

**Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Kirchner

**Care for the rare: Prädiktive Biomarker für eine individualisierte Therapie
des Ovarialkarzinoms**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sophie Bühler

aus Memmingen

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Doris Mayr

Mitberichterstatter: PD Dr. Fabian Trillsch
Prof. Dr. Miriam Lenhard

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Elisa Schmoeckel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2021

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Epidemiologie	5
1.2. Histologie	5
1.2.1. Histologische Subgruppen	5
1.2.2. Häufigkeiten der einzelnen histologischen Subgruppen	6
1.2.3. Morphologie der untersuchten Subgruppen	7
1.3. Grading und Klassifikation	9
1.3.1. Grading	9
1.3.2. TNM-Klassifikation und FIGO-Stadien	9
1.4. Leitliniengerechte Therapie des Ovarialkarzinoms	11
1.4.1. Operative Therapie	11
1.4.2. Systemische Therapie	12
1.5. Prognose	13
1.6. Tumorgenese der Ovarialkarzinome	13
1.7. Tumorgenesewege in anderen Tumoren	15
1.7.1. ER und PR	15
1.7.2. PD-L1	15
1.7.3. MMR	16
1.7.4. Der MAPK/ERK Signalweg unter Beachtung des PI3K und des JAK-STAT Signalweges	17
1.7.5. BRAF	18
1.7.6. EGFR	19
1.7.7. ALK	19
1.7.8. HER2	20
1.8. Prädiktive Biomarker für target-basierte Therapieformen	20
1.8.1. ER und PR	20
1.8.2. PD-L1	21
1.8.3. BRAF	21
1.8.4. EGFR	22
1.8.5. ALK	22
1.8.6. HER2	22

2. Fragestellung	24
3. Material und Methoden	25
3.1. Patientenkollektiv	25
3.1.1. Patientenalter und Überlebensdaten.....	25
3.1.2. Histologie.....	25
3.2.3. Grading.....	26
3.2. Untersuchungsmaterial	27
3.3. Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte	27
3.3.1. Chemikalien.....	27
3.3.2. Verbrauchsmaterialien	30
3.3.3. Geräte.....	30
3.4. Reevaluation der Tumorgraduierung	33
3.5. Tissue-Micro Array (TMA)	33
3.6. Immunhistochemische Untersuchungen	35
3.6.1. IHC	35
3.6.2. ER IHC	36
3.6.3. PR IHC	36
3.6.4. Hormonrezeptorauswertung nach Remmele	36
3.6.5. p53 IHC	36
3.6.6. PD-L1 IHC	37
3.6.7. MSI	37
3.6.8. BRAF IHC.....	38
3.6.9. EGFR IHC	39
3.6.10. ALK IHC.....	40
3.6.11. HER2 IHC.....	40
3.7. Fluoreszenz in situ Hybridisierung	41
3.7.1. Allgemein.....	41
3.7.2. ALK FISH.....	42
3.7.3. HER2 FISH.....	43
3.8. Statistische Auswertung	43
4. Ergebnisse	44

4.1. Ergebnisse der Immunhistochemie	44
4.1.1. ER.....	44
4.1.1.1. ER Expression mit Korrelation zum histologischen Subtyp	45
4.1.1.2. ER Expression mit Korrelation zum Grading.....	45
4.1.1.3. ER Expression mit Korrelation zum Überleben.....	45
4.1.2. PR.....	46
4.1.2.1. PR Expression mit Korrelation zum Grading.....	48
4.1.2.2. Korrelation zwischen ER und PR Expression	48
4.1.3. p53-Mutation	48
4.1.3.1. Korrelation von p53-Mutation zu Histologie	49
4.1.3.2. Korrelation von p53-Mutation zu FIGO-Stadium	49
4.1.3.3. Korrelation von p53-Mutation zu T-Stadium.....	50
4.1.3.4. Korrelation von p53-Mutation zum Grading	50
4.1.3.5. Korrelation von p53-Mutation und dem Patientenalter bei Diagnose	50
4.1.4. PD-L1	50
4.1.4.1. Korrelation von PD-L1 Expression und Histologie	52
4.1.4.2. Korrelation von PD-L1 Expression zu Grading	53
4.1.4.3. Korrelation von PD-L1 Expression zu p53-Mutation	53
4.1.4.4. Korrelation von PD-L1 Expression zu PR-Expression	53
4.1.4.5. Korrelation von PD-L1 Expression zum Überleben	54
4.1.5. Mismatchreparatur Defekt.....	55
4.1.6. BRAF	59
4.1.6.1. Korrelation von BRAF zur Histologie.....	60
4.1.6.2. Korrelation von BRAF zu ER-Expression.....	60
4.1.6.3. Korrelation von BRAF zu PR-Expression.....	60
4.1.6.4. Korrelation von BRAF zum Überleben	60
4.1.7. EGFR.....	61
4.1.7.1. Korrelation von EGFR-Expression zu ALK-FISH.....	63
4.1.7.2. Korrelation von EGFR-Expression zur Histologie	63
4.1.7.3. Korrelation von EGFR-Expression und T-Stadium	64
4.1.7.4. Korrelation von EGFR und PD-L1.....	64
4.1.8. ALK-Expression.....	64
4.1.8.1. Korrelation von ALK-Mutation und Grading	65
4.1.9. HER2	66
4.2. Ergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Korrelation mit der Immunhistochemie	68
4.2.1. ALK-FISH	68
4.2.1.1. Korrelation von IHC zu FISH.....	70
4.2.1.2. Korrelation von ALK-FISH und ER-Expression.....	70
4.2.2. HER2-FISH	71

4.2.2.1. Korrelation von IHC und FISH.....	73
4.2.2.2. Korrelation von HER2-FISH zur Histologie	74
4.2.2.3. Korrelation von HER2-Amplifikation zu Grading	74
5. Diskussion	77
5.1. Überblick.....	77
5.2. Diskussion der Methoden.....	77
5.2.1. Patientenkollektiv	77
5.2.2. TMA.....	78
5.2.3. Immunhistochemische Färbungen	78
5.2.4. FISH	78
5.3. Diskussion der Ergebnisse	79
5.3.1. ER und PR	79
5.3.2. p53-Mutation	80
5.3.3. PD-L1	81
5.3.4. MSI.....	82
5.3.5. BRAF	82
5.3.6. EGFR.....	83
5.3.7. ALK.....	84
5.3.8. HER2.....	85
6. Zusammenfassung.....	87
7. Literaturverzeichnis	89
8. Tabellen-, Abbildungs- und Abkürzungsverzeichnis	95
8.1. Tabellenverzeichnis	95
8.2. Abbildungsverzeichnis	96
8.3. Abkürzungsverzeichnis	97
9. Danksagung.....	99

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie

Weltweit stellen maligne ovarielle Neoplasien ungefähr 30% aller Karzinome der weiblichen Genitalien dar. Die höchsten Inzidenzraten werden in ökonomisch fortgeschrittenen Ländern, namentlich Nordamerika, Nord- und Osteuropa, Australien, Neuseeland und Teilen Südamerikas, verzeichnet.(1)

Mit in Deutschland geschätzten 6900 Neuerkrankungen für das Jahr 2018 und gezählten 7250 im Jahr 2014 liegen maligne Tumoren der Ovarien und Adnexen in ihrer Inzidenz verglichen mit anderen gynäkologischen bösartigen Erkrankungen an dritter Stelle.(2) Bei den Gesamtkrebsneuerkrankungen nehmen sie Platzziffer fünf, nach Brust-, Darm-, Lungen- und Gebärmutterkörperkrebs ein.(3) Veranschaulichend erkrankt circa eine von 71 Frauen Zeit ihres Lebens in Deutschland an Eierstockkrebs. In den letzten Jahren ist ein leichter Rückgang an Neuerkrankungen zu vermerken. Meist betreffen bösartige Ovarialtumore ältere Frauen, sodass das mittlere Erkrankungsalter 2014 bei 70 Jahren lag. Ein kontinuierlicher Inzidenzanstieg lässt sich bis zum 85sten Lebensjahr verzeichnen.(2) 5-10% der bösartigen Erkrankungen treten vor dem 45sten Lebensjahr auf, diese sind meist im histologischen Typ den Keimzelltumoren zuzuordnen.(4)

1.2. Histologie

1.2.1. Histologische Subgruppen

Die aktuelle WHO-Klassifikation der Tumoren des Ovars von 2014 umfasst in Tabelle 1 aufgeführte, histologisch zu unterscheidende rein epitheliale Subtypen. Die gemischt epithelial-mesenchymalen Tumoren (Adenosarkom und Karzinosarkom) sind nicht Gegenstand der folgenden Untersuchungen.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation epithelialer Tumoren des Ovars 2014

Epitheliale Tumoren	Benigne	Borderline	Maligne
Seröse Tumoren	Seröses Zystadenom/ Adenofibrom/ Oberflächenpapillom	Seröser Borderlinetumor	Low-grade seröses Karzinom, High-grade seröses Karzinom
Muzinöse Tumoren	Muzinöses Zystadenom/ Adenofibrom	Muzinöser Borderlinetumor	Muzinöses Karzinom
Endometrioid Tumoren	Endometrioides Zystadenom/ Adenofibrom	endometrioider Borderlinetumor	Endometrioides Karzinom
Klarzellige Tumoren	Klarzelliges Zystadenom/ Adenofibrom	klarzelliger Borderlinetumor	Klarzelliges Karzinom
Brennertumoren	Brennertumor	Borderline-Brennertumor	Maligner Brennertumor
Seromuzinöse Tumoren	Seromuzinöses Zystadenom/ Adenofibrom	Seromuzinöser Borderlinetumor	Seromuzinöses Karzinom
Undifferenzierte Tumoren	-	-	Undifferenziertes Karzinom

(5)

Diese Arbeit beschäftigt sich mit malignen Tumoren epithelialen Ursprungs, den serösen, muzinösen, endometrioiden, klarzelligen, undifferenzierten und seromuzinösen Ovarialkarzinomen. Deshalb wird im Folgenden nur auf diese Subtypen weiter eingegangen.

1.2.2. Häufigkeiten der einzelnen histologischen Subgruppen

Die häufigste Form der Ovarialkarzinome stellt mit Abstand die der serösen (Zyst-)Adenokarzinome mit 62% dar. Diese Form wird gefolgt von muzinösen Adenokarzinomen mit ungefähr 5% und den klarzelligen Karzinomen, die circa 3% ausmachen. Endometrioides sowie seromuzinöse Karzinome machen jeweils unter einem Prozent aus und laufen in Abbildung 1 unter anderen Morphologien. Die Einteilung erfolgt anhand des prädominanten Typs.

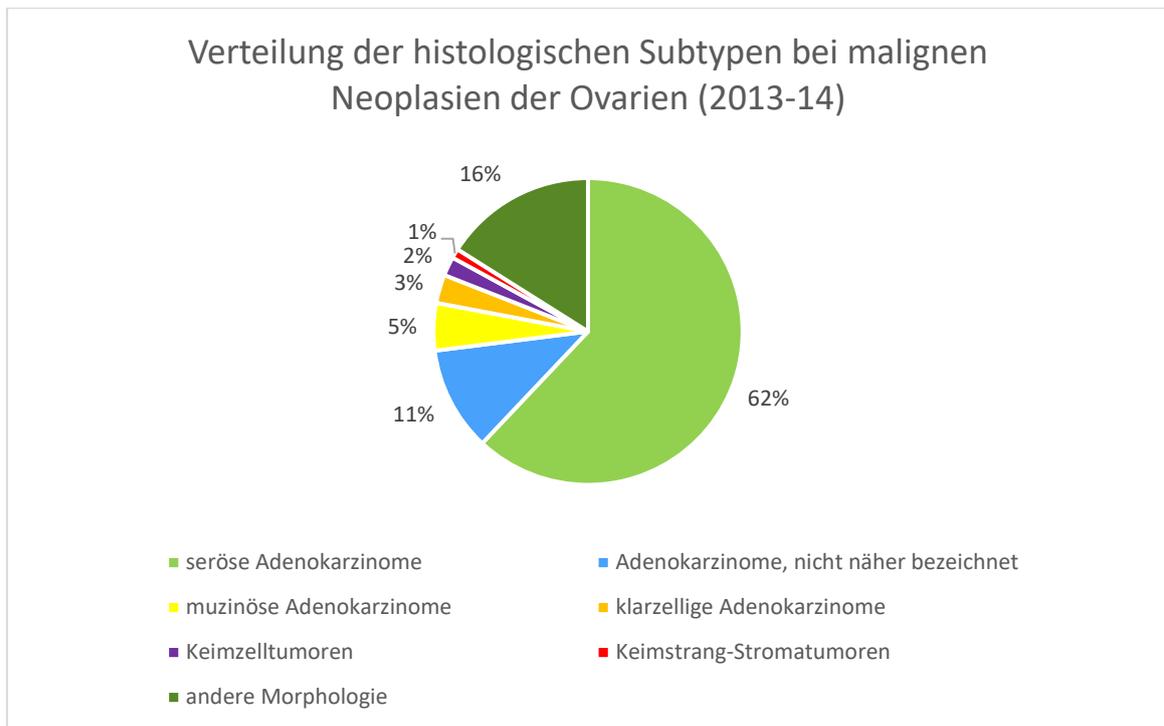


Abbildung 1: Verteilung der bösartigen Neubildungen der Eierstöcke nach histologischem Typ nach Robert Koch-Institut

(2)

1.2.3. Morphologie der untersuchten Subgruppen

Seröse high-grade Ovarialkarzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnose meist schon fortgeschritten und treten häufig bilateral auf. Makroskopisch weisen sie knotig-solide oder zystische Areale, herdförmige Nekrosen, Blutungen oder abgelöste Tumorfragmente auf. Mikroskopisch zeigen sich papilläre, adenoide, kribriiforme oder solide Anteile in unregelmäßiger Anordnung. Die seröse Proliferation besteht aus tubenschleimhautähnlichem Oberflächenepithel. Es finden sich polymorphe Zellkerne, basophiles Zytoplasma sowie atypische Mitosen. Bei den serösen low-grade Karzinomen zeigen sich uniforme Ansammlungen kleiner Zellen mit wenig bis mäßiger Zellkernatypie und signifikant niedriger mitotischer Aktivität, als bei high-grade Karzinomen. Es zeigen sich einzelne Zellen, sowie unregelmäßig geformte kleine Zellnester, die das Stroma infiltrieren. Nekrosen treten nahezu nie auf, wohingegen das Auftreten von Psammomkörpern häufig ist.(5) Meist liegt bei serösen Ovarialkarzinomen eine Expression des Östrogenrezeptors (ER) und Progesteronrezeptors (PR) vor.

Ovarialkarzinome vom muzinösen Typ sind häufig sehr groß und liegen in den meisten Fällen unilateral vor. Es zeigt sich ein zum Teil schleimiges zystisch-

Einleitung

solides gemischtes Bild mit charakteristischen Nekrosen. Unter dem Mikroskop betrachtet findet man schleimbildendes unregelmäßig mehrschichtiges Epithel, welches Drüsen aus dem Gastrointestinaltrakt ähnelt, mit zellulären Atypien. Zur Typisierung werden Periodic acid-Schiff (PAS)-Färbung und, wie auch bei den anderen Subgruppen, immunhistochemische Färbungen von Zytokeratinen verwendet.

Endometrioiden Subtypen weisen molekulare Ähnlichkeit mit endometrioiden Endometriumskarzinomen auf und treten in ungefähr 25% der Fälle beidseits auf. Sie sind von weicher Beschaffenheit mit eingebluteten Zysten und markigen soliden Anteilen, die durchsetzt von Nekrosen sind. Mikroskopisch ergibt sich das Bild von kribriformen Drüsenläschen und großen Nucleoli. Klassischerweise sind ER und PR positiv.

Bei den klarzelligem Karzinomen findet man makroskopisch uni- oder multilobuläre zystische Anteile gemischt mit soliden nodulären Bereichen. Mikroskopisch zeigen sich hellzellige polygonale Tumorzellen mit polymorphen Zellkernen und deutlicher Zellproliferation. Es finden sich tubuloglanduläre oder tubulozystische Formationen und in Zysten sogenannte hob-nail cells: knopfartig vorgewölbte hufeisenartige Zellen. Klarzellige Ovarialkarzinome weisen eine schlechte Differenzierung auf und sind meist für den ER negativ.(6)

Der Subtyp der seromuzinösen Ovarialkarzinome tritt erstmals in der WHO-Klassifikation von 2014 auf und wird aufgrund seiner variablen intra- und interindividuellen Morphologie sowie mit anderen Ovarialkarzinomen überlappender Immunhistochemie (IHC) kontrovers diskutiert.(7, 8) In den meisten Fällen tritt dieser Subtyp unilateral auf. Vorwiegend findet sich eine papilläre Architektur mit geringeren Anteilen an glandulärem, mikroglandulärem und solidem Wachstum. Dick bewandete Zysten, auch muskulär, finden sich in einer Vielzahl der Fälle. Morphologisch zeigen sich einige Überlappungen mit low-grade serösen, muzinösen, sowie endometrioiden Karzinomen.(8, 9)

1.3. Grading und Klassifikation

1.3.1. Grading

Die einzelnen histologischen Subtypen der Ovarialkarzinome werden nach WHO nach unterschiedlicher Differenzierung und Aggressivität einem unterschiedlichen Grading zugeführt. Seröse Ovarialkarzinome werden nach aktuellem Stand in low-grade (G1) und high-grade (G3) Karzinome mit unterschiedlichem Entstehungsweg eingeteilt. Muzinöse Tumoren werden 3-stufig graduiert. Klarzellige und seromuzinöse Karzinome sind aufgrund ihrer Aggressivität stets in die Gruppe der G3-Tumoren aufzunehmen, ebenso wie undifferenzierte Karzinome. Bei den endometrioiden Karzinomen erfolgt analog zum Endometriumkarzinom ein in 3 Gruppen gegliedertes Grading.(5)

1.3.2. TNM-Klassifikation und FIGO-Stadien

Große Bedeutung in der Therapieentscheidung und Prognose hat die Einteilung nach Tumour-Node-Metastasis (TNM) und nach der International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) welche in Tabelle 2 dargestellt wird.

