumors. *Gynecol Oncol* 60:301-307.

Alvarez AA, Moore WF, Robboy SJ, Bentley RC, Gumbs C, Futreal PA, and Berchuck A (2001). K-ras mutations in Mullerian inclusion cysts associated with serous borderline tumors of the ovary. *Gynecol Oncol* 80:201-206.

Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent-Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Zietz C, Troungos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JW, Croke CT, O'Donoghue DP, Giaretti W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesener R, de Goeij AF, Arends JW, Andersen SN, Lovig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OP, De Angelis PD, Meling GI, Rognum TO, Smith R, Goh HS, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubb VJ, Piris J, Cruickshank NR, Morton D, Fox JC, Al Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K, and Urošević N (2001). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 85:692-696.

Bio-Rad Laboratories(1983), The D Code Universal Mutation Detection System, Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstraße 164, D-80939 München

Bos JL (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49:4682-4689.

Broermann P, Junker K, Brandt BH, Heinecke A, Freitag L, Klinke F, Berdel WE, and Thomas M (2002). Trimodality treatment in Stage III nonsmall cell lung carcinoma: prognostic impact of K-ras mutations after neoadjuvant therapy. *Cancer* 94:2055-2062.

Burks RT, Sherman ME, and Kurman RJ (1996). Micropapillary serous carcinoma of the ovary. A distinctive low-grade carcinoma related to serous borderline tumors. *Am J Surg Pathol* 20:1319-1330.

Buttini M, Nicklin JL, and Crandon A (1997). Low malignant potential ovarian tumours: a review of 175 consecutive cases. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 37:100-103.

Chamberlin MD, Eltabbakh GH, Mount SL, and Leavitt BJ (2001). Metastatic serous borderline ovarian tumor in an internal mammary lymph node: a case report and review of the literature. *Gynecol Oncol* 82:212-215.

Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, Huang LW, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, and Mok SC (2000). Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 156:409-417.

Cuatrecasas M, Erill N, Musulen E, Costa I, Matias-Guiu X, and Prat J (1998). K-ras mutations in nonmucinous ovarian epithelial tumors: a molecular analysis and clinicopathologic study of 144 patients. *Cancer* 82:1088-1095.

Cuatrecasas M, Matias-Guiu X, and Prat J (1996). Synchronous mucinous tumors of the appendix and the ovary associated with pseudomyxoma peritonei. A clinicopathologic study of six cases with comparative analysis of c-Ki-ras mutations. *Am J Surg Pathol* 20:739-746.

de Nictolis M, Montironi R, Tommasoni S, Carinelli S, Ojeda B, Matias-Guiu X, and Prat J (1992). Serous borderline tumors of the ovary. A clinicopathologic, immunohistochemical, and quantitative study of 44 cases. *Cancer* 70:152-160.