Tabelle 2: TNM-Klassifikation und FIGO-Stadieneinteilung nach WHO

TNM	FIGO	Definition
TX		Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
T0		kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor auf Ovarien oder Tuben beschränkt
T1a	IA	auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1b	IB	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1c	IC	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte
T1c1	IC1	iatrogene Kapsel- (Serosa-)ruptur

Einleitung

T1c2	IC2	präoperative Kapsel- (Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
T1c3	IC3	maligne Zellen im Aszites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
T2b		Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien/Tuben/primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3		nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Metastasen \leq 10mm
N1b	IIIAii	Metastasen $>$ 10mm
T3a jedes N	IIIA2	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b jedes N	IIIB	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens \leq 2cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c jedes N	IIIC	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens $>$ 2cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder Milzkapsel ein

Einleitung

M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
M1a	IVA	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

(4)

1.4. Leitliniengerechte Therapie des Ovarialkarzinoms

Es erfolgt die primär operative Therapie, die in den meisten Fällen mit adjuvanter Chemotherapie mit Carboplatin ergänzt wird. In einigen Fällen können Poly-ADP-Ribose Polymerase Inhibitoren oder VEGF-Inhibitoren die Therapie komplementieren.

1.4.1. Operative Therapie

Primär erfolgt die operative Staginguntersuchung mittels Längsschnittdiagnostik, durch die die Inspektion und Palpation der gesamten Abdominalhöhle gelingt. Anschließend erfolgt die Entnahme einer Peritoneallavage, mehrerer Probebiopsien aus auffälligen und unauffälligen Bereichen, Adnexektomie, Hysterektomie, Omentektomie, gegebenenfalls Appendektomie (bei muzinösen Karzinomen oder unklarem Befund) und beidseitige pelvine und paraaortale Lymphonodektomie. Beim frühen muzinösen Karzinom kann auf die vollständige Lymphonodektomie verzichtet werden.

Bei unilateralem Befall im FIGO Stadium I kann nach Durchführung eines adäquaten Stagings bei Patientenwunsch ein fertilitätserhaltendes Verfahren vorgenommen werden.

Das Ziel der primären Debulking-Operation beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom ist die Erlangung von Tumorfreiheit. Das Gesamtüberleben hängt direkt vom Vorliegen einer makroskopisch vollständigen Resektion ab. Im Falle einer möglichen Kompletresektion müssen, wenn erforderlich, Multiviszeralresektionen interdisziplinär erfolgen.(4)

1.4.2. Systemische Therapie

Nach der Primäroperation erfolgt, abhängig vom Tumordifferenzierungsgrad und -stadium, die Gabe einer adjuvanten Chemotherapie. Die chemotherapeutischen Empfehlungen werden anhand der aktuellen Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie stadiengerecht ausgesprochen. Im Stadium FIGO IA G1 wird keine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Bei Patientinnen im Stadium FIGO IA G2 oder IB G1/2 kann eine platinhaltige Chemotherapie in Absprache mit der Patientin durchgeführt werden. Eine klare Indikation zur Durchführung einer platinhaltigen Chemotherapie über 6 Zyklen liegt im Stadium FIGO IC oder bei IA/IB mit G3 vor. Beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom besteht die Erstlinientherapie aus einer Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel, welches über 6 Zyklen im Anschluss an die Primäroperation verabreicht wird. Zusätzlich kann hier die Gabe des VEGF-Inhibitors Bevacizumab, für 12 bis 15 Monate, erwogen werden. Eine Verbesserung des Gesamtüberlebens konnte für Bevacizumab in Studien bei großer Tumorlast, im Stadium IV und beim high-grade serösen Subtyp gezeigt werden, bei geringer Verschlechterung der Lebensqualität. Liegt eine Breast Cancer -Mutation beim fortgeschrittenen high-grade Ovarialkarzinom vor, sollte der platinhaltigen Chemotherapie eine Erhaltungsdosis mit einem PARP-Inhibitor anschließen. Bei Rezidiven wird zwischen platinsensitiven und platinresistenten unterschieden. Bei Ersteren erfolgt die Therapie mit einer carboplatinhaltigen Kombinationstherapie. Ein Beispiel hierfür wäre die Gabe von Carboplatin, Gemcitabin und Bevacizumab. Bei den Platinresistenten wird eine Monochemotherapie mit Paclitaxel, Gemcitabin, Topotecan oder pegyliertem liposomalem Doxorubicin durchgeführt. Dies erfolgt gegebenenfalls wieder in Kombination mit Bevacizumab. Liegt eine BRCA-Mutation beim fortgeschrittenen high-grade Ovarialkarzinom vor, sollte der platinhaltigen Chemotherapie eine Erhaltungsdosis mit einem PARP-Inhibitor folgen. Bei Rezidiven eines high-grade Ovarialkarzinoms besteht weiterhin die Empfehlung einer Erhaltungstherapie mit PARP-Inhibitoren nach Remission auf eine platinhaltige Rezidivtherapie. Bei nicht mehr vorhandener Eignung für eine platinhaltige Rezidivtherapie, nach zwei oder mehr platinhaltigen Chemotherapien, ist bei platin-sensitivem Rezidiv eines high-grade Ovarialkarzinoms bei Vorliegen einer BRCA-Mutation die Monotherapie mit dem PARP-Inhibitor Rucaparib eine Option.(4)

1.5. Prognose

Rund 60% der Ovarialkarzinome werden erst in einem T3 Stadium entdeckt. Ursächlich sind hierfür zum einen die Aggressivität und zum anderen vor allem die lange symptomfreie oder nur gering einschränkende Erkrankungszeit vor Erstdiagnose zu nennen. Die ersten Anzeichen zeigen sich meist erst durch eine Bauchumfangsvermehrung aufgrund von Aszites.(2) Ein erfolgsversprechendes Screening-Verfahren ist bislang nicht in Aussicht.(4) Derzeit liegt das 5-Jahres-Gesamtüberleben bei 41%.(2) Im T1 Stadium entdeckte Karzinome besitzen demgegenüber ein 5-Jahres Überleben von circa 80%. Bei den serösen high-grade Karzinomen liegt das weltweite 5-Jahresüberleben bei lediglich 20%, in Deutschland sind es 35%. Im Allgemeinen ist festzuhalten, dass eher schlechte Überlebenschancen vorliegen, vor allem bei schlecht differenzierten oder undifferenzierten Karzinomen ist die Prognose sehr schlecht. Bislang etablierte Prognosefaktoren sind das Tumorstadium, der postoperative Tumorrest, das Patientenalter sowie der Allgemeinzustand, der histologische Typ, das Tumorgrading und die Durchführung einer leitliniengerechten Therapie.(4) Es ist anzunehmen, dass noch nicht alle Prognosefaktoren aufgedeckt wurden.

1.6. Tumorgenese der Ovarialkarzinome

Die Pathogenese der Ovarialkarzinome ist vielschichtig und hängt unter anderem auch von dem jeweiligen Subtyp ab. Es gibt diverse Hypothesen, welche darauf beruhen, dass die ovarielle Deckzellschicht als Ursprungsgewebe dient, da diese als einzige im Ovar epitheliale Merkmale aufweist. Die Ovulationshypothese geht davon aus, dass durch Ovulation wiederkehrende Traumata der Ovarien zur Tumorgenese führen. Diese Auffassung wurde in den letzten Jahrzehnten überwiegend vertreten. Aktuelle molekulargenetische Untersuchungen legen jedoch nahe, dass die Deckzellschicht nicht als alleiniger Ursprung stehen kann und die einzelnen Tumorentitäten durch unterschiedliche Mutationen entstehen.(6)

Aufgrund bisheriger Erkenntnisse geht man von verschiedenen Entstehungswegen bei den verschiedenen histologischen Ovarialkarzinomsubtypen aus. Für seröse Ovarialkarzinome wird für Borderline-Tumoren und low-grade Karzinomen eine andere Tumorgenese als für die high-grade Karzinome angenommen. Borderline-Tumoren weisen atypische

Epithelproliferationen vom Ausmaß zwischen benignen Zystadenomen und Karzinomen auf und sind im Wachstum nicht invasiv. Diese These wird durch die Erkenntnis gestützt, dass in Borderline und low-grade Karzinomen häufiger KRAS und BRAF Mutationen zu finden sind. KRAS und BRAF stellen Onkogene dar, die in die RAS-Mitogen-aktiviertes Protein (MAP)-Signalkaskade einspielen und somit bei Mutation eine Tumorpheriferation bewirken, die sich in einer Adenom-Borderline-Tumor-Karzinom-Sequenz wieder spiegelt. Bei serösen high-grade Karzinomen werden hingegen fast immer vermehrt Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 gefunden.(10, 11) Die serösen high-grade Karzinome gleichen hiermit sowohl im histologischem Muster, als auch in ihrer chromosomalen Instabilität dem serös tubaren intraepithelialen Karzinom. Eine vertretene Meinung hierzu ist, deshalb, dass die meisten serösen high-grade Ovarialkarzinome tubaren Ursprungs sind. Die Weltgesundheitsorganisation geht von dieser These zumindest für die Karzinome mit zusätzlicher BRCA 1 Mutation aus, da hier die meisten serös tubaren intraepithelialen Karzinome gefunden werden können.(4, 6) Bei muzinösen Karzinomen wird ein Hervorgehen aus muzinösen Borderlinetumoren angenommen, diese weisen dementsprechend auch häufig eine KRAS oder BRAF-Mutation auf. Aus einer atypischen Endometriose gehen vermutlich die endometrioiden und auch klarzelligen Karzinome hervor.(12)

In fortgeschrittenen Karzinomen zeigt sich eine große Vielzahl an genetischen Veränderungen, welche auch die Einsetzbarkeit von Therapien, welche lediglich auf ein Ziel gerichtet sind, in Frage stellt.(13)

Weiterhin sind derzeit hereditäre Mutationen bekannt, welche ursächlich an der Entstehung von Ovarialkarzinomen beteiligt sein können. Zum einen ist dies der Fall bei Patientinnen mit BRCA 1 oder 2 Mutation in der Keimbahn. Diese Mutation kann aber auch sporadisch auftreten. Weiterhin treten bei Patientinnen mit Li-Fraumeni-Syndrom, dem unter anderem eine seltene hereditäre p53-Mutationsform zugrunde liegt, neben Ovarialkarzinomen auch verschiedenste weitere inhomogene Tumorentitäten auf. Als drittes ist das Lynch-II-Syndrom oder das Hereditäre Nicht Polypöse Kolorektalkarzinom (HNPCC) bekannt. Hierbei besteht eine autosomal-dominante Keimbahnmutation, die zum Defekt der DNA-Mismatch-Reparatur (MMR) Gene MLH1, MSH2, MLH6 und PMS2 führt. Der entstehende Defekt wird auch als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet. In den meisten Fällen tritt dabei der endometrioiden Subtyp auf.(6)

Nach den BRCA-Mutationen ist ein Defekt der MMR die häufigste für Ovarialkarzinome verantwortliche auftretende erbliche Mutation. Für einen Defekt der MMR liegt eine Keimbahnmutation in circa 2%, eine sporadische Mutation in ungefähr 29% aller Ovarialkarzinome vor.(14)

1.7. Tumorgenesewege in anderen Tumoren

1.7.1. ER und PR

Östrogen sorgt für die physiologische Brustentwicklung, stimuliert aber auch Tumorwachstum. Über ERalpha und ERbeta, die als nukleäre ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren dienen, wird die Transkription moduliert. Den in der Brust prädominierenden Rezeptor ERalpha exprimieren 70-75% aller Mammakarzinome. Zusätzlich wird zur Transkriptionsmodulation der Co-Regulator FOXA1 benötigt, welcher die DNA aufspaltet. Die FOXA1-Expression ist wiederum wichtig für die ERalpha-Expression. Mehr als die Hälfte der ERalpha positiven Mammakarzinome sind auch für den PR positiv. Von dem PR gibt es ebenso zwei Formen, den PRA vermehrt in der Brust und den PRB entscheidend für das Ovar. Wichtig in der Karzinogenese ist das Verhältnis der beiden Rezeptoren zueinander. Progesteron bewirkt eine Vermehrung der Stammzellpopulation in der Brustdrüse und trägt somit einen Beitrag zur Karzinomentstehung bei. Weiterhin übermittelt Progesteron die Proliferation über parakrine Signale wie den „receptor activator of nuclear factor kB ligand“ (RANKL) und WNT4.(15, 16)

Ovarialkarzinome zeigen sich in ungefähr 35% PR positiv und in circa 65% ER positiv. Die höchsten Raten an PR-Positivität finden sich beim endometrioiden und low-grade serösen histologischen Subtyp. Für den ER sind dies seröse Karzinome, low-grade gefolgt von endometrioiden und serösen high-grade Karzinomen.(17)

1.7.2. PD-L1

Der „programmed death cell 1“ (PD-1) Rezeptor kommt auf Lymphozyten vor und begrenzt ihre Aktivierung. Die Expression seines Liganden PD-L1 geschieht auf antigenpräsentierenden Zellen - beispielsweise in Tonsillen oder Plazentagewebe. Die Bindung des Liganden führt dazu, dass die Immunantwort aufgrund einer fehlenden Reaktion der T-Zellen auf das präsentierte Antigen ausfällt. Wird nun in der Krebszelle PD-L1 exprimiert, kommt es zur Inhibition der

zytotoxischen Funktion der T-Zellen und somit zum Ausbleiben einer Immunantwort gegen die Tumorzelle.(18)

Als therapeutisches Ziel wird dieser Angriffspunkt über sogenannte Checkpoint Inhibitoren bei einer Reihe von Tumorentitäten genutzt, wie dem fortgeschrittenen Melanom, beim Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC), Nierenzellkarzinomen, Urothelkarzinomen und Hodgkin-Lymphomen.(19)

1.7.3. MMR

Die MMR Proteine sorgen für die Stabilität des Genoms, indem einzelne in Replikation und Rekombination entstandene Fehlbasen korrigiert werden. Dieser Vorgang erfolgt in einem Dreischritt. Die Detektion des Fehlers geschieht über einen MSH2-MSH6-Proteinkomplex oder durch einen MSH2-MSH3-Komplex. Als nächstes wird die fehlerhafte Base durch einen MLH1-PMS2-Komplex exzidiert. Über eine DNA-Ligase folgt die Resynthese und komplementiert somit die Korrektur. Hinweis auf das Vorliegen eines MMR-Defekts kann in den sogenannten Mikrosatelliten gefunden werden. Diese sind kurze repetitive DNA-Sequenzen, welche überall im Genom verteilt vorliegen. Durch Kopie kumulieren hier Fehler, das Genom der Mikrosatelliten erscheint instabil, und man spricht folglich von einem Vorliegen von MSI. Sehr selten sind von Keimbahnmutationen der MMR-Gene beide vorliegende Allele betroffen. Meist liegt ein vererbter Defekt in einem Allel vor und es kommt im Laufe des Lebens zu einer weiteren somatischen Mutation des anderen Allels. Das hieraus entstehende Krankheitsbild mit Ausfall der MMR bezeichnet man als Lynch-Syndrom.(20)

Ein Defekt in MMR-Genen kann aber auch rein sporadisch, also somatisch auftreten. Ein solcher Defekt kann laut Literatur in circa 10% der klarzelligen, endometrioiden und serösen Ovarialkarzinome beobachtet werden. Tumoren mit Defekt in den MMR-Genen weisen eine erhöhte Expression von Immuncheckpointgenen auf. Dies weist darauf hin, dass diese Tumoren möglicherweise gut auf Immuntherapien ansprechen könnten. Eines dieser Therapieansatzpunkte wäre zum Beispiel PD-L1, dessen immunhistochemische Expressionsanalyse auch Teil dieser Arbeit ist. In klarzelligen Karzinomen konnte bei Vorliegen einer MSI eine vermehrte Expression von PD-L1 gezeigt werden.(13)

1.7.4. Der MAPK/ERK Signalweg unter Beachtung des PI3K und des JAK-STAT Signalweges

Der „Mitogen-aktivierte Proteinkinase/extrazellulär Signal reguliert“ (MAPK/ERK)-Signalweg gehört zu der Familie der MAPK-Signalwege, die aus drei weiteren eigenständigen Signalwegen besteht. Allen gemeinsam ist das Vorkommen zweier Serin-Threoninkinasen und einer doppel-spezifischen Threonin-Thyrosinkinase. Der MAPK/ERK-Signalweg wird durch Aktivierung von transmembranären Rezeptoren wie dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), dem platelet-derived Wachstumsfaktorrezeptor (PDGFR) und dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor (VEGFR) initiiert. Über Adapterproteine werden nun RAS-Proteine aktiviert. Diese führen dann wiederum zur Aktivierung von A-RAF, B-RAF oder C-RAF/RAF-1, den MAPK-Kinase-Kinasen. Kaskadenartig setzt sich die Aktivierung fort bei den MAPK-Kinasen MEK1/2 und schließlich der MAPK ERK1/2. Die ERK-Phosphorylierung führt zu multipler Substrataktivierung, wodurch es zur Zellproliferation kommt. Zunächst befindet sich ERK im Zytoplasma und sorgt hier über Veränderung zytoskeletaler Proteine zur Zellbewegung, Adhäsion und Aktivierung weiterer Signalwege. Im Bereich des Nucleolus nimmt ERK Einfluss auf die Regulation der Transkription, was zur DNA-Synthese und Zellzyklusprogression führt. Somit kommt es also zur Zellproliferation und Invasion, was bei Überaktivität durch Mutation in einem der beteiligten Faktoren zur Tumorentstehung beitragen kann. Durch die Stimulation von Wachstumsfaktorrezeptoren kommt es neben der Aktivierung des MAPK/ERK-Weges zusätzlich zur Aktivierung des Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Signalwegs. Dieser Signalweg mündet in der Aktivierung von Protein Kinase B (AKT) welche über zytoplasmatische Zielproteine wie GSK3 und p70RSK zur Zellproliferation und zum Anabolismus führen.(21, 22)

Der „Januskinasen–signal transducer and activation of transcript“ (JAK-STAT) Signalweg reguliert die Transkription über Zytokinrezeptoren welche nach Zytokinbindung zu einer Phosphorylierung von STAT über die JAK führen. So aktiviert übermitteln die STAT-Moleküle das Signal und aktivieren die Transkription. Durch Mutation kann eine Inaktivierung oder eine konstitutionelle Aktivierung dieses Signalwegs erfolgen.(23)