- Demirel D, Laucirica R, Fishman A, Owens RG, Grey MM, Kaplan AL, and Ramzy I (1996). Ovarian tumors of low malignant potential. Correlation of DNA index and S-phase fraction with histopathologic grade and clinical outcome. *Cancer* 77:1494-1500.
- Denhardt DT (1996). Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J* 318 ( Pt 3):729-747.
- Diebold J (2001a). [Phenotype--genotype--correlation in ovarian neoplasia]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 85:153-160.
- Diebold J (2001b). [Phenotype--genotype--correlation in ovarian neoplasia]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 85:153-160.
- Diebold J, Baretton G, Felchner M, Meier W, Dopfer K, Schmidt M, and Lohrs U (1996a). bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas. *Am J Clin Pathol* 105:341-349.
- Diebold J, Deisenhofer I, Baretton GB, Blasenbren S, Suchy B, Schneiderbanger K, Meier W, Haas CJ, and Lohrs U (1996b). Interphase cytogenetic analysis of serous ovarian tumors of low malignant potential: comparison with serous cystadenomas and invasive serous carcinomas. *Lab Invest* 75:473-485.
- Diebold J, Deisenhofer I, Baretton GB, Blasenbren S, Suchy B, Schneiderbanger K, Meier W, Haas CJ, and Lohrs U (1996c). Interphase cytogenetic analysis of serous ovarian tumors of low malignant potential: comparison with serous cystadenomas and invasive serous carcinomas. *Lab Invest* 75:473-485.
- Diebold J, Seemuller F, and Lohrs U (2003). K-RAS mutations in ovarian and extraovarian lesions of serous tumors of borderline malignancy. *Lab Invest* 83:251-258.
- Diebold J, Suchy B, Baretton GB, Blasenbren S, Meier W, Schmidt M, Rabes H, and Lohrs U (1996d). DNA ploidy and MYC DNA amplification in ovarian carcinomas. Correlation with p53 and bcl-2 expression, proliferative activity and prognosis. *Virchows Arch* 429:221-227.
- Diebold J, Suchy B, Baretton GB, Blasenbren S, Meier W, Schmidt M, Rabes H, and Lohrs U (1996e). DNA ploidy and MYC DNA amplification in ovarian carcinomas. Correlation with p53 and bcl-2 expression, proliferative activity and prognosis. *Virchows Arch* 429:221-227.
- Dietel M and Hauptmann S (2000). Serous tumors of low malignant potential of the ovary. 1. Diagnostic pathology. *Virchows Arch* 436:403-412.
- Dix BR, Robbins PD, Spagnolo DV, Padovan GL, House AK, and Iacopetta BJ (1995). Clonal analysis of colorectal tumors using K-ras and p53 gene mutations as markers. *Diagn Mol Pathol* 4:261-265.
- Drescher CW, Flint A, Hopkins MP, and Roberts JA (1993). Prognostic significance of DNA content and nuclear morphology in borderline ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 48:242-246.
- Dubeau L (1999). The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? *Gynecol Oncol* 72:437-442.
- Eichhorn JH, Bell DA, Young RH, and Scully RE (1999). Ovarian serous borderline tumors with micropapillary and cribriform patterns: a study of 40 cases and comparison with 44 cases without these patterns. *Am J Surg Pathol* 23:397-409.
- Eltabbakh GH, Belinson JL, Kennedy AW, Biscotti CV, Casey G, and Tubbs RR (1997). p53 and HER-2/neu overexpression in ovarian borderline tumors. *Gynecol Oncol* 65:218-224.
- Enomoto T, Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, Nomura T, and Shroyer KR (1994). Analysis of clonality by amplification of short tandem repeats. Carcinomas of the female reproductive tract. *Diagn Mol Pathol* 3:292-297.

- Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, and Herman JG (2000). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 60:2368-2371.
- Fischer SG and Lerman LS (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1579-1583.
- Font A, Abad A, Monzo M, Sanchez JJ, Guillot M, Manzano JL, Pinol M, Ojanguren I, and Rosell R (2001). Prognostic value of K-ras mutations and allelic imbalance on chromosome 18q in patients with resected colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 44:549-557.
- Fujita M, Enomoto T, and Murata Y (2003). Genetic alterations in ovarian carcinoma: with specific reference to histological subtypes. *Mol Cell Endocrinol* 202:97-99.
- Garrett AP, Ng SW, Muto MG, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, and Mok SC (2000). ras gene activation and infrequent mutation in papillary serous carcinoma of the peritoneum. *Gynecol Oncol* 77:105-111.
- Gershenson DM, Silva EG, Levy L, Burke TW, Wolf JK, and Tornos C (1998). Ovarian serous borderline tumors with invasive peritoneal implants. *Cancer* 82:1096-1103.
- Gertig DM, Hunter DJ, Cramer DW, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, and Hankinson SE (2000). Prospective study of talc use and ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 92:249-252.
- Gilks CB, Alkushi A, Yue JJ, Lanvin D, Ehlen TG, and Miller DM (2003). Advanced-stage serous borderline tumors of the ovary: a clinicopathological study of 49 cases. *Int J Gynecol Pathol* 22:29-36.
- Girao MJ, Sartori MG, Goncalves WJ, and de Lima GR (1998). Peritoneal borderline cystoadenocarcinoma. *Rev Paul Med* 116:1634-1636.
- Godwin AK, Testa JR, and Hamilton TC (1993). The biology of ovarian cancer development. *Cancer* 71:530-536.
- Gramlich T, Austin RM, and Lutz M (1990). Histologic sampling requirements in ovarian carcinoma: a review of 51 tumors. *Gynecol Oncol* 38:249-256.
- Gu J, Roth LM, Younger C, Michael H, Abdul-Karim FW, Zhang S, Ulbright TM, Eble JN, and Cheng L (2001). Molecular evidence for the independent origin of extra-ovarian papillary serous tumors of low malignant potential. *J Natl Cancer Inst* 93:1147-1152.
- Haas CJ, Diebold J, Hirschmann A, Rohrbach H, and Lohrs U (1999a). In serous ovarian neoplasms the frequency of Ki-ras mutations correlates with their malignant potential. *Virchows Arch* 434:117-120.
- Haas CJ, Diebold J, Hirschmann A, Rohrbach H, Schmid S, and Lohrs U (1999c). Microsatellite analysis in serous tumors of the ovary. *Int J Gynecol Pathol* 18:158-162.
- Haas CJ, Diebold J, Hirschmann A, Rohrbach H, Schmid S, and Lohrs U (1999b). Microsatellite analysis in serous tumors of the ovary. *Int J Gynecol Pathol* 18:158-162.
- Haaften-Day C, Russell P, Boyer CM, Kerns BJ, Wiener JR, Jensen DN, Bast RC, Jr., and Hacker NF (1996). Expression of cell regulatory proteins in ovarian borderline tumors. *Cancer* 77:2092-2098.
- Hamilton TC, Fox H, Buckley CH, Henderson WJ, and Griffiths K (1984). Effects of talc on the rat ovary. *Br J Exp Pathol* 65:101-106.
- Harlow BL and Weiss NS (1989). A case-control study of borderline ovarian tumors: the influence of perineal exposure to talc. *Am J Epidemiol* 130:390-394.

- Harlozinska A, Bar JK, Sobanska E, and Goluda M (1997). p53, c-erbB-2 and p21ras expression in tumor effusion cells of patients with histopathologically different ovarian neoplasms. *Anticancer Res* 17:3545-3552.
- Henderson WJ, Joslin CA, Turnbull AC, and Griffiths K (1971). Talc and carcinoma of the ovary and cervix. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 78:266-272.
- Hesseling MH and De Wilde RL (2000). Endosalpingiosis in laparoscopy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 7:215-219.
- Hogdall EV, Hogdall CK, Blaakaer J, Christensen L, Bock JE, Vuust J, Glud E, and Kjaer SK (2003). K-ras alterations in Danish ovarian tumour patients. From the Danish "Malova" Ovarian Cancer study. *Gynecol Oncol* 89:31-36.
- Imai M, Hoshi T, and Ogawa K (1994). K-ras codon 12 mutations in biliary tract tumors detected by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis. *Cancer* 73:2727-2733.
- Iscovich J, Shushan A, Schenker JG, and Paltiel O (1998). The incidence of borderline ovarian tumors in Israel: a population-based study. *Cancer* 82:147-151.
- Izawa T, Obara T, Tanno S, Mizukami Y, Yanagawa N, and Kohgo Y (2001). Clonality and field cancerization in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Cancer* 92:1807-1817.
- Jacobs IJ, Kohler MF, Wiseman RW, Marks JR, Whitaker R, Kerns BA, Humphrey P, Berchuck A, Ponder BA, and Bast RC, Jr. (1992). Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: analysis by loss of heterozygosity, p53 mutation, and X-chromosome inactivation. *J Natl Cancer Inst* 84:1793-1798.
- Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, Meltzer SJ, Wright C, Searle J, Young J, and Leggett BA (1999). Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 52:455-460.
- Jimbo H, Hitomi Y, Yoshikawa H, Yano T, Momoeda M, Sakamoto A, Tsutsumi O, Taketani Y, and Esumi H (1997). Evidence for monoclonal expansion of epithelial cells in ovarian endometrial cysts. *Am J Pathol* 150:1173-1178.
- Jimbo H, Hitomi Y, Yoshikawa H, Yano T, Momoeda M, Yasugi T, Taketani Y, and Esumi H (1999). Clonality analysis of bilateral ovarian endometrial cysts. *Fertil Steril* 72:1142-1143.
- Kadar N and Krumerman M (1995). Possible metaplastic origin of lymph node "metastases" in serous ovarian tumor of low malignant potential (borderline serous tumor). *Gynecol Oncol* 59:394-397.
- Kaern J, Trope CG, and Abeler VM (1993a). 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* 71:1810-1820.
- Kaern J, Trope CG, Kristensen GB, Abeler VM, and Pettersen EO (1993b). DNA ploidy; the most important prognostic factor in patients with borderline tumors of the ovary. *Int J Gynecol Cancer* 3:349-358.
- Kupryjanczyk J, Thor AD, Beauchamp R, Merritt V, Edgerton SM, Bell DA, and Yandell DW (1993). p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4961-4965.
- Kurman RJ and Trimble CL (1993). The behavior of serous tumors of low malignant potential: are they ever malignant? *Int J Gynecol Pathol* 12:120-127.
- Lauchlan SC (1990). Non-invasive ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 9:158-169.