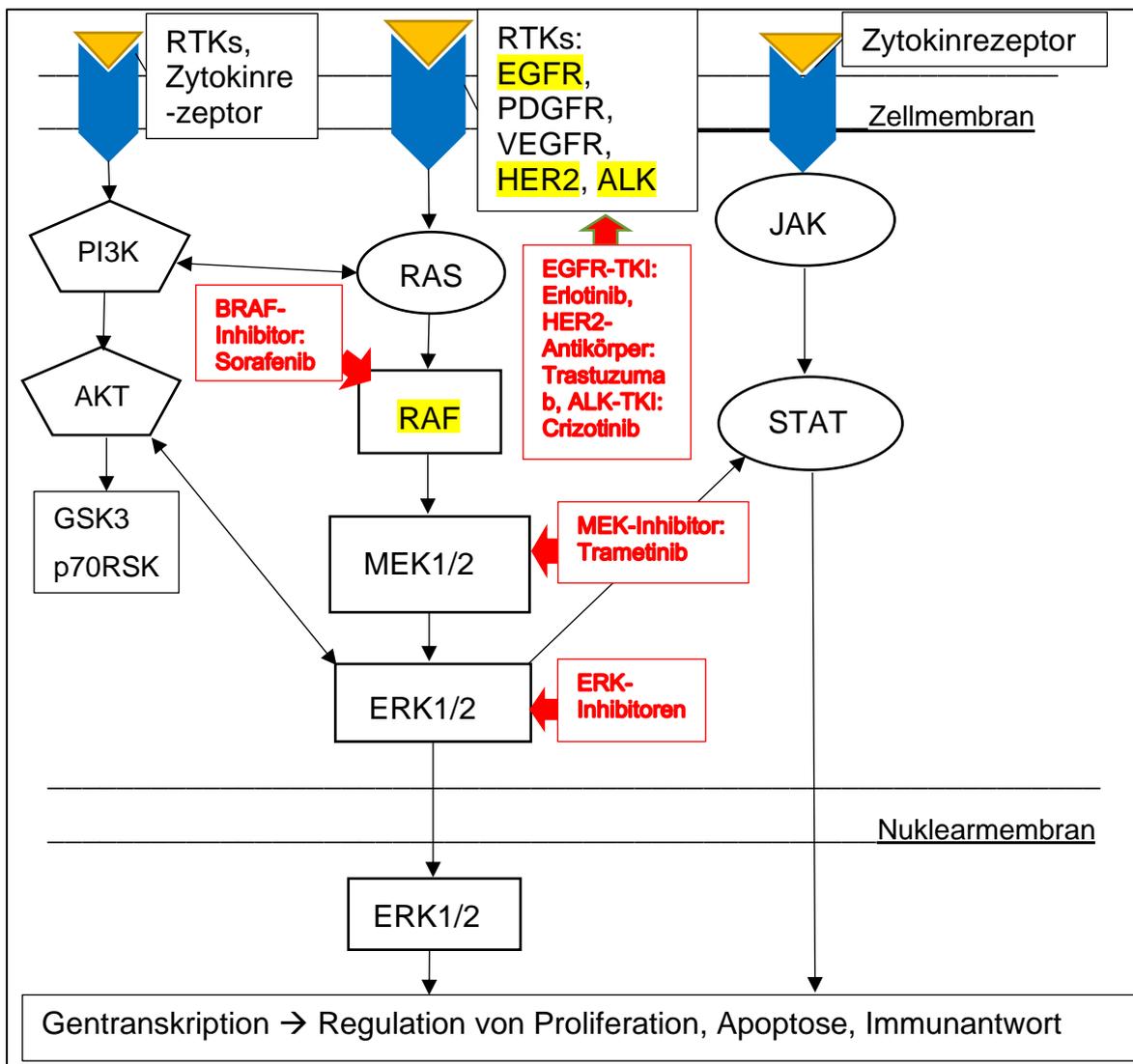


Abbildung 2: MAPK-, PI3K und JAK/STAT Signalwege, **untersuchte Biomarker** und Beispiele möglicher Therapieansatzpunkte

(21, 22)

1.7.5. BRAF

BRAF ist das codierende Gen für die B-Typ RAF-Kinase. Die häufigste Mutation, die V600E-Mutation, ist eine Punktmutation, bei der es zum Aminosäureaustausch von Valin zu Glutamat kommt. Dies führt einerseits über die Aktivierungsschleife, andererseits über eine veränderte Adenosindiphosphat (ADP)-Bindung zu einer Aktivierung des RAS/RAF/MAPK Signalweges. Diese Überaktivierung führt zur Blockierung der Apoptose und reguliert die Proliferation und Invasivität.(24) Am häufigsten tritt eine BRAF-Mutation in malignen Melanomen auf, wo sie in 40-60% gefunden werden kann. Weiterhin häufig liegt sie bei kolorektalen Karzinomen und Tumoren des Ovars mit niedrigem Malignitätsgrad vor. Seltener treten Mutationen in anderen Tumoren auf, wie zum

Beispiel in hepatozellulären Karzinomen, Gliomen, Bronchialkarzinomen oder Mammakarzinomen.(25)

In serösen low-grade Karzinomen des Ovars tritt eine BRAF-Mutation in weniger als 10% der Fälle auf. In diesen konnte eine V600E BRAF Mutation eine bessere Prognose, verglichen mit dem Wildtyp, aufweisen.(13)

1.7.6. EGFR

Der EGFR ist ein transmembranöser Rezeptor, der im HER1 Gen codiert wird. Er besteht aus einer extrazellulären Domäne mit Bindungsstelle für Wachstumsfaktoren, einem membranösen Teil und einem intrazellulären Abschnitt mit intrinsischer Protein-Tyrosinkinase-Aktivität. Die Rezeptortyrosinkinase wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert und führt zur Aktivierung von Signalkaskaden, wie der zuvor beschriebenen RAS/RAF/MAPK-Kaskade.(26) Somit ist EGFR ein Schlüsselsignalmolekül und steuert Zellproliferation, Migration und Invasion und führt somit zur Tumorentstehung.(27) Die Expression korreliert in anderen Tumorarten mit geringem Überleben und rascher Tumorprogression.(28) Beim NSCLC kann eine EGFR-Mutation in 10-30% der Fälle festgestellt werden. Weitere Tumorentitäten mit dem EGFR als Therapieziel sind beispielsweise Kolonkarzinome oder Tumoren des Hals-Kopf-Bereiches.(29)

1.7.7. ALK

Beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom kann in circa 4% der Fälle eine Translokation im Gen für die anaplastische Lymphomkinase (ALK) festgestellt werden, beim Neuroblastom sind es sogar fast 10%.(30) Hierdurch entsteht das „echinoderm microtubule associated protein like 4“ (EML4)/ALK Fusionsgen, welches zur ALK-Expression führt. Beim Erwachsenen wird ALK physiologisch lediglich in einigen Neuronen exprimiert. Die neu entstandene Expression der Rezeptortyrosinkinase (RTK) führt zur unkontrollierten Zellproliferation und Herabsetzung der Apoptose via Regulation verschiedener Signalwege, wie dem RAS-MAPK, PI3K-AKT, oder dem JAK-STAT.(31)

1.7.8. HER2

Der HER2 ist eine Rezeptortyrosinkinase für Wachstumsfaktoren, welcher bei Brustkrebs in 20 bis 30% überexprimiert wird. Über die Bindung von Wachstumsfaktoren werden zuvor beschriebene Kaskaden, wie der RAS-MAPK-Signalweg und der PI3K-AKT-Signalweg, aktiviert. Der für HER2 beschriebene MAPK-Signalweg endet mit der Aktivierung der Src-homology 2 domain-containing phosphatase 2 (SHP2), welche die Transkription reguliert und zur Tumorentstehung und Tumorprogression führt. Eine Herunterregulierung verschiedener microRNAs (miRNA) wurde bei HER2 positiven Karzinomen beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass beispielsweise mi489 bei Überexpression das Zellwachstum inhibiert. Diese miRNA ist bei HER2 positivem Mammakarzinom vermindert exprimiert. Auch beim NSCLC und beim squamösen Hypopharynxzellkarzinom konnte eine Verminderung festgestellt werden.(22, 32, 33)

Beim Ovarialkarzinom liegt eine Überexpression von HER2 in bis zu 35% aller Fälle vor.(34)

1.8. Prädiktive Biomarker für target-basierte Therapieformen

1.8.1. ER und PR

Beim Mammakarzinom ist eine endokrine antihormonelle Therapie fester Bestandteil der Behandlungsleitlinien. Dies geschieht mittels Tamoxifen, einem selektiven ER-Modulator, Aromatasehemmer oder Ovarialsuppression mittels gonadotropen Releasinghormon (GnRH)-Analoga oder bilateraler Ovariectomie.(35)

Eine Hormontherapie am Ovarialkarzinom wurde bisher nur in kleinen Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht. Eine Cochrane Analyse ist limitiert durch das Fehlen einer ausreichend großen randomisierten Studie und ergibt Ansprechraten von 0-56%.(13)

1.8.2. PD-L1

Monoklonale Antikörper gegen den PD-1 Rezeptor oder PD-L1 können zu Immunantworten gegen maligne Neoplasien führen.(18)

Die beiden bekanntesten Antikörper gegen PD-1 sind Nivolumab und Pembrolizumab und werden bei Melanomen, NSCLCs, Urothelkarzinomen und Hodgkin-Lymphomen angewendet. Antikörper, die PD-L1 binden, sind unter anderem MPDL3280A, MEDI4736 und BMS-936559. Für Nivolumab konnten Erfolge beim platinresistenten Rezidiv von Ovarialkarzinomen gezeigt werden. Bei kolorektalen Karzinomen können nur bei vorhandener Mikrosatelliteninstabilität Erfolge mit anti-PD-1 Antikörpern erzielt werden.(19) Pembrolizumab ist auch bei gynäkologischen Tumoren mit MMR-Defekt von der amerikanischen Food and Drug Administration zugelassen.(13)

1.8.3. BRAF

Die Testung von BRAF-Inhibitoren begann mit Sorafenib am malignen Melanom, bei dem die BRAF-Mutation am häufigsten detektiert werden kann. Sorafenib ist ein Multityrosinkinaseinhibitor, gerichtet auf BRAF, CRAF, PDGFR, VEGFR2, p38 und dem Stammzelleffektor-Rezeptor (CKIT). Da die klinischen Ergebnisse von Sorafenib in Studien eher enttäuschend waren, wurden potentere und selektivere BRAF-Inhibitoren entwickelt. Diese sind PLX4032, GSK2118436, Vemurafenib und Dabrafenib und konnten bessere klinische Erfolge zeigen. Auch für weiter unten im MAPK-Signalweg stehende Kinasen gibt es Inhibitoren. MEK-Inhibitoren sind beispielsweise AZD6344, GSK1120212, PD-0325901, AS703026 und Trametinib. Auch ERK-Inhibitoren sind mögliche Angriffspunkte sowie eine Kombination mehrerer Signalwegsinhibitoren mit unterschiedlichen Ansatzpunkten.(36, 37)

Außerhalb des malignen Melanoms finden BRAF-Inhibitoren Anwendung beim NSCLC und in Kombination mit EGFR-Inhibitoren bei kolorektalen Karzinomen.(38, 39)

1.8.4. EGFR

Erlotinib und Gefitinib sind die ersten beiden EGFR-gerichteten Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs), die bei NSCLC und Pankreaskarzinomen Anwendung finden. Vandetinib wird beim medullären Schilddrüsenkarzinom verwendet.

Lapatinib ist ein dualer TKI für EGFR und HER2 und somit beim HER2 positiven Mammakarzinom zugelassen. Weitere EGFR-Inhibitoren sind Afatinib, welches zusätzlich auch den EGFR Wildtyp inhibiert und Rocilitinib oder AZD9291 mit höherer Mutantenselektivität und verbesserter Verweildauer am Ziel.(40)

Cetuximab ist ein direkter Antikörper gegen EGFR und wird bei Hals-, Kopf-, Kolon-, Pankreaskarzinomen und NSCLC in klinischen Studien getestet.(28)

Eine EGFR-Expression ist in bis zu 90% beim Ovarialkarzinom vorhanden. In Studien mit Tyrosinkinaseinhibitoren zeigten sich Ansprechraten von 0-6% bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen und kein Überlebensvorteil bei stabiler Erkrankung nach Erstlinien-Chemotherapie.(27)

1.8.5. ALK

Der erste ALK-Inhibitor Crizotinib ist ein TKI von ALK, ROS1 und MET. Er wird aktuell als Erstlinien-Therapie beim NSCLC angewendet. Bei Rezidiven und weiterer ALK-Expression finden neuere ALK-Inhibitoren Verwendung. Beispielfhaft seien hier Certinib, Alectinib, AP26113, ASP3026, TSR-011 und Brigatinib genannt. In anderen Tumoren fand Crizotinib bereits Anwendung bei inflammatorischen myofibroblastischen Sarkomen, anaplastischen großzelligen Lymphomen und Neuroblastomen.(41, 42)

Bei serösen Ovarialkarzinomen konnte eine ALK-Expression in 2-4% der Fälle festgestellt werden und ein Ansprechen auf ALK-Inhibitoren ist wahrscheinlich.(43) Präklinisch zeigt eine Kombination von Crizotinib mit Cisplatin beim Ovarialkarzinom positive Effekte, ohne dass der genaue Mechanismus geklärt wäre.(44)

1.8.6. HER2

Die Trastuzumab-Gabe beim HER2-überexprimierenden Mammakarzinom ist etablierte Praxis.(35) Beim Magenkarzinom findet Trastuzumab des Weiteren seit Jahren Anwendung. Trastuzumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre HER2-Domäne. Es blockiert die Spaltung und somit die Aktivierung

der Rezeptortyrosinkinase sowie die Dimerisierung des Rezeptors. Trastuzumab führt schließlich über antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität zur Tumorzelllyse.(45)

Neben diesem bekannten Vertreter gibt es noch weitere HER2-gerichtete Medikamente. Pertuzumab ist ebenso ein monoklonaler Antikörper, der die HER2-Dimerisierung inhibiert und Trastuzumab ähnlich in der Wirkweise ist. Bei Lapatinib handelt es sich um einen dualen Tyrosinkinaseinhibitor, der intrazellulär an der Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungsstelle der Proteinkinasedomäne von HER2 bindet. Hierdurch wird die Autophosphorylierung der Tyrosinkinase verhindert, wodurch es zum Ausbleiben der Aktivierung der untergeordneten Signalwege kommt und somit das Tumorzellwachstum verhindert wird. Des Weiteren gibt es einen kombinierten Wirkstoff mit dem Namen Trastuzumab Emtasine. Es handelt sich um eine Kombination der zielgerichteten Therapie mit Chemotherapie und führt dadurch zu geringerer Toxizität der Chemotherapie, da diese nur die HER2-positiven Zellen ansteuert. Weiterhin sind Kombinationen der einzelnen Wirkstoffe Gegenstand von aktuellen Untersuchungen um der Resistenzbildung entgegenzuwirken.(46)

Trotz hoher Expressionsraten von HER2 bei Ovarialkarzinomen findet Trastuzumab keine klinische Anwendung aufgrund unzureichendem Therapieansprechen in klinischen Studien. Ein neuerer möglicher Therapieansatzpunkt in der präklinischen Forschung ist beispielsweise die Verwendung von einsträngigen HER2-Antikörper-basierten Immunotoxinen, kombiniert mit einer photochemischen Aktivierung. Diese Immunotoxine versprechen eine stärkere Wirksamkeit gegenüber den monoklonalen Antikörpern. Der ansonsten limitierende Faktor der ungezielten Zytotoxizität wird durch die Verwendung von Typ I Ribosomen-inaktivierendes Protein ausgeschaltet. Auf diesem Protein basierenden Immunotoxinen fehlt eine Domäne, die das Toxin von Endosomen ins Zytosol bringt. Durch photochemische Internalisierung kann mittels einem Photosensitizer, welcher bei Lichtexposition entsprechender Wellenlänge in Endosomenmembranen akkumuliert und zur Bildung von Sauerstoffradikalen führt, eine gezielte Freisetzung aus den Endosomen erreicht werden.(34)

2. Fragestellung

Aufgrund der im Vorangehenden dargestellten schlechten Prognose des Ovarialkarzinoms besteht Bedarf nach neuen Therapieoptionen. Da molekulargenetische Unterschiede in die leitlinienkonforme Therapie bislang kaum eingehen, stellt sich die Frage nach weiteren zielgerichteten Therapien, wie bereits bei anderen Krebsformen etabliert. Um solche zielgerichteten Therapiemöglichkeiten anbieten zu können und somit eine mögliche Prognoseverbesserung zu erwirken, ist die Untersuchung molekulargenetischer Faktoren der Karzinogenese erforderlich. Beim Ovarialkarzinom ist aufgrund einer großen Diversität an Mutationen der Karzinogeneseweg der einzelnen histologischen Subgruppen noch nicht letztlich erfasst. In dieser Arbeit werden deshalb Biomarker untersucht, welche in anderen Tumorentitäten bereits als Angriffspunkt zielgerichteter Therapie dienen oder Hinweise auf deren Verwendbarkeit geben.

Die Fragestellung ist somit,

ob und mit welcher Häufigkeit diese Mutationen und Expressionsmuster am Ovarialkarzinom vorkommen,

ob die gewählten Untersuchungen als Screeningverfahren Verwendung finden können und letztlich,

ob eine Übertragung der bereits existierenden spezifischen Therapieformen sinnvoll ist.

Des Weiteren werden die Zusammenhänge mit dem Überleben der einzelnen Faktoren dargestellt, um mögliche Prognosefaktoren darzustellen. Die Untersuchung der Beziehungen der einzelnen Faktoren untereinander wird zusätzlich durchgeführt, um mögliche Zusammenhänge aufzudecken, die einen genaueren Einblick in die Karzinogenese geben können.

3. Material und Methoden

3.1. Patientenkollektiv

Anhand des Tumorregisters der Universitätskliniken der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München wurden 299 Patientinnen mit der Diagnose eines Ovarialkarzinoms aus den Jahren 2003-2006 zur Untersuchung selektiert. Demnach wurden alle Patientinnen in der Frauenklinik des Klinikums Großhadern oder der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, LMU Innenstadt, operiert. Das dabei gewonnene Material wurde, nach Formalinfixierung, in Paraffin eingebettet und als Paraffinblock archiviert. Ausschlusskriterien waren das Vorliegen eines nicht-epithelialen Karzinoms, Keimzelltumors oder eines Borderline-Tumors, sowie das Fehlen einer ausreichenden Gewebeprobe.