- Leake JF, Currie JL, Rosenshein NB, and Woodruff JD (1992). Long-term follow-up of serous ovarian tumors of low malignant potential. *Gynecol Oncol* 47:150-158.
- Link CJ, Jr., Kohn E, and Reed E (1996). The relationship between borderline ovarian tumors and epithelial ovarian carcinoma: epidemiologic, pathologic, and molecular aspects. *Gynecol Oncol* 60:347-354.
- Longo DL and Young RC (1979). Cosmetic talc and ovarian cancer. *Lancet* 2:349-351.
- Lu KH, Bell DA, Welch WR, Berkowitz RS, and Mok SC (1998). Evidence for the multifocal origin of bilateral and advanced human serous borderline ovarian tumors. *Cancer Res* 58:2328-2330.
- Malpica A, Deavers MT, Gershenson D, Tortolero-Luna G, and Silva EG (2001). Serous tumors involving extra-abdominal/extra-pelvic sites after the diagnosis of an ovarian serous neoplasm of low malignant potential. *Am J Surg Pathol* 25:988-996.
- Malumbres M and Pellicer A (1998). RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3:d887-d912.
- Mangues R, Seidman I, Gordon JW, and Pellicer A (1992). Overexpression of the N-ras proto-oncogene, not somatic mutational activation, associated with malignant tumors in transgenic mice. *Oncogene* 7:2073-2076.
- Mayr D, Amann G, Siefert C, Diebold J, and Andereg B (2003). Does endometriosis really have premalignant potential? A clonal analysis of laser-microdissected tissue. *FASEB J* 17:693-695.
- Mazieres J, Pradines A, and Favre G (2004). Perspectives on farnesyl transferase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett* 206:159-167.
- Menzin AW, Gal D, and Lovecchio JL (2000). Contemporary surgical management of borderline ovarian tumors: a survey of the Society of Gynecologic Oncologists. *Gynecol Oncol* 78:7-9.
- Modan B, Gak E, Sade-Bruchim RB, Hirsh-Yechezkel G, Theodor L, Lubin F, Ben Baruch G, Beller U, Fishman A, Dgani R, Menczer J, Papa M, and Friedman E (1996). High frequency of BRCA1 185delAG mutation in ovarian cancer in Israel. *National Israel Study of Ovarian Cancer. JAMA* 276:1823-1825.
- Mooney J, Silva E, Tornos C, and Gershenson D (1997). Unusual features of serous neoplasms of low malignant potential during pregnancy. *Gynecol Oncol* 65:30-35.
- Moore WF, Bentley RC, Berchuck A, and Robboy SJ (2000). Some mullerian inclusion cysts in lymph nodes may sometimes be metastases from serous borderline tumors of the ovary. *Am J Surg Pathol* 24:710-718.
- Mullis KB (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262:56-5.
- Murdoch WJ (1996). Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis. *Biol Rev Camb Philos Soc* 71:529-543.
- Mutter GL, Chaponot ML, and Fletcher JA (1995). A polymerase chain reaction assay for non-random X chromosome inactivation identifies monoclonal endometrial cancers and precancers. *Am J Pathol* 146:501-508.
- Okugawa K, Hirakawa T, Fukushima K, Kamura T, Amada S, and Nakano H (2001). Relationship between age, histological type, and size of ovarian tumors. *Int J Gynaecol Obstet* 74:45-50.
- Orsulic S, Li Y, Soslow RA, Vitale-Cross LA, Gutkind JS, and Varmus HE (2002). Induction of ovarian cancer by defined multiple genetic changes in a mouse model system. *Cancer Cell* 1:53-62.
- Ortiz BH, Ailawadi M, Colitti C, Muto MG, Deavers M, Silva EG, Berkowitz RS, Mok SC, and Gershenson DM (2001). Second primary or recurrence? Comparative patterns of p53 and K-ras

mutations suggest that serous borderline ovarian tumors and subsequent serous carcinomas are unrelated tumors. *Cancer Res* 61:7264-7267.

Pajkos G, Kiss I, Sandor J, Ember I, and Kishazi P (2000). The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res* 20:1695-1701.

Sakurazawa N, Tanaka N, Onda M, and Esumi H (2000). Instability of X chromosome methylation in aberrant crypt foci of the human colon. *Cancer Res* 60:3165-3169.

Sarkar FH, Valdivieso M, Borders J, Yao KL, Raval MM, Madan SK, Sreepathi P, Shimoyama R, Steiger Z, Visscher DW, and . (1995). A universal method for the mutational analysis of K-ras and p53 gene in non-small-cell lung cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol* 4:266-273.

Sebti SM and Adjei AA (2004). Farnesyltransferase inhibitors. *Semin Oncol* 31:28-39.

Segal GH and Hart WR (1992). Ovarian serous tumors of low malignant potential (serous borderline tumors). The relationship of exophytic surface tumor to peritoneal "implants". *Am J Surg Pathol* 16:577-583.

Seidman JD and Kurman RJ (1996). Subclassification of serous borderline tumors of the ovary into benign and malignant types. A clinicopathologic study of 65 advanced stage cases. *Am J Surg Pathol* 20:1331-1345.

Seidman JD and Kurman RJ (2000). Ovarian serous borderline tumors: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators. *Hum Pathol* 31:539-557.

Shih IM, Yan H, Speyrer D, Shmookler BM, Sugarbaker PH, and Ronnett BM (2001). Molecular genetic analysis of appendiceal mucinous adenomas in identical twins, including one with pseudomyxoma peritonei. *Am J Surg Pathol* 25:1095-1099.

Shushan A, Paltiel O, and Schenker JG (1999). Induction of ovulation and borderline ovarian cancer--the hormonal connection? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 85:71-74.

Sutton GP, Bundy BN, Omura GA, Yordan EL, Beecham JB, and Bonfiglio T (1991). Stage III ovarian tumors of low malignant potential treated with cisplatin combination therapy (a Gynecologic Oncology Group study). *Gynecol Oncol* 41:230-233.

Tavassoli, Fattaneh A. (2003), Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. World Health Organization Classification of Tumors : ISBN 92-832-2412-4

Teneriello MG, Ebina M, Linnoila RI, Henry M, Nash JD, Park RC, and Birrer MJ (1993). p53 and K-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Res* 53:3103-3108.

Trimble CL and Trimble EL (1994). Management of epithelial ovarian tumors of low malignant potential. *Gynecol Oncol* 55:S52-S61.

Trope C and Kaern J (1998). Management of borderline tumors of the ovary: state of the art. *Semin Oncol* 25:372-380.

Trope CG, Kristensen G, and Makar A (2000). Surgery for borderline tumor of the ovary. *Semin Surg Oncol* 19:69-75.

Tumorzentrum München (2001a), Gastrointestinale Tumoren, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge , 6. Auflage, Web-Seite: <http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/gastro/homepage.html>

Tumorzentrum München (2001b), Maligne Ovarialtumoren, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 6. Auflage, Web-Seite: <http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/ovar/homepage.html>

Wang J, Luo F, Lu JJ, Chen PK, Liu P, and Zheng W (2002). VEGF expression and enhanced production by gonadotropins in ovarian epithelial tumors. *Int J Cancer* 97:163-167.