3.1.1. Patientenalter und Überlebensdaten

Das Lebensalter der Patientinnen bei Erstdiagnose lag zwischen 23,85 und 93,54 Jahren, bei einem Altersdurchschnitt von 61,43 Jahren. Hierbei beträgt die Standardabweichung 12,078. Der Median liegt bei 62,90 und der Modalwert bei 64,38.

Aus den Daten des Tumorregisters München konnte in 297 Fällen das Überleben ermittelt werden. In lediglich 2 Fällen (0,7%) fehlt ein vollständiges Follow-Up. Bis 2014 sind 173 Patientinnen (57,9%) tumorabhängig verstorben. 20 Patientinnen (2,3%) sind ebenfalls verstorben, davon in sieben Fällen tumorunabhängig. Bei den übrigen 13 Patientinnen (4,3%) ist die Todesursache nicht bekannt. 104 Patientinnen (34,7%) der untersuchten Fälle lebten 2014 noch. Im Mittel überlebten die Patientinnen 1347,51 Tage mit einer Standardabweichung von 1062,347. Hierbei betrug die minimale Überlebenszeit 0 Tage, die maximale Überlebenszeit 3953 Tage.

3.1.2. Histologie

Bei den untersuchten Fällen handelte es sich ausschließlich um Karzinome, bei denen der seröse Subtyp mit 247 Fällen (82,6%) die größte Häufigkeit aufwies. Hierbei fielen in die Gruppe der high-grade Karzinome insgesamt 223 Fälle (74,6%). Die low-grade Karzinome machten 24 Fälle (8,0%) des gesamten Kollektivs aus. Am zweithäufigsten traten endometrioiden Karzinome mit 23 Fällen

(7,7%) auf, gefolgt von der Gruppe der muzinösen Karzinome, die bei 13 Fällen (4,3%) lag. Die undifferenzierten Karzinome lagen bei 8 Fällen (2,7%). Am seltensten konnten die histologischen Typen des klarzellig und des seromuzinösen Subtyps, jeweils mit einem Anteil von 4 Fällen (1,3%), beobachtet werden. Da der seromuzinöse Subtyp erst seit 2014 besteht, erfolgte die histologische Zuteilung der 4 vorliegenden Fälle erst im Nachhinein. Zwischen Histologie und Überleben besteht kein signifikanter Zusammenhang.

3.2.3. Grading

Beim kompletten Patientenkollektiv lag ein Grading vor. Alle ursprünglich als G2 eingestuften Tumoren des serösen Subtyps wurden gemäß neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse den Gruppen G1 oder G3 zugeordnet, wie unter dem Punkt Nachgrading beschrieben. Der Hauptteil der das Patientenkollektiv umfassenden Fälle musste mit 80,3% den G3 Tumoren zugeordnet werden. Die niedrig eingestuften G1 Tumoren machten 11,4% aus. Die Gruppe derer, die G2 zugeordnet wurden, lag lediglich bei 8,4%. Zwischen Grading und Überleben besteht kein signifikanter Zusammenhang.

Tabelle 3: Übersicht über Patientendaten und histopathologische Parameter

Alter (Jahre)	
Durchschnitt	61
Minimum	23
Maximum	93
FIGO	N (%)
	32 (10,7)
I	21 (7,0)
II	196 (65,6)
III	47 (15,7)
IV	
Grading	N (%)
G1	34 (11,4)
G2	25 (8,4)
G3	240 (80,3)
Histologie	N (%)
G3 serös	223 (74,6)
G1 serös	24 (8,0)
endometrioid	23 (7,7)
muzinös	13 (4,3)
klarzellig	4 (1,3)
undifferenziert	8 (2,7)
seromuzinös	4 (1,3)

3.2. Untersuchungsmaterial

Als erster Schritt wurden Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Schnitte aus den pathologischen Archiven der Kliniken der LMU in Großhadern und der Innenstadt herausgesucht und anschließend anhand von Tumormasse und Beschaffenheit mit dem Lichtmikroskop untersucht. Im zweiten Schritt wurde für jeden Patientenfall ein Paraffinblock mit eingebettetem Gewebe ausgewählt, der möglichst viel zusammenhängende Tumormasse und wenig hartes und damit schwer zu schneidendes Material enthielt. Hiervon wurden nun jeweils acht Leerschnitte angefertigt, um zum einen Material für etwaige Nachuntersuchungen auf Reserve zu haben, zum anderen um einen neuen HE-Schnitt für die exakte Stanzenplanung der Tissue-Micro-Arrays (TMAs) zu bereiten. Die Färbung der HE-Präparate erfolgte am Vollautomaten von Sakura.

3.3. Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte

3.3.1. Chemikalien

Aqua bidest

Chromogen AEC+ Dako, Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, CA,
Katalognr. K3461 USA

Chromogen DAB+ Dako, Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, CA,
Katalognr. K3467 USA

DAPI Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Deutschland (Merck Group)

Ethanol (absolut) AppliChem PanReac, Darmstadt, Deutschland

Färbeautomat Sakura Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tissue-Tek PrismaE2S
Code: 6133

FISH Pretreatment ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland
Solution Citric 1

Chlorwasserstoff AppliChem PanReac, Darmstadt, Deutschland
(1M, Maßlösung)

Material und Methoden

Hematoxylin Gill's Formula Katalognr. H-3401	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Immunhistochemischer Antikörper ALK (D5F3)	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz
Immunhistochemischer Antikörper anti-MSH6 (44)	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz
Immunhistochemischer Antikörper anti-PR (1E2)250	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz
Immunhistochemischer Antikörper BRAF V600E	RevMab Biosciences USA, Inc., South San Francisco, CA, USA
Immunhistochemischer Antikörper ER (SP1) 250	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz
Immunhistochemischer Antikörper EGFR (C36)	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz
Immunhistochemischer Antikörper MLH1 (ES05)	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Immunhistochemischer Antikörper MSH2 (G219-1129)	Cell Marque, Sigma-Aldrich Co., LLC, Rocklin, Kalifornien, USA (Merck Group)
Immunhistochemischer Antikörper PMS2 (EPR3947)	Cell Marque, Sigma-Aldrich Co., LLC, Rocklin, Kalifornien, USA (Merck Group)
Immunhistochemischer Antikörper p53 (Do-7)	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Anatomical Pathology, Fremont, USA
Immunhistochemischer Antikörper VENTANA HER2/neu (4B5)	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz

Material und Methoden

Immunhistochemischer Antikörper PD-L1 (28-8)	Abcam, Cambridge, UK
Pepsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland (Merck Group)
Reagenzien für Ventana Benchmark® XT und ULTRA	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz
FISH Sonde ALK/EML4 Katalognr. Z-2117-200	ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland
FISH Sonde ERBB2/HER2 Katalognr. Z-2015-50	ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland
SSC Puffer (20x)	AppliChem PanReac, Darmstadt, Deutschland
Target Unmasking Fluid Katalognr. Z000R0000	PanPath B.V., Amsterdam, Niederlande
Target Retrieval Solution Katalognr. S1699	Dako, Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, CA, USA
TRIS- Puffer	
Tween 20	AppliChem PanReac, Darmstadt, Deutschland
Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA Linaris GmbH, Dossenheim, Deutschland
Vectastain ABC-Kit Elite Universal Katalognr. PK6200	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid (7,5%, wässrig)	
Xylol (reinst)	AppliChem PanReac, Darmstadt, Deutschland

3.3.2. Verbrauchsmaterialien

Fixogum	Marabu GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland
Immersol 518F	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine Katalognr. 1.09242.0100	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland (Merck Group)
Mikroskopieröl	Pulch & Lorenz Medizintechnik, March, Deutschland
Objektträger	Menzel-Gläser SuperFrost Ultra Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Germany
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.3.3. Geräte

Axioskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
AxioCam HRC	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
BenchMarkXT ® IHC Färbemodul	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz
BenchMarkULTRA ® IHC Färbemodul	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz
Brutschrank, T6030	Heraeus, Hanau, Deutschland
Digitale Deutschland Kontroll-Thermometer	TFA Dostmann GmbH & Co. KG, Wertheim,
Electronic Standard Thermometer	Amarell GmbH & Co. KG, Kreuzwertheim, Deutschland
Gefrierschrank, Arctis, 70340-GS	AEG Electrolux, Nürnberg, Deutschland
HBO Kurzbogenlampe HBO 103 W/2	Krömker Medizintechnik, Bückeberg, Deutschland

Material und Methoden

Heizplatte Präzitherm Typ 281	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, Deutschland
HP Officejet Pro X 451dw	Hewlett-Packard, Palo Alto, Californien, USA
Kühlplatte, Para Cooler	RWW Medizintechnik, Forchheim, Deutschland
Kühlschrank, EN 153	Siemens, München, Deutschland
Laborthermometer 12.1011	Matzner Messgeräte, München, Deutschland
Leica DMD108	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Magnetmischer REO basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop 4776063	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Personal Computer, Monitor	Hewlett-Packard, Palo Alto, Californien, USA
Personal Tissue Arrayer	Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA
pH-Messgerät, FiveEasy Messelektrode LE 409	Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA
Pipetten Refence: 2-20; 0,5-10; 0,1- 2,5; 10-100; 100-10000; 50 -200 Ersatz: 0,5-10, 10-100, 100 -1000	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Plan-Apochromat Objektiv 63x1,4 Oil	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Plan-Neofluar Objektive 100x/1,30 Oil	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Material und Methoden

10x/0,30 Oil

2,5x/0,075 Oil

Schlittenmikrotom
SM 2000 R Fa. Jung (jetzt: Leica Biosystems, Wetzlar,
Deutschland)

Steuerpad MAC5000 Ludl Electronic Products Ltd., Hawthorne, NY, USA
LEP73005020 PS-System

ThermoBrite® Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Hybridisierungsgerät
StatSpin,S500-24

ThermoFisher Microm Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA
HM340E

Thermomischer IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
RCT basic

Tischzentrifuge Labnet, Edison, NY, USA

Universal Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Hybridisierungsöfen
BD53#03-46769

Vortexer, MX-S DragonLab, Beijing, China

Waage Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Handy H120-HD2

Wasserbad Medax-Nagel GmbH, Neumünster, Deutschland

Wasserbad, W6 GK Sondermaschinenbau GmbH, Labortechnik
Medingen, Arnsdorf, Deutschland

ZytoBrite Hybridizer Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland

3.4. Reevaluation der Tumorgraduierung

Bislang erfolgte das Grading von serösen Ovarialkarzinomen nach dem dreistufigen System von Shimizu/Silverberg. Im Jahr 2004 veröffentlichte u.a. A. Malpica erstmals ein zwei-stufiges, an der Pathogenese orientiertes System, dessen Fokus primär auf Atypien in der Zytologie und sekundär auf der Mitoserate liegt (47). Da dieses System inzwischen aufgrund molekularer Ergebnisse, höherer Reproduzierbarkeit und damit besserer Praktikabilität etabliert ist, wurden alle ursprünglich als G2 Tumoren eingestuften serösen Ovarialkarzinome unseres Patientenkollektivs neu zugeordnet. Die Beurteilung erfolgte anhand der oben genannten Malpica-Kriterien und somit wurden alle serösen Ovarialkarzinome entweder G1 oder G3 zugeordnet. Die Kriterien für die Einteilung zum high-grade Karzinom waren primär eine Zellkerngrößenvariation von größer oder gleich drei zu eins, irreguläres Chromatin und eventuell das Vorkommen von Makronukleoli. Als sekundäres Kriterium gilt eine Mitosenanzahl von über zwölf Mitosen pro zehn „high power fields“ (Gesichtsfeldern). Hierfür ist das Areal mit der stärksten nukleären Atypie entscheidend. Werden diese Kriterien nicht erfüllt, erfolgt die Einteilung als low-grade Ovarialkarzinom. Diese weisen eher uniforme Zellen, leicht bis mittelgradig veränderte Kerne, normal verteiltes Chromatin und einen Mitoseindex von kleiner oder gleich zwölf pro Gesichtsfeld in der mitotisch aktivsten Region des Tumors auf.(48) Insgesamt umfasste das hier gewählte Kollektiv 53 seröse G2 Tumoren. Hiervon konnten 9 Fälle als G1 eingestuft werden. Die Mehrzahl wurde als G3 identifiziert mit 44 Fällen. Die Auswertung erfolgte jeweils durch einen Doktoranden und einen Arzt des Pathologischen Instituts der LMU München.

3.5. Tissue-Micro Array (TMA)

Um ein repräsentativ großes Kollektiv auf möglichst viele Aspekte testen zu können, wurden vor den eigentlichen Untersuchungen zehn TMAs erstellt. Dieses Verfahren ermöglicht eine parallele Testung mehrerer Gewebeproben und ist somit zeit- und geldsparend. Anstelle der Testung von 299 einzelnen Schnitten ließ sich jede Untersuchung an lediglich zehn Schnitte durchführen. Zur Herstellung der TMAs wurde zunächst, anhand der neu angefertigten HE-Schnitte, das zur Stanzung geeignete Tumorareal mit einem Permanent-Marker eingezeichnet. Im nächsten Schritt wurde ein Paraffinzylinder aus einem leeren

Block gestanzt und dieser mit Referenzgewebe, im hier vorliegenden Fall mit Tonsille oder Kolon, aufgefüllt. Dies erfolgte bei den ersten beiden Stanzen nebeneinander und dient sowohl der Orientierung als auch der Färbebeurteilung. Im Folgenden wurde nun mit einem Abstandsmesser jeweils die genaue Justierung der weiteren Stanzen abgemessen. Zunächst wurde jeweils der leere Zylinder ausgestanzt und entfernt und dann, durch Übereinanderlegen des HE-Schnittes mit Einzeichnung und des dazugehörigen Blocks, das gewünschte Areal eingestellt. Hier wurde nun der Gewebezylinder aus dem Tumor ausgestanzt und in die Lücke im Paraffinblock eingesetzt. Von jeder Fallnummer wurden zwei Stanzen im Durchmesser von 2,0mm nebeneinandergelegt. Grund hierfür ist die Möglichkeit, dass eine der Stanzen aufgrund von mechanischer Beschädigung oder Ungenauigkeit nicht auswertbar sein könnte und um etwaige Tumorinhomogenitäten leichter aufdecken zu können. Die insgesamt 299 Fälle wurden auf die zehn TMAs mit 13 bis 32 Fällen (a zwei Stanzen) aufgeteilt. Für eine bessere Einfügung ins Gewebe wurden die TMAs für 30 Minuten auf 37°C erwärmt. Um die geplanten Untersuchungen am TMA vorzunehmen, wurden als nächster Schritt jeweils zunächst 24 Leerschnitte am Schlittenmikrotom der Firma Jung hergestellt. Zum besseren Schneiden wurden die TMAs zuvor auf eine Temperatur von circa -10°C heruntergekühlt. Um die Gewebsstanzen im TMA den richtigen Fällen zuordnen zu können, wurden parallel zur TMA Erstellung Lagepläne hergestellt. Beispiele hierzu sind in Abbildung 3 und 4 zu sehen.

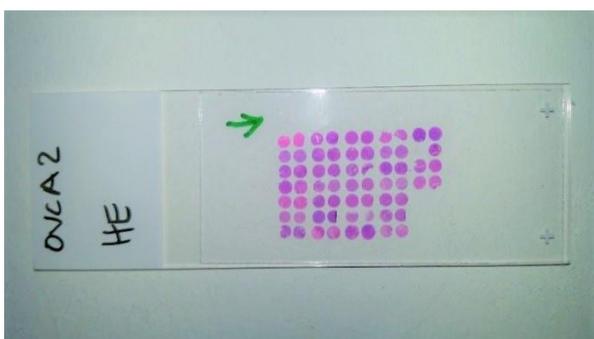


Abbildung 3: Fotografie TMA HE-Schnitt

OVCA 2

Colon	Colon	OVCA344	OVCA344	OVCA351	OVCA351	OVCA358	OVCA358	OVCA365	OVCA365
OVCA338	OVCA338	OVCA345	OVCA345	OVCA352	OVCA352	OVCA359	OVCA359	OVCA366	OVCA366
OVCA339	OVCA339	OVCA346	OVCA346	OVCA353	OVCA353	OVCA360	OVCA360	OVCA367	OVCA367
OVCA340	OVCA340	OVCA347	OVCA347	OVCA354	OVCA354	OVCA361	OVCA361	OVCA368	OVCA368
OVCA341	OVCA341	OVCA348	OVCA348	OVCA355	OVCA355	OVCA362	OVCA362		
OVCA342	OVCA342	OVCA349	OVCA349	OVCA356	OVCA356	OVCA363	OVCA363		
OVCA343	OVCA343	OVCA350	OVCA350	OVCA357	OVCA357	OVCA364	OVCA364		

gestanzt am: 01.07.2015
 2 Stanzten pro Fall
 1,5mm Stanzten
 Hofmann/Prof. Mayr

Abbildung 4: TMA Lageplan

3.6. Immunhistochemische Untersuchungen

3.6.1. IHC

Zu Beginn der immunhistochemischen Färbung muss zunächst eine Vorbehandlung des zuvor in Paraffin eingebetteten Materials erfolgen, da einige Antigene in veränderter Form vorliegen können. Diese Vorbehandlung besteht zunächst in der Entparaffinierung und dann in einer Demaskierung der Antigene mittels Hitzevorbehandlung oder enzymatisch. Gegebenenfalls müssen endogene Enzymaktivitäten gehemmt werden. Die eigentliche immunologische Reaktion zwischen den Antigenen und ihren spezifischen Antikörpern folgt im nächsten Schritt durch Hinzugabe des Antikörpers und Inkubation. Zum Sichtbarmachen der Reaktion wird nun eine Färbung vorgenommen. Somit kann eine Expression sowie deren Aktivität und Lokalisation aufgezeigt werden. Der prozentuale Anteil gefärbter Zellen, deren Intensität und Zuordnung der Färbung an Zellmembran, Zellkern oder Zytoplasma können hierzu aufschlussreich sein.(49) Die im Folgenden beschriebenen Färbungen wurden teilweise am Vollautomaten, teilweise manuell hergestellt und anschließend am Mikroskop ausgewertet.

3.6.2. ER IHC

Die immunhistochemische Färbung der ER erfolgte mittels vollautomatischer Färbung am Benchmark® XT von Ventana. Von Ventana stammt ebenfalls der hierzu verwendete Antikörper ER (SP1) 250.

3.6.3. PR IHC

Die immunhistochemische Färbung der PR erfolgte analog zur ER-Färbung vollautomatisch am Benchmark® XT von Ventana. Der Antikörper Anti-PR (1E2) 250 ist ebenfalls von Ventana.

3.6.4. Hormonrezeptorauswertung nach Remmele

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung der ER und PR erfolgte nach dem von Remmele und Stenger 1987 publizierten Score-System.(50)

Tabelle 4: Remmele-Score zur Auswertung immunhistochemischer Hormonrezeptorfärbungen - Färbeintensität

Färbeintensität/Staining Intensity (SI)	Score
Keine Färbung nachweisbar	0
Geringe Färbeintensität der Kerne	1
Mäßige Färbeintensität der Kerne	2
Starke Färbeintensität der Kerne	3

Tabelle 5: Remmele-Score zur Auswertung immunhistochemischer Hormonrezeptorfärbungen - Anzahl positiver Zellen

Anzahl positiver Zellen/Positiver Prozentsatz (PP)	Score
Keine positiven Kerne nachweisbar	0
< 10% positive Zellen/Kerne	1
10 – 50 % positive Zellen/Kerne	2
51 – 80% positive Zellen/Kerne	3
> 80% positive Zellen/Kerne	4

Zur Errechnung des Gesamt-Scores wird der Scorewert der Färbeintensität mit dem Wert der Anzahl positiver Zellen multipliziert und bei einem Wert bis 2 als negativ, ab 3 als positiv gewertet.(51)

3.6.5. p53 IHC

Das Tumorsuppressorgen p53 wurde mit Hilfe des Benchmark® XT von Ventana automatisch gefärbt. Hierfür wurde der p53 Antikörper Ab5 der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet.

Die Auswertung erfolgte nach dem von Gilks et al. vorgestellten und durch Karamurzin et al. bestätigten System. Als negativ und damit nicht-mutiert wurde eine fokale schwache Färbung in <50% der Tumorzellen gewertet. Überexpression oder ein kompletter Expressionsverlust in den Tumorzellen wurde als p53-Mutation eingestuft. Für dieses Auswertungssystem wurde gezeigt, dass die IHC mit der p53-Mutation korreliert. (52)

3.6.6. PD-L1 IHC

Die vollautomatisierte immunhistochemische Färbung erfolgte am Benchmark® XT von Ventana, ergänzt durch den Handauftrag des primären PD-L1 Antikörpers E1L3N der Firma Cell Signaling.

Eine membranständige Färbung jeglicher Intensität wurde in Übereinstimmung mit dem Cologne Score als positiv gewertet. Der Prozentsatz gefärbter Tumorzellen wurde zudem erhoben und ebenso anhand des Scores in Gruppen eingeteilt. Die Färbeintensität bringt nach derzeitigem Stand keine zusätzlichen Informationen. Auch Färbungen schwacher Intensität werden als positiv gewertet.

Tabelle 6: Cologne Score/Proportion-Score zur Auswertung der immunhistochemischen PD-L1-Färbung

	Negativ	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
Kategorie	0	1	2	3	4	5
Cut-Off	<1%	≥1%	≥5%	≥10%	≥25%	≥50%
Intervall in %	0 - 1	1 - <5	5 - <10	10 - <25	25 - <50	50 - <75

(18)

3.6.7. MSI

Alle vier Färbungen erfolgten am Vollautomaten BenchMark ULTRA. Für MLH1 wurde der Antikörper ES05 der Firma Leica Biosystems benutzt. Zur Färbung von MSH2 kam der Antikörper MSH (G219-1129) der Firma Cell Marque zum Einsatz. Anti-MSH6 (44) wurde als Antikörper für die MSH6 Färbung eingesetzt. Von Cell Marque stammt auch der für die PMS2 Färbung angewandte Antikörper PMS2 (EPR3947).

Die Beurteilung erfolgte analog zur Auswertung bei kolorektalen Karzinomen. Mittels IHC wird der Expressionsverlust von DNA-MMR-Proteinen getestet. Die getesteten Proteine sind: MLH1, PMS2, MSH2 und MSH6. Die Konsequenz ist

eine MSI, welche mittels Polymerasekettenreaktion getestet werden kann. Bei kolorektalen Karzinomen liegt die IHC Sensitivität bei rund 95%, die Spezifität bei nahezu 100%.

Aus der Kombination von Proteinausfällen kann eine Aussage über das Vorliegen einer Keimbahnmutation oder einem sporadischen Verlust getroffen werden.(53)

Tabelle 7: Interpretation der IHC von MMR-Proteinen nach Burkart

MLH1	PMS2	MSH2	MSH6	IHC Interpretation	Bedeutung für Keimbahnmutation (Lynch-Syndrom) vs. sporadische Mutation
+	+	+	+	kein Defekt	kein Nachweis eines DNA MMR-Defekts
-	-	+	+	MLH1 Defekt	ca. 90% sporadischer Verlust (Promoter Hypermethylierung) ca. 10% Keimbahnmutation
+	-	+	+	PMS2 Defekt	meist Keimbahnmutation (seltene Fälle von MLH1 Defekt)
+	+	-	-	MSH2 Defekt	meist Keimbahnmutation
+	+	+	-	MSH6 Defekt	meist Keimbahnmutation

(53)

Die immunhistochemischen Färbungen wurden im Folgenden bei allen Fällen mit Ausfällen im TMA an Flächenschnitten wiederholt, um das Ergebnis zu überprüfen.

3.6.8. BRAF IHC

Die im Rahmen dieser Arbeit manuell gefärbte immunhistochemische Untersuchung von BRAF wurde mit der seit 1981 bekannten Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode) gefärbt. Diese ist für alle biotinylierten Moleküle geeignet und führt über den im Folgenden beschriebenen Mechanismus zu einer erhöhten Sensitivität, durch die ein Nachweis auch bei geringer Antigenanzahl ermöglicht wird. Avidin, das aus Hühnerei stammt, besitzt eine sehr hohe Affinität für Biotin und zudem vier Biotin Bindungsstellen. Biotin, welches leicht an Antikörper und Enzyme gebunden wird, fungiert, konjugiert an einen sekundären Antikörper, zusammen mit diesem als Verbindung zwischen dem gewebegebundenen primären Antikörper und Avidin. Hier wurde der primäre Antikörper BRAF V600 von RevMab Biosciences in 1:200facher

Verdünnung verwendet. Die Avidin Moleküle werden nun mit einem Enzym mit mindestens zwei Biotinmolekülen (in unserem Fall mit biotynilierter Horseradish Peroxidase) miteinander verbunden und es entstehen stabile Gitter-Komplexe. Zum Sichtbarmachen wird ein farbloses Substrat, ein Chromogen, wie hier DAB, hinzugegeben. Dieses wird dann von den vielen Peroxidase Enzymmolekülen in ein braunes Endprodukt umgewandelt. Da die in vielen Geweben endogen vorkommende Horseradish Peroxidase falsch positive Signale hervorrufen kann, wird ein Enzyblocker, in diesem Fall Wasserstoffperoxid, verwendet. Endogenes Biotin wird durch Formalinfixierung und Paraffineinbettung weitgehend blockiert.(54)

Bei der Auswertung wurde auf eine zytoplasmatische Färbelokalisation, sowie die Färbeintensität geachtet. In der Literatur gilt eine Färbung als positiv bei homogener zytoplasmatischer Färbung aller Tumorzellen.(24)

3.6.9. EGFR IHC

Am Benchmark® XT von Ventana wurde die automatisierte Färbung mit Handauftrag des primären EGFR Antikörpers C36 durchgeführt. Die Herstellerfirma des Antikörpers ist Ventana Roche Medical Systems.

Die Auswertung erfolgte zunächst anhand dreier Kriterien. Es wurde festgehalten, ob sich die Färbung auf das Zytoplasma beschränkt oder ob sie im Zytoplasma und membranständig beobachtet werden kann (EGFR_loc). Zweites Kriterium war die Färbeintensität, welche in vier Stufen (negativ, schwach, mäßig, stark) unterschieden wurde (EGFR_SI). Als letztes Kriterium bestimmten wir den Anteil gefärbter Zellen (EGFR_PP).

In der Literatur wird teilweise nur eine membranständige, teilweise eine membranständige oder eine zytoplasmatische Färbung als positiv betrachtet.(26, 55) In einigen Studien konnten Zusammenhänge von membranöser Färbung mit höherem Grading, Staging und Proliferation gezeigt werden. Andere Untersuchungen weisen bei zytoplasmatischer Färbung gleichwertige Malignität auf.(27)

Ab schwacher Färbeintensität wird nach herrschender Auffassung die EGFR-Expression als positiv gewertet. In Untersuchungen konnten keine prognostisch signifikanten Unterschiede aufgrund der Färbeintensität gezeigt werden.(26, 27)

Bezüglich dem prozentualen Anteil an gefärbten Tumorzellen findet sich zum einen die Angabe bei jeglicher Färbung, zum andern erst ab $\geq 10\%$ die Färbung als positiv zu betrachten. (26, 55)

3.6.10. ALK IHC

Für die immunhistochemische Testung auf ALK wurde der Lungenantikörper ALK (D5F3) von Ventana, bei der Färbung am Vollautomaten Benchmark® XT ebenfalls von Ventana, verwendet.

Als positiv wurden in der Auswertung nur die stark positiven Fälle gewertet. Als stark positiv wurden alle Fälle mit Färbung hoher Intensität, sowie einem Prozentsatz positiver Tumorzellen von größer oder gleich 80 gewertet.

3.6.11. HER2 IHC

Die Färbung erfolgte am Vollautomaten Benchmark® XT von Ventana mit dem Antikörper VENTANA HER2/neu (4B5) von Ventana.

Die Auswertung wurde nach dem Roche Pharma AG Algorithmus für die HER2-Testung mittels IHC für Mammakarzinom-Gewebe wie folgt durchgeführt:

Tabelle 8: Auswertungsschema für HER2 IHC beim Mammakarzinom nach Roche

keine oder schwache/kaum sichtbare unvollständige Membranfärbung in $\leq 10\%$ der Tumorzellen	IHC negativ (0)
schwache/kaum sichtbare unvollständige Membranfärbung in $>10\%$ der Tumorzellen	IHC negativ (1+)
unvollständige und/oder schwache/moderate zirkuläre Membranfärbung in $>10\%$ der Tumorzellen oder komplette ringförmige Membranfärbung, die intensiv ist und bei $\leq 10\%$ der Tumorzellen auftritt	IHC „unklar“ (2+) (2tes Testverfahren empfohlen)
komplette intensive zirkuläre Membranfärbung in $>10\%$ der Tumorzellen	IHC positiv (3+)

(56)

3.7. Fluoreszenz in situ Hybridisierung

3.7.1. Allgemein

Bei der FISH handelt es sich um ein auf fluoreszenzmarkierten komplementären DNA-Sonden gestütztes Nachweisverfahren von Gen- und Zentromer-Sequenzen.

Die Herstellung der Präparate erfolgt an zwei aufeinander folgenden Tagen. Der erste Tag beginnt mit der Entparaffinierung der Objektträger in einer Alkoholreihe (Xylol 3x10min) mit anschließender Säuberung sowie Entwässerung mit Ethanol und Lufttrocknung (3x10min). Um die Netzstruktur, die durch Fixation auf dem Objektträger entstanden ist, aufzubrechen und somit einen Gewebeaufschluss zu erlangen, werden die Präparate zunächst mit Citrat Puffer bedeckt und bei 80°C im Brutschrank in einer feuchten Kammer waagrecht auf Glaspipetten gelegt. Nach 30 Minuten wird das Deckglas abgeschüttelt, mit Aqua bidest gespült und trockengewischt. Es folgt der Protease-Verdau mit Pepsin-Gebrauchslösung (10mM HCl + Pepsin), die Abdeckung mit einem Deckglas und die erneute Brutschrank-Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C (ALK: 20min; HER2: 24min). Danach wird das Deckglas entfernt, mit Aqua bidest gespült, luftgetrocknet und das zu hybridisierende Material mit einem Diamantschreiber markiert. Im nächsten Schritt kommt es zur Denaturierung und Hybridisierung unter Lichtschutz. Der Objektträger wird hierzu fünf Minuten auf einer Heizplatte denaturiert und im Anschluss mit fünf Mikroliter/Quadratcentimeter Sonde, welche zuvor auf ein Deckgläschen pipettiert wurde, luftblasenfrei versehen. Es folgt die Co-Denaturierung von Schnitt und Sonde für 10min auf einer Heizplatte. Das Deckglas wird nun mit Fixogum abgedichtet. In den folgenden 16 bis 18 Stunden wird das Präparat im Hybridisierungsgerät (ThermoBrite) bei vorgeheizten 37°C über Nacht inkubiert. Im Zentrum des zweiten Tages stehen das Waschen und die Detektion. Zunächst werden der Klebstoff und das Deckglas entfernt. Mit 0,1 SSC Puffer wird der Objektträger bei 37°C gewaschen. Um die Oberflächenspannung herabzusetzen, werden 10 Mikroliter Tween 20 mit 0,1 SSC Puffer gemischt und der Objektträger kurz darin geschwenkt. Abschließend werden 25 Mikroliter DAPI-Antifade auf den Objektträger pipettiert, mit einem 24x50mm Deckglas luftblasenfrei eingedeckt und für circa 15 Minuten lichtgeschützt, senkrecht aufgestellt. Nach weiteren 15 Minuten in einer geschlossenen Präparate-Mappe

kann die Auswertung vorgenommen werden. Die Präparate werden lichtgeschützt bei 4°C gelagert und sind nicht zur Langzeitlagerung geeignet. Um eine möglichst rasche Auswertung zu gewährleisten, erfolgte die Präparateherstellung jeweils erst nachdem der vorherige Objektträger bereits ausgewertet war.

3.7.2. ALK FISH

Bei Tumorzellen ohne Nachweis einer EML4/ALK-Translokation zeigen sich zwei oder mehr als zwei ALK-Fusionssignale. Hierbei können im Mikroskop ein rotes und ein grünes Signal gesehen werden, welche weniger als zwei Signalbreiten voneinander entfernt sind oder aufgrund ihrer direkten Nachbarschaft ein gelbes Signal hervorrufen. Bei der Auszählung wurde eine Zählung von jeweils 60 Zellkernen à 30 pro Stanze im TMA angestrebt, mindestens aber wurden 30 Zellkerne ausgezählt. Die Auswertung erfolgte anhand des „Formblattes Auswertung Eml4/ALK-FISH“ des Pathologischen Instituts der LMU München, anhand dessen die Lungenkarzinom Diagnostik leitliniengetreu vorgenommen wird. Zum Nachweis einer Translokation wurden einzelne rote Signale gezählt und rot-blaue Signale, welche einem EML4/ALK-Rearrangement entsprechen. Machen die rot-blauen Signale einen Prozentsatz $\geq 15\%$ der einzelnen roten Signale aus, ist von einer Translokation auszugehen. Wenn ein rotes und ein grünes Signal größer als zwei Signalbreiten voneinander entfernt sind, spricht man von einem break apart. Liegt dies $>15\%$ der Fälle vor, gilt ebenfalls eine EML4/ALK-Translokation als nachgewiesen. Von einer EML4/ALK-Inversion wird im Falle von rot-blauen und grün-blauen Signalen $>15\%$ der break aparts ausgegangen. Alle Fälle mit mehr als 5% break aparts wurden durch einen zweiten Auswerter mitbegutachtet. Molekulare Grundlage hierfür ist eine Inversion im kurzen Arm von Chromosom 2. Hier liegen normalerweise auf benachbarten Strängen das ALK-Gen, welches bei der Färbung durch ein eng aneinander liegendes rotes und grünes Signal gekennzeichnet ist und das EML4-Gen, das blau erscheint. Durch eine Translokation von EML4 zwischen das rote und das grüne Signal entsteht ein break apart. Durch zusätzliche Deletion ist das Vorkommen einzelner roter oder einzelner grüner Signale erklärt. Durch diese Mutationen entsteht die konstitutive Aktivierung der ALK.(57)

3.7.3. HER2 FISH

In einem normalen Zellkern sind zwei grüne Gensignale und zwei rote Zentromersignale. Pro Fall wurden maximal 50, mindestens jedoch 25 Zellkerne ausgezählt. Auffällige, unklare und schwer auswertbare Fälle wurden von einem Zweitauswerter beurteilt und weitere Zellkerne wurden ausgezählt.

Die Auswertung erfolgte zunächst anhand der etablierten Mamma-Kriterien nach Wolff et al. 2013. Hierbei wird ein Quotient A (Gen-/Zentromersignal) und ein Quotient B (Gensignale/gezählte Kerne) gebildet. Mittels dieser Quotienten erfolgt dann die Beurteilung. Als nicht amplifiziert gelten Fälle, bei denen der Quotient A $<2,0$ und der Quotient B $<4,0$ sind. Unklare Fälle sind definiert durch A $<2,0$ und B $\geq 4,0$, jedoch $<6,0$. In allen Fällen, bei denen A $\geq 2,0$ oder A $<2,0$ und B $\geq 6,0$ sind, ist eine Amplifikation nachgewiesen.⁽⁵⁸⁾ In Fällen, in denen Mikrocluster oder sogar Cluster auftreten, sind die beiden Quotienten in Wirklichkeit höher als zählbar und somit als positiv zu werten.

3.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Versionen 23 und 24 von SPSS Statistics (SPSS INC., Chicago, IL, USA). Häufigkeitsanalysen und Kreuztabellen wurden erstellt. Für die Testung signifikanter Zusammenhänge erfolgte bei qualitativen Variablen die Durchführung eines Chi-Quadrat Tests oder eines Fishers Exakt Tests. Bei quantitativen Variablen wurde ein t-Test verwendet. Für die Erstellung von Überlebenskurven wurden Kaplan Meier Analysen durchgeführt und diese mittels log-rank Test verglichen. Alle Tests waren zweiseitig und als statistisch signifikant wurde ein $p \leq 0,05$ gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Immunhistochemie

4.1.1. ER

Von 299 ließ sich ein Fall (0,3%) technisch nicht auswerten aufgrund von ungenügenden Tumorzellen in keiner der beiden Stanzten. Als positiv gelten alle Fälle, die einen Remmele-Score-Wert von mindestens 3 erreichen. Die Mehrzahl zeigte sich mit 257 Fällen (86,0%) positiv für den ER. Folglich konnten 41 Fälle, (13,7 %) als ER negativ bewertet werden.