Watzinger F. and Lion T. Ras family. *Atlas Genet.Cytogenet.Oncol.Haematol.* 1999.  
Ref Type: Electronic Citation

Zanetta G, Rota S, Chiari S, Bonazzi C, Bratina G, and Mangioni C (2001). Behavior of borderline tumors with particular interest to persistence, recurrence, and progression to invasive carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol* 19:2658-2664.

## 7. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Joachim Diebold, der mir dieses Thema überlassen hat, immer mit Enthusiasmus bei der Sache war, stets bei Fragen zur Verfügung stand und rasch und zuverlässig meine Arbeit Korrektur las. Er war in jeder Hinsicht ein vorbildlicher Doktorvater. Des weiteren möchte ich dem Leiter des Instituts für Pathologie der LMU München Prof. Udo Löhrs danken, der die Arbeit kontinuierlich unterstützte.

Darüber hinaus möchte ich ganz herzlich Astrid Hirschmann danken, die mich in das molekular-biologische Arbeiten eingeführt hat und mir stets voller Taten und Ideenreichtum zur Seite stand. Ihre Arbeit wurde von Christina Seifert in ebenso engagierter Weise fortgesetzt. Einen weiteren, wichtigen Beitrag hat auch Peter Endres geleistet, der mich unermüdlich zum weitermachen ermutigte und auch, obwohl als Germanist fachfremd, die Arbeit Korrektur ließ. Danken möchte ich auch Heike Melcher, die mich immer wieder in schweren Zeiten aufmunterte und mich auch zum Vollenden der Arbeit antrieb.

Der größte Dank gilt meinen Eltern. Zum einen waren sie stets interessiert am Fortgang der Arbeit und lasen natürlich ebenfalls Korrektur. Zum anderen unterstützen Sie mich kontinuierlich bei meiner Arbeit und ließen mir dabei die Freiheit meinen eigenen Weg zu gehen, indem sie an mich glaubten.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name Florian Seemüller  
 Geburtstag 29.07.74  
 Nationalität deutsch  
 Familienstand ledig

### Schulbildung:

1985 – 1994 Derksen Gymnasium, München

### Zivildienst:

1994 – 1995 Zivildienst als Pflegehelfer auf der Onkologie Station G21 im Klinikum Großhadern

### Studium:

1995 – 2002 Medizin Studium, Ludwigs-Maximilians-Universität München (LMU)

### Klinische Tätigkeit:

10/2002 – 02/2003 AiP auf der geschlossenen Station C-2 der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU  
 03/2003 – 04/2004 AiP in der Ambulanz für bipolare affektive Störungen an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU  
 seit 04/2004 Assistenzarzt in der Ambulanz für bipolare affektive Störungen an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU

### Doktor Arbeit:

seit 07/1998 Promotion an der LMU im Pathologischen Institut bei Prof. Dr. Diebold

### Veröffentlichungen:

08/2004 J. Diebold, G. Amann, F. Seemüller and D. Mayr: Diagnostic and molecular genetic pathology of serous borderline tumours of the ovary *Cur Diagn Pathol*, 10, 318-325  
 09/2003 Florian Seemüller, Heinz Grunze: Einsatz von Antikonvulsiva bei therapieresistenten Depressionen, Buch Kapitel in: Michael Bauer, Anne Berghöfer, Therapieresistente Depressionen. Aktueller Wissensstand und Leitlinien für die Behandlung in Klinik und Praxis, Springer Verlag, derzeit im Druck  
 08/2003 S. Dargel, F. Seemüller, C. Born, S. Dittmann & H. Grunze "Quetiapine as monotherapie in the treatment of bipolar disorders: a case series" Postersession auf dem Bipolar Research Festival in Prag  
 07/2004 F. Seemüller, S. Dittmann, N. Matzner, A. Forsthoff, B. Hummel, S. Dargel, W. E. Severus & H. Grunze: "Validierung der deutschen Life-Chart Methode" Postersession auf dem Research Festival in der psychiatrischen Klinik in München  
 02/2003: Diebold J, Seemüller F., and Lohrs U (2003): K-RAS Mutations in Ovarian and Extraovarian Lesions of Serous Tumors of Borderline Malignancy. *Lab Invest* 83:251-258

### Preise:

11/2003 Travel Award für die EFPM Bipolar-Konferenz in London am 17/18 Nov 2003