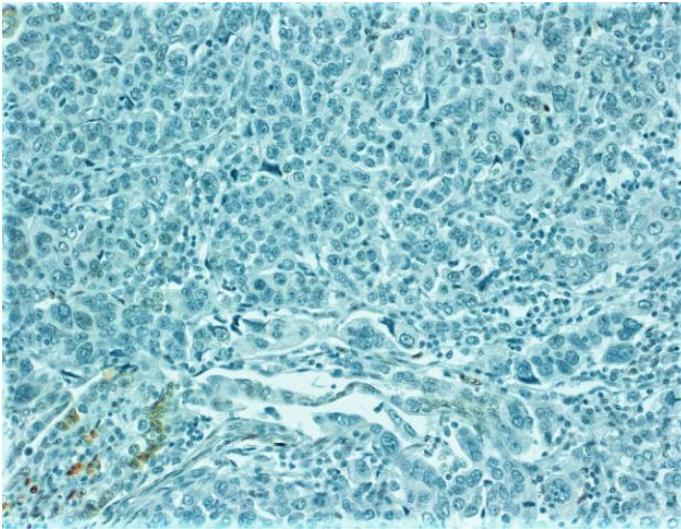


Abbildung 5: ER PP 1, SI 1, Score 2, negativ (40fache Vergrößerung)

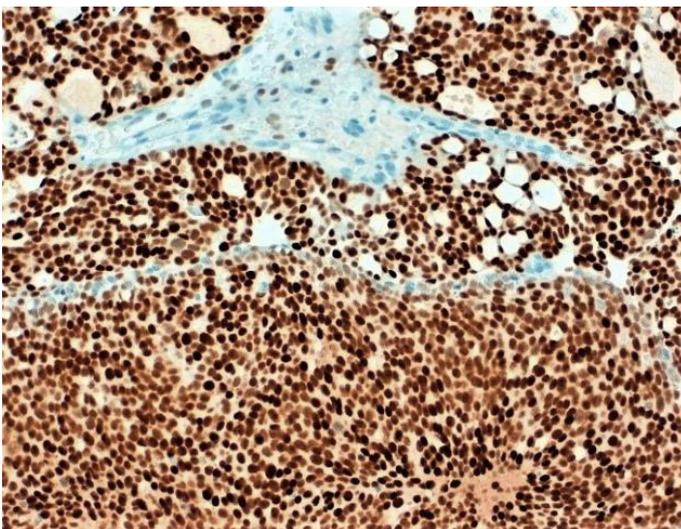


Abbildung 6: ER PP 4, SI 3, Score 7, positiv (40fache Vergrößerung)

4.1.1.1. ER Expression mit Korrelation zum histologischen Subtyp

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang von ER-Positivität und Histologie mittels Fishers Exakt Test und $p < 0,001$. In absteigender Reihenfolge sind bei den serösen G1 Karzinomen 91,7% positiv, bei den serösen G3 Karzinomen 90,6%, bei den undifferenzierten und seromuzinösen je 75,0%, bei den endometrioiden 73,9%, bei den als muzinös klassifizierten 46,2% und bei den klarzelligen 25,0%.

Tabelle 9: Kreuztabelle ER und Histologie

Kreuztabelle Histologie und Östrogenrezeptorpositivität

Anzahl

Histologie		ER positiv			Gesamt
		negativ	positiv	technisch nicht auswertbar	
serös G1		2 (8,3%)	22 (91,7%)	0 (0,0%)	24 (100%)
serös G3		21 (9,4%)	202 (90,6%)	0 (0,0%)	223 (100%)
Endometrioid		6 (26,0%)	17 (73,9%)	0 (0,0%)	23 (100%)
Muzinös		6 (46,2%)	6 (46,2%)	1 (7,7%)	13 (100%)
Klarzellig		3 (75,0%)	1 (25,0%)	0 (0,0%)	4 (100%)
Undifferenziert		2 (25,0%)	6 (75,0%)	0 (0,0%)	8 (100%)
Seromuzinös		1 (25,0%)	3 (75,0%)	0 (0,0%)	4 (100%)
Gesamt		41 (13,7%)	257 (86,0%)	1 (0,3%)	299 (100%)

4.1.1.2. ER Expression mit Korrelation zum Grading

Zwischen Grading und ER-Expression besteht ein signifikanter Zusammenhang mit $p = 0,005$ nach Fishers Exakt Test. Von den ER-Positiven sind 82,5% (212 Fälle) als G3, 6,2% (16 Fälle) als G2 und 11,3% (29 Fälle) als G1 klassifiziert. Von den ER-Negativen sind 68,3% (28 Fälle) als G3, 19,5% (8 Fälle) als G2 und 12,2% (5 Fälle) als G1 klassifiziert.

4.1.1.3. ER Expression mit Korrelation zum Überleben

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen Überleben und ER-Status mit einem $p = 0,021$. Das Diagramm veranschaulicht ein längeres Überleben bei ER-Expression.

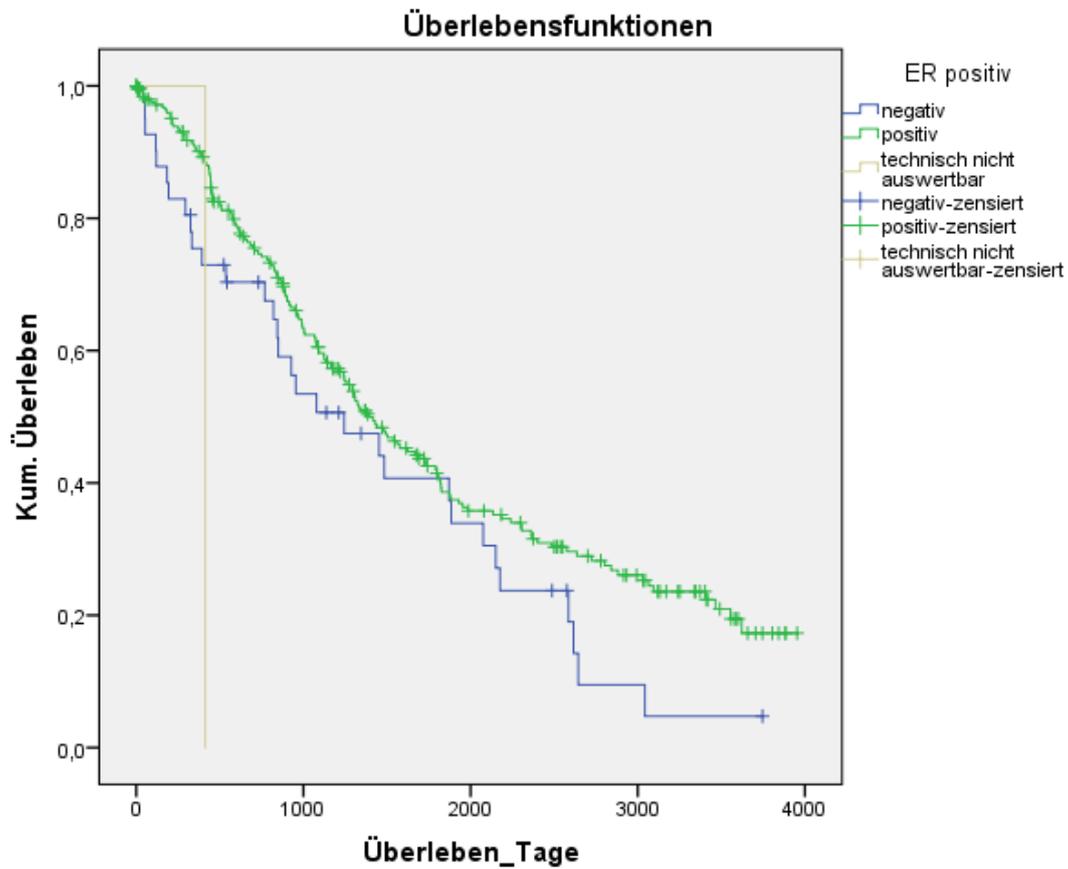


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für ER-Status

4.1.2. PR

Die Untersuchung der PR-Expression mittels IHC konnte an 298 Fällen regelrecht durchgeführt werden. Ein Fall blieb wegen mangelnder Tumormasse im TMA unausgewertet. Negativität zeigte sich in 92 Fällen (30,8%). PR-Positivität, die ab einem Remmele-Score-Wert von 3 besteht, konnte in 206 Fällen (68,9%) nachgewiesen werden.

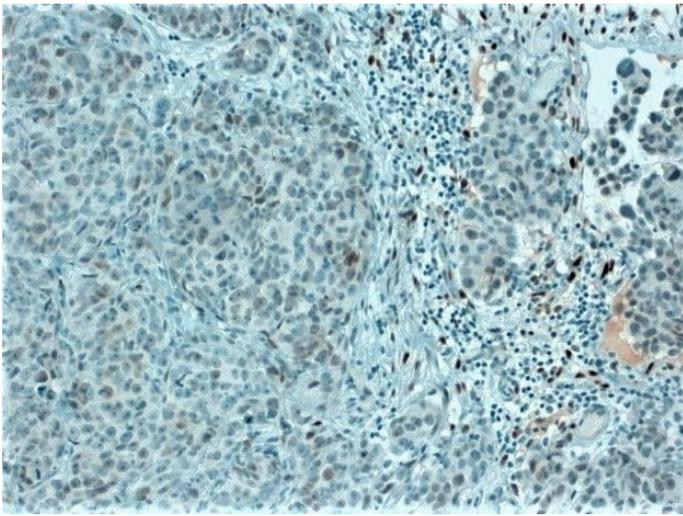


Abbildung 8: PR PP 1, SI 1, Score 2, negativ (40fache Vergrößerung)

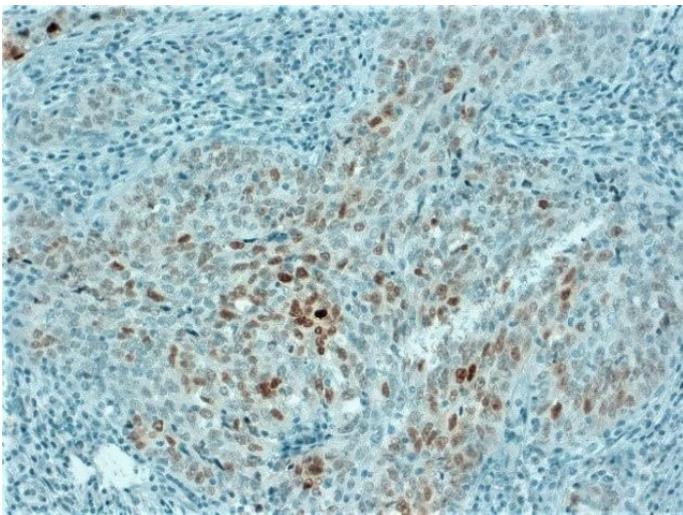


Abbildung 9: PR PP 2, SI 2, Score 4, positiv (40fache Vergrößerung)

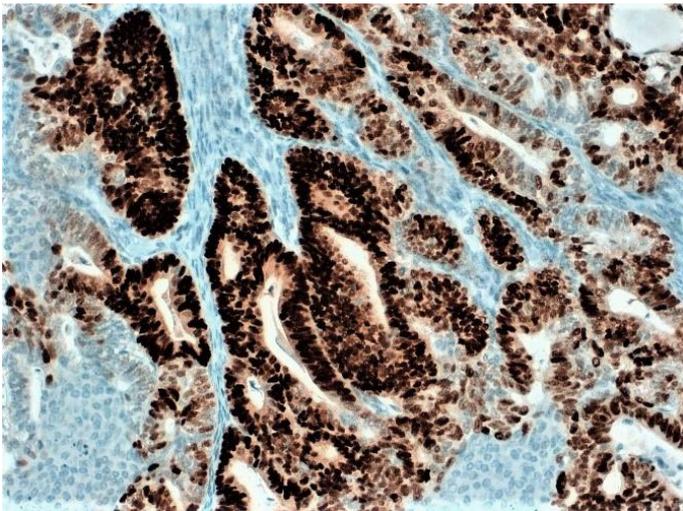


Abbildung 10: PR PP 4, SI 3, Score 7, positiv (40fache Vergrößerung)

4.1.2.1. PR Expression mit Korrelation zum Grading

Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang von PR-Positivität und dem Grading mit einem p-Wert von 0,004 mittels Fishers Exakt-Test. Innerhalb der PR positiven Fälle sind 79,6% als G3, 10,7% als G2 und 9,7% als G1 klassifiziert. Bei den PR-Negativen sind 82,6% als G3, 2,2% als G2 und 15,2% als G1 klassifiziert.

4.1.2.2. Korrelation zwischen ER und PR Expression

Zwischen den beiden Expressionen bestand ein signifikanter Zusammenhang (mit einem $p < 0,001$). Bei vorliegender ER-Positivität fand sich eine zusätzliche PR-Positivität häufiger. Von den ER positiven Fällen sind 72,4% auch für den PR positiv. Von den ER negativen Fällen sind 51,2% auch für den PR negativ.

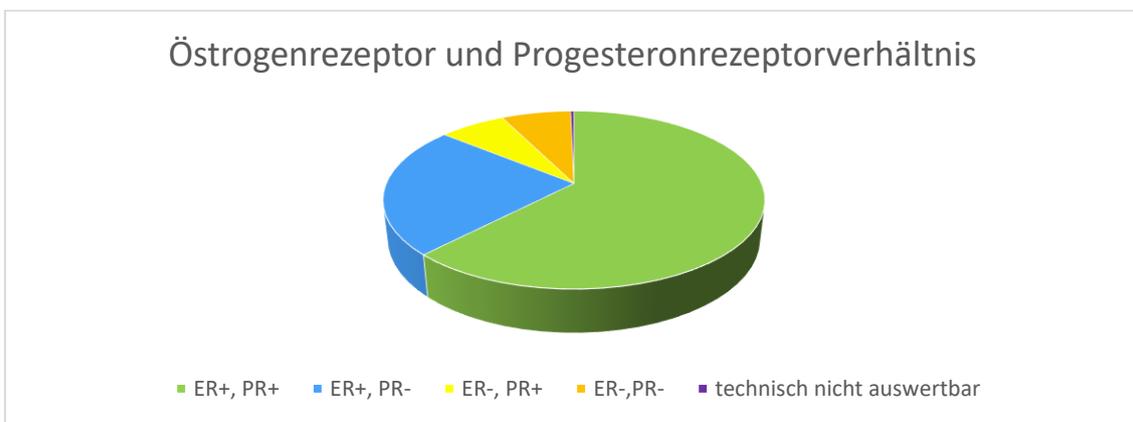


Abbildung 11: Diagramm Verhältnis ER und PR

4.1.3. p53-Mutation

Technisch nicht auszuwerten war ein Fall (0,3%) aufgrund fehlender Tumorzellen. Eine p53-Mutation konnte in 235 Fällen (78,6%) nachgewiesen werden. Ohne Mutation zeigte sich eine Fallzahl von 63 (21,1%).

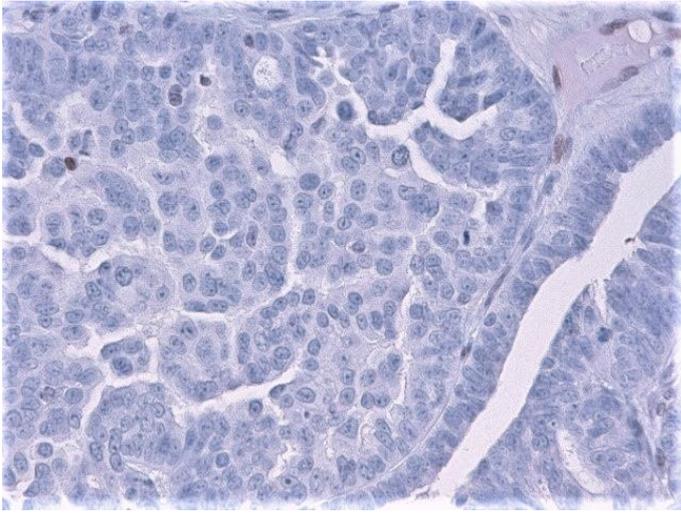


Abbildung 12: p53 Expressionsverlust, positiver Fall (40fache Vergrößerung)

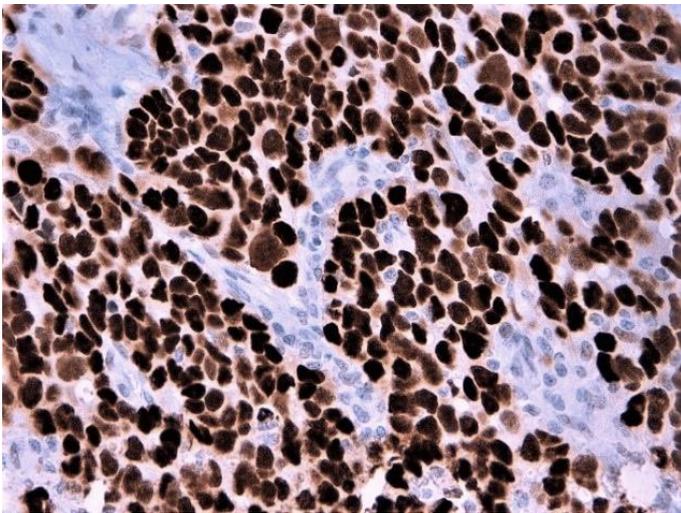


Abbildung 13: p53 Überexpression, positiver Fall (40fache Vergrößerung)

4.1.3.1. Korrelation von p53-Mutation zu Histologie

Ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen dem histologischen Subtyp und p53-Mutation mit einem $p < 0,001$. In absteigender Reihenfolge finden sich p53-Mutationen bei den serösen G3 Karzinomen mit 90,6%, bei den undifferenzierten in 87,5%, bei den muzinösen in 61,5%, 50,0% bei den klarzelligen, 39,1% bei den endometrioiden und jeweils 25,0% in seromuzinösen und serösen G1 Karzinomen.

4.1.3.2. Korrelation von p53-Mutation zu FIGO-Stadium

Ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen FIGO-Stadium und p53-Mutation mit einem $p < 0,001$. Dies zeigt, dass eine p53-Mutation häufiger mit einem höheren FIGO-Stadium einhergeht. Im FIGO Stadium I sind 50,0% mutiert, im Stadium II 61,9%, im Stadium III 85,2% und im Stadium IV 78,7%.

4.1.3.3. Korrelation von p53-Mutation zu T-Stadium

Ebenso korreliert eine p53-Mutation mit dem T-Stadium ($p < 0,001$). Im T1-Stadium waren 54,8% mutiert, im T2-Stadium 71,4% und im T3-Stadium 84,8%.

4.1.3.4. Korrelation von p53-Mutation zum Grading

Für das Grading und die p53-Mutation ergibt sich ein Zusammenhang mit einem $p < 0,001$. 23,5% der G1 Tumoren zeigten eine p53 Mutation. In 48,0% der G2 Karzinome konnte eine p53 Mutation nachgewiesen werden sowie in 89,6% der G3 Tumore.

4.1.3.5. Korrelation von p53-Mutation und dem Patientenalter bei Diagnose

Mit einem $p = 0,044$ ergibt sich ein signifikanter Unterschied im t-Test beim Vergleich des Alters bei Diagnose von p53-mutierten und p53-nicht-mutierten Fällen. Ohne Mutation liegt der Altersmittelwert bei 58,4 Jahren und mit Mutation bei 62,3 Jahren. Patientinnen ohne p53-Mutation waren also jünger bei der Diagnose als solche mit einer Mutation.

Übersichtstabellen zu Basisparametern:

Tabelle 10: Häufigkeiten ER, PR, p53

	Positiv	negativ	nicht auswertbar
ER	257 (86,0%)	41 (13,7%)	1 (0,3%)
PR	206 (68,9%)	92 (30,8%)	1 (0,3%)
p53-Mutation	253 (78,6%)	63 (21,1%)	1 (0,3%)

Tabelle 11: signifikante Zusammenhänge ER, PR, p53 und Grundparameter

	ER	PR	p53-Mutation
Histologie	$p < 0,001$	nicht signifikant (ns)	$p < 0,001$
FIGO	Ns	ns	$p < 0,001$
Grading	$p = 0,005$	$p = 0,004$	$p < 0,001$
TNM	Ns	ns	T: $p = 0,001$
ER	-	$p < 0,001$	ns
PR	$p < 0,001$	-	ns
Überleben	$p = 0,021$	ns	ns

4.1.4. PD-L1

Alle Fälle (100%) konnten ausgewertet werden. Als PD-L1 positiv konnten 61 Fälle, entsprechend 20,4%, identifiziert werden. Die Mehrheit war mit 79,6% (238 Fälle) negativ. Auf den Prozentsatz positiver Zellen von >1%-5% fielen 16 Fälle

Ergebnisse

(5,4%). Zwischen 5% und 10% lagen 14 Fälle (4,7%). In die Gruppe zwischen 10 und 25% konnten 23 Fälle (7,7%) und in die Gruppe zwischen 25 und 50% 7 (2,3%) eingeordnet werden. Lediglich ein Fall zeigte über 50% positive Tumorzellen.

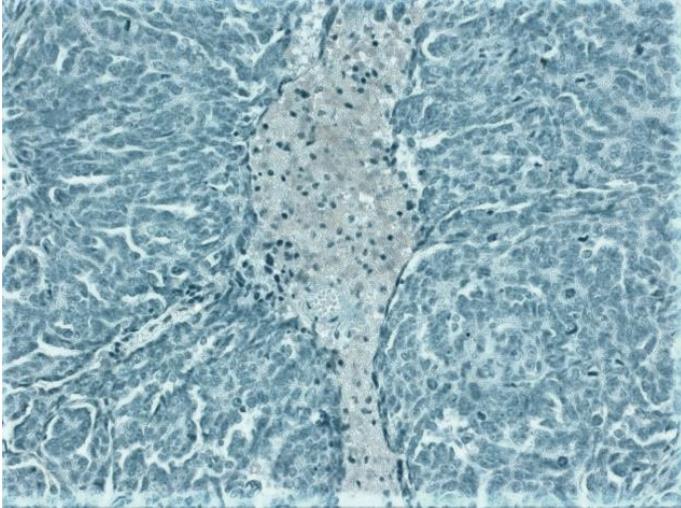


Abbildung 14: PD-L1 negativ (40fache Vergrößerung)

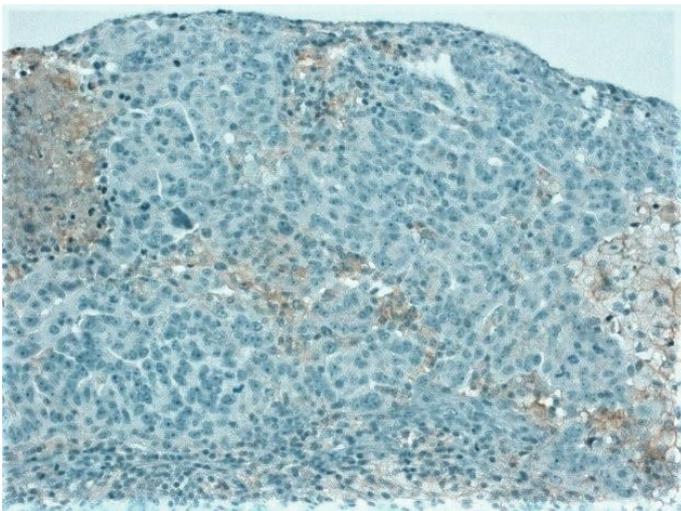


Abbildung 15: PD-L1 positiv, Kategorie 4 (40fache Vergrößerung)

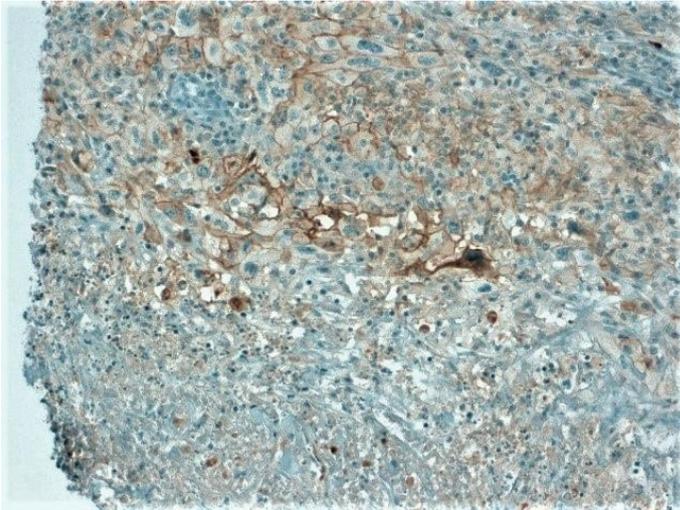


Abbildung 16: PD-L1 positiv, Kategorie 5 (40fache Vergrößerung)

4.1.4.1. Korrelation von PD-L1 Expression und Histologie

Histologie und PD-L1 Expression weisen einen signifikanten Zusammenhang auf mit $p=0,002$. 88,5% der Karzinome mit PD-L1 Expression waren seröse high-grade Karzinome, 4,9% undifferenzierte Karzinome und jeweils 3,3% klarzellige oder endometrioiden Karzinome. Bei den serösen G3 Karzinomen waren 23,7% für den PD-L1 positiv, bei den endometrioiden 8,7%, bei den klarzelligen 50% und bei den undifferenzierten Karzinomen 37,5%.

Tabelle 12: Histologie und PD-L1 Expression

Histologie	G3 serös N=28	G1 serös N=19	endometrioid N=23	muzinös N=13	klarzellig N=4	undifferenziert N=8	seromuzinös N=4	total
PD-L1 <1%	174	19	21	13	2	5	4	238 (79,6%)
>1%	14	0	1	0	1	0	0	16 (5,4%)
>5%	12	0	0	0	0	2	0	14 (4,7%)
>10%	20	0	1	0	1	1	0	23 (7,7%)
>25%	7	0	0	0	0	0	0	7 (2,3%)
>50%	1	0	0	0	0	0	0	1 (0,3%)

4.1.4.2. Korrelation von PD-L1 Expression zu Grading

Zwischen Grading und PD-L1 Positivität besteht ein signifikanter Zusammenhang mit einem $p=0,001$ im Chi-Quadrat-Test. 96,72% (59 Fälle) der für PD-L1 positiven sind high-grade G3 Tumore. Jeweils ein Fall entfällt auf die Gruppen G1 und G2. Die PD-L1-Positiven Fälle waren in 3,03% G1 Tumoren, in 4,17% G2 Tumoren und in 32,60% G3 Tumoren.

4.1.4.3. Korrelation von PD-L1 Expression zu p53-Mutation

Des Weiteren ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen PD-L1 Expression und p53-Mutation mit einem $p=0,008$. 91,8% der Fälle mit PD-L1 Expression weisen gleichzeitig eine p53-Mutation auf. Bei den für PD-L1 negativen Fällen sind es lediglich 75,2% mit p53-Mutation.

4.1.4.4. Korrelation von PD-L1 Expression zu PR-Expression

Ein signifikanter Zusammenhang zeigt sich zwischen PD-L1 und der PR-Expression mit einem $p=0,048$. PD-L1 positive Fälle waren in 57,4% PR positiv, hingegen PD-L1 negative Fälle in 71,4% PR positiv waren.

4.1.4.5. Korrelation von PD-L1 Expression zum Überleben

Die PD-L1 positiven Fälle zeigen im Durchschnitt ein längeres Überleben als die negativen Fälle. Sowohl im Test nach Positivität und Negativität, wie auch bei Gruppeneinteilung nach dem Cologne-Score ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,002$ bzw. $p=0,030$).

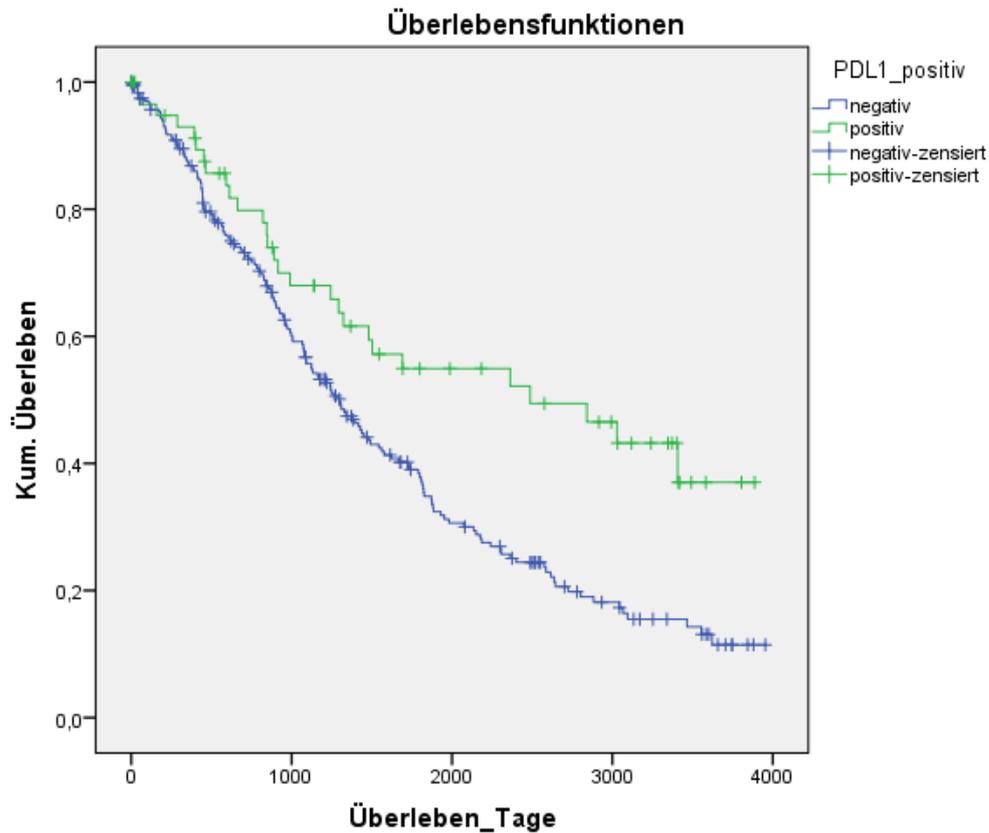


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für PD-L1 Status

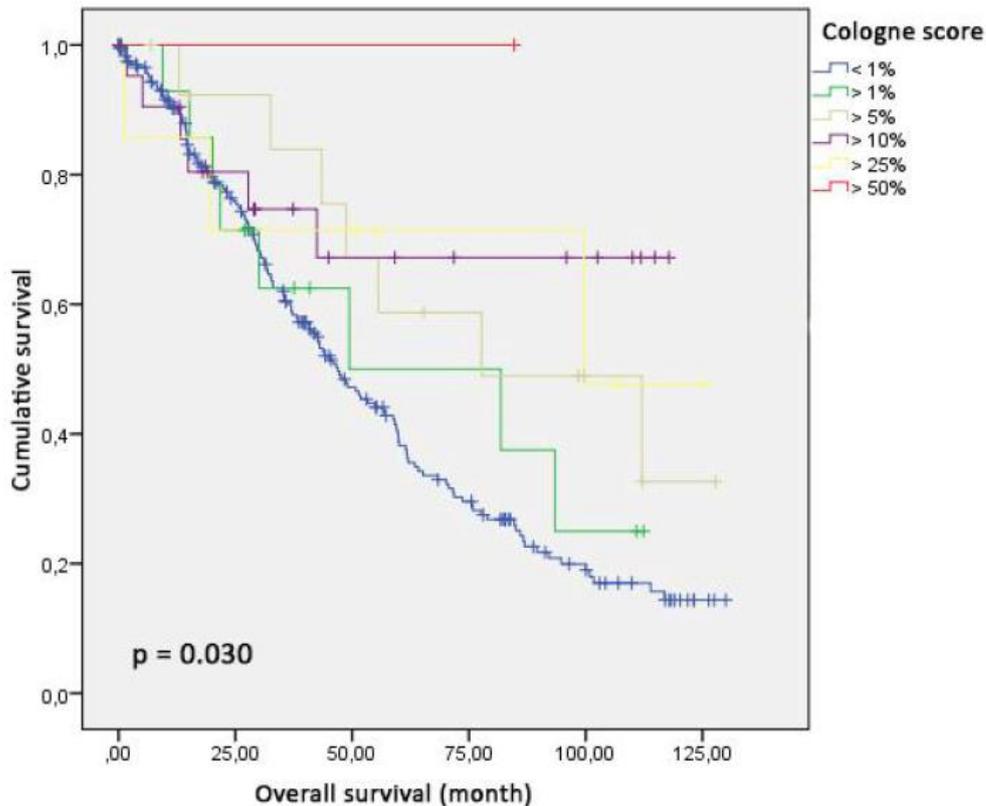


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für PD-L1 Status nach Cologne-Score

4.1.5. Mismatchreparatur Defekt

Auf dem TMA zeigten sich in 272 Fällen (91,0%) in allen vier Reaktionen eine normale Positivität, sodass eine MSI auszuschließen war. 6 Fälle zeigten einen Ausfall von 4 MMR-Proteinen und 5 Fälle hatten ein unklares Ergebnis. Die unklaren Fälle hatten Ausfälle, die keinem der Ausfallsmuster, der im Methodenteil beschriebenen Auswertungstabelle, zugeordnet werden konnten. In 16 Fällen zeigten sich einzelne Ausfälle, dabei 3 für MLH1, 7 für MSH6 und 6 Fälle für PMS2. Zur nochmaligen Überprüfung erfolgte in einem zweiten Schritt die erneute immunhistochemische Färbung und Auswertung der einzelnen MMR-Proteine an Flächenschnitten an diesen 27 möglichen Fällen. Hierbei ergab sich letztlich nur ein Fall (0,3%) mit MMR-Defekt. Dieser Fall zeigt einen Defekt für MSH2. Zwei weitere Fälle bleiben unklar, einer davon mit fraglichem PMS2 Defekt.

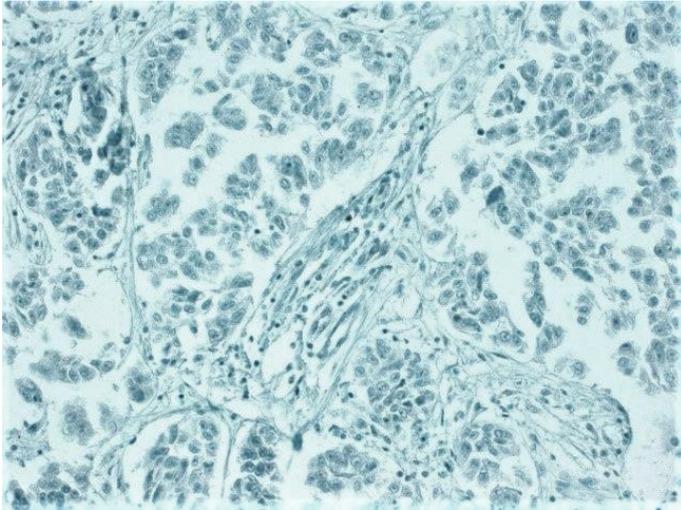


Abbildung 19: MLH1 - (40fache Vergrößerung)

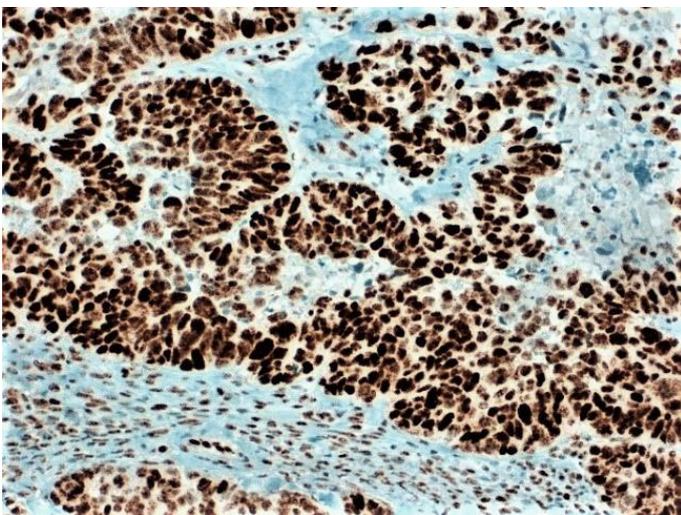


Abbildung 20: MLH1 + (40fache Vergrößerung)

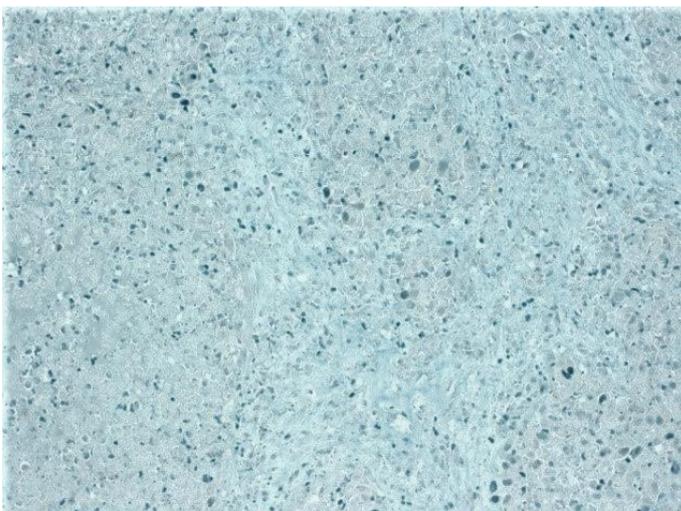


Abbildung 21: MSH2 - (40fache Vergrößerung)

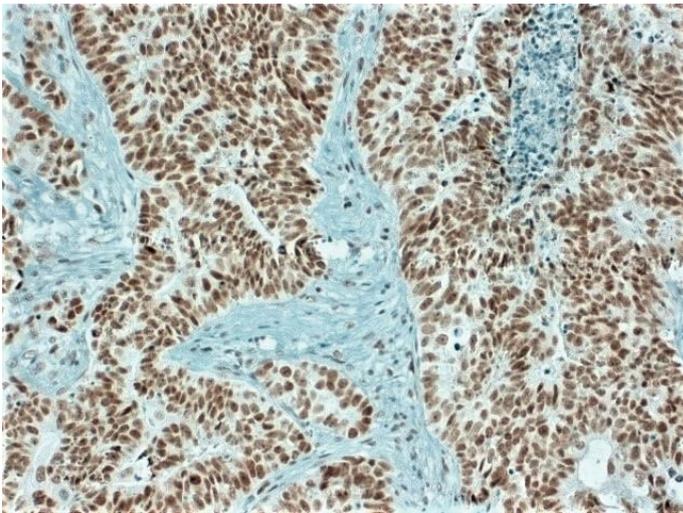


Abbildung 22: MSH2 + (40fache Vergrößerung)

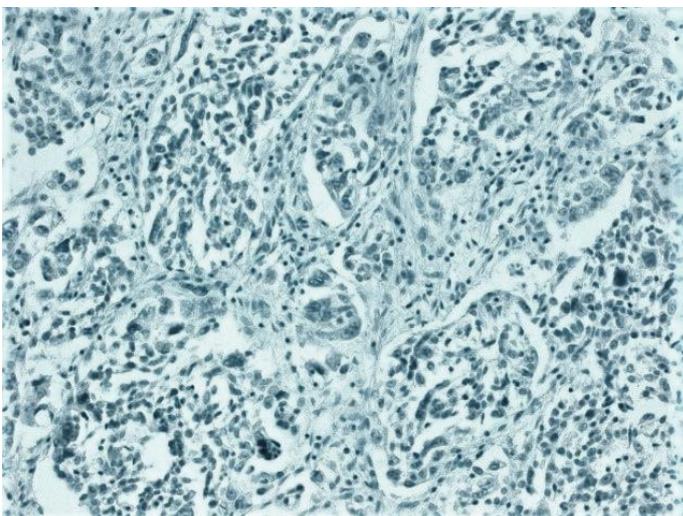


Abbildung 23: MSH6 - (40fache Vergrößerung)

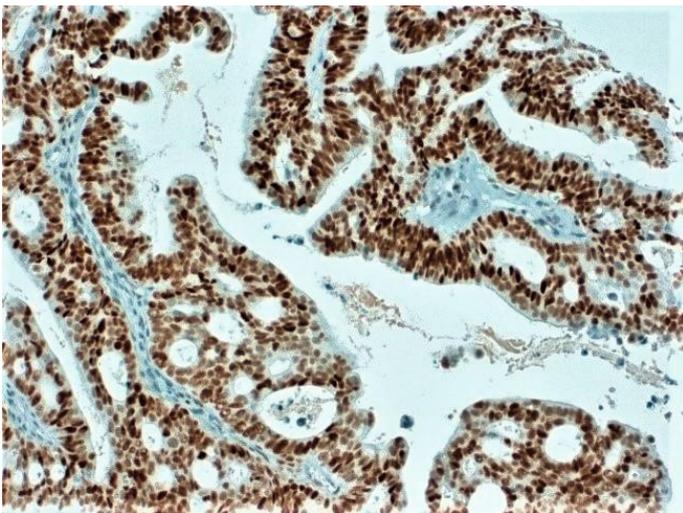


Abbildung 24: MSH6 + (40fache Vergrößerung)

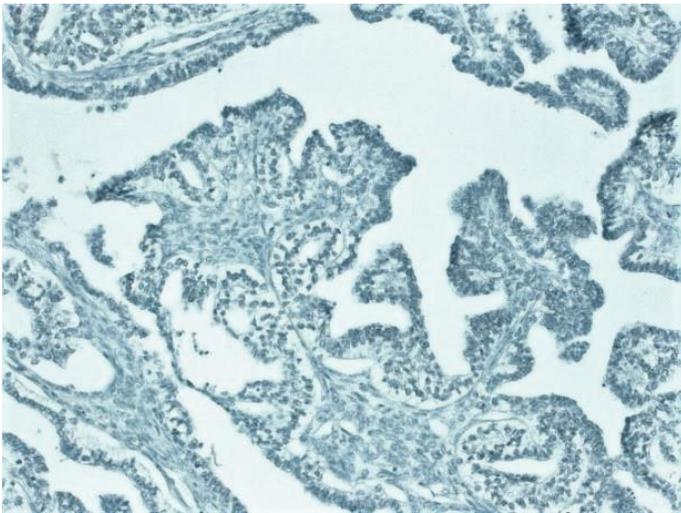


Abbildung 25: PMS2 - (40fache Vergrößerung)

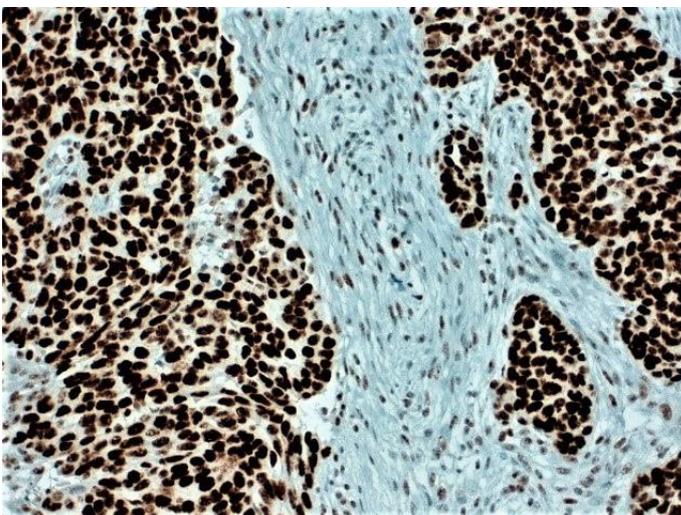


Abbildung 26: PMS2 + (40fache Vergrößerung)

Der MMR-Defekt-Fall ist ein seröses high-grade Ovarialkarzinom im FIGO-Stadium IV mit einem pT3c-Stadium sowie Lymphknoten- als auch Fernmetastasen. Das Erkrankungsalter der Patientin liegt mit 44,79 Jahren deutlich unter dem mittleren Erkrankungsalter. Dieser Fall wies einen tumorabhängigen Tod mit 252 Überlebenstagen auf. Der Tumor war ER und PR positiv, HER2 negativ, sowie negativ für PD-L1, ALK und BRAF und EGFR (siehe Tabelle 13)

Tabelle 13: Übersicht über den Fall mit MMR-Defekt

Histologie	seröses high-grade Karzinom
FIGO-Stadium	IV
TNM-Stadium	T3cN1M1
Erkrankungsalter (Jahre)	44
Überleben (Tage)	252
ER	positiv
PR	positiv
p53, Her2	negativ
PD-L1, ALK, BRAF, EGFR	negativ

Der MMR-Defekt hängt signifikant mit dem Überleben zusammen ($p=0,001$).

4.1.6. BRAF

Die BRAF-Testung konnte an 298 Fällen (99,67%) ausgewertet werden. Der fehlende Fall wies keine Tumorzellen auf. Die dreigliedrige BRAF-Untersuchung ergab bezüglich ihrer Färbeintensität 206 negative Fälle (68,9%). Als schwach positiv wurden 87 Fälle (29,1%) identifiziert. Die bei der Färbung am stärksten beobachtete Färbeintensität konnte lediglich als mäßig bezeichnet und bei 5 Fällen (1,7%) festgestellt werden.

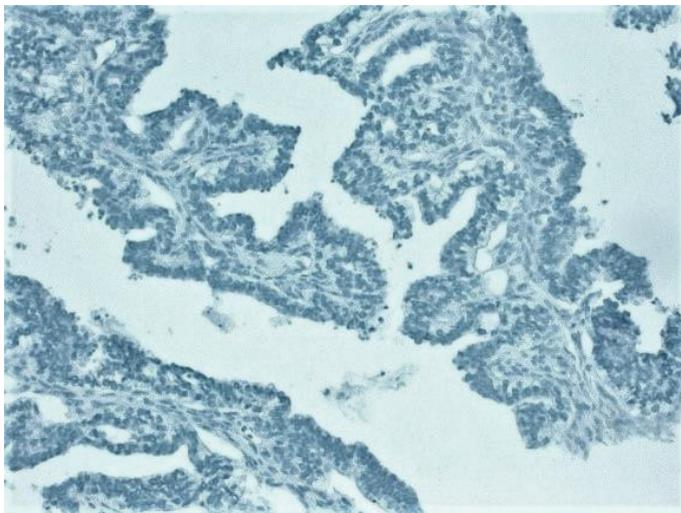


Abbildung 27: BRAF negativ (40fache Vergrößerung)

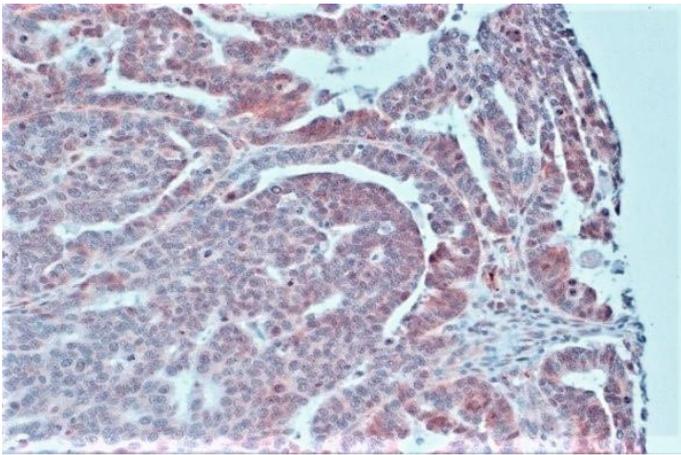


Abbildung 28: BRAF positiv, mäßige Färbereaktion (40fache Vergrößerung)

4.1.6.1. Korrelation von BRAF zur Histologie

Die 5 Fälle mit mäßiger Färbereaktion waren alle seröse Karzinome, 4 davon als G3 und einer als G1 klassifiziert. Ein signifikanter Zusammenhang mit der Histologie oder dem Grading ergab sich nicht.

4.1.6.2. Korrelation von BRAF zu ER-Expression

Ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen ER-Expression und BRAF-Status ($p=0,007$). 100% der mäßig positiven Fälle, 93,1% der schwach positiven Fälle und 83,0% der negativen Fälle sind für ER positiv.

4.1.6.3. Korrelation von BRAF zu PR-Expression

Der Fishers Exakt Test liefert auch für die PR-Expression und dem BRAF-Status einen signifikanten Zusammenhang ($p=0,003$). Bei den BRAF negativen Fällen sind 65,0% PR positiv, wohingegen bei den BRAF positiven Fällen 78,8% PR positiv sind. Unter den mäßig starken BRAF positiven Fällen sind 40,0% für den PR positiv.

4.1.6.4. Korrelation von BRAF zum Überleben

Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer BRAF-Expression und dem Überleben ($p=0,002$). Fälle mit mäßiger BRAF-Expression weisen eine kürzere Überlebensdauer auf (siehe Abbildung 29).

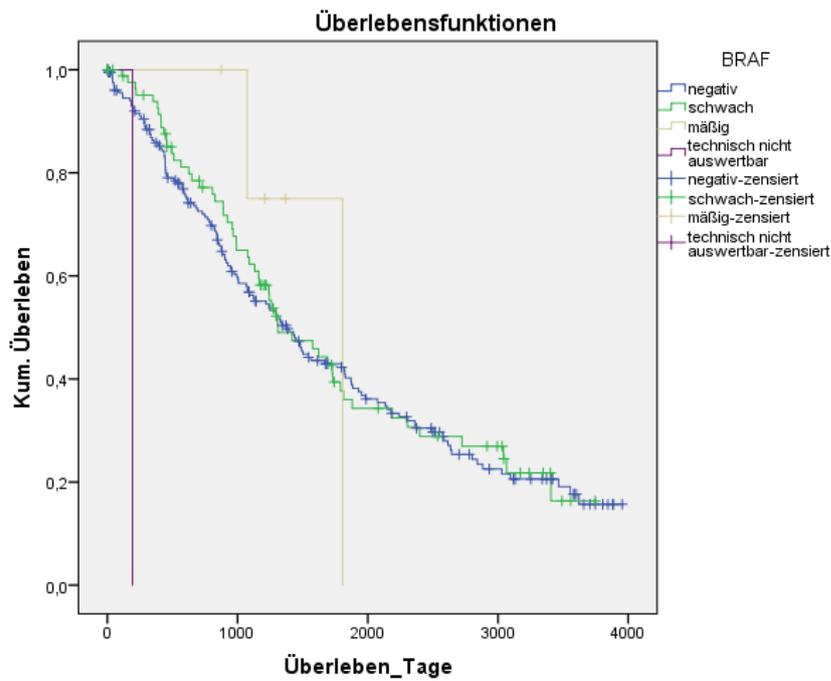


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für BRAF-Status

4.1.7. EGFR

1,3% der 299 Fälle waren technisch nicht auswertbar. Bei Wertung einer membranständigen Färbereaktion waren 222 Fälle (74,2%) positiv und 73 Fälle (24,4%) negativ. Bei Wertung ab einem PP von 10% und zusätzlicher Wertung einer zytoplasmatischen ergeben sich 226 (75,6%) positive und 69 (23,1%) negative Fälle. (26, 27)

Eine solitäre Zytoplasmafärbung zeigte sich in 35 Fällen (11,7%). 38 Fälle (12,7%) zeigten keinerlei Färbung.

31 Fälle zeigten einen Anteil von weniger als 10% positiv gefärbter Tumorzellen. Nach Einteilung in Färbeintensitäten waren 175 Fälle schwach, 76 Fälle mäßig und 6 Fälle stark gefärbt.

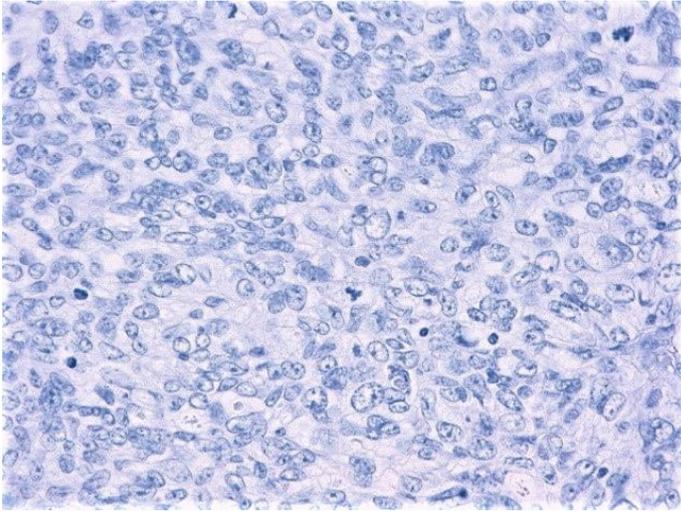


Abbildung 30: EGFR negativ (40fache Vergrößerung)

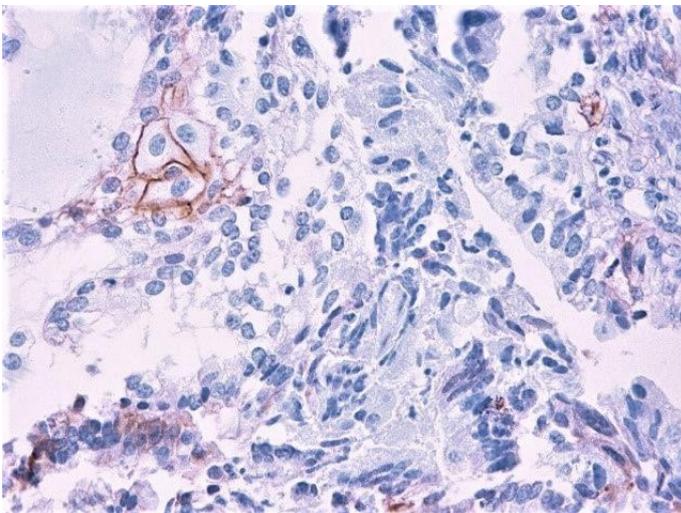


Abbildung 31: EGFR membranständige Färbung (40fache Vergrößerung)

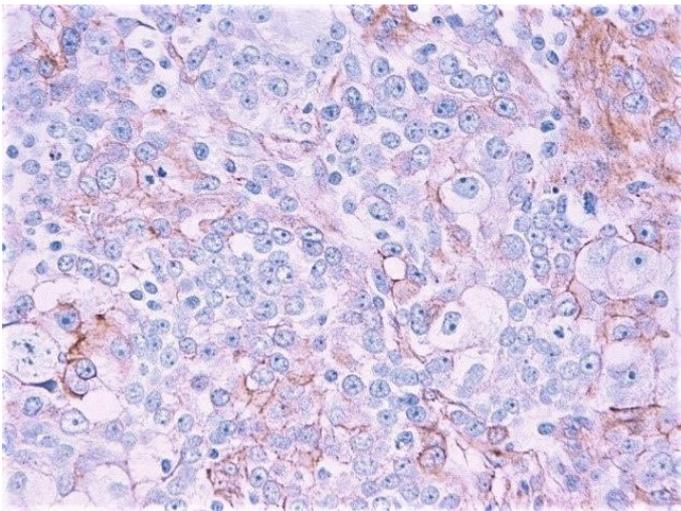


Abbildung 32: EGFR PP 50 (40fache Vergrößerung)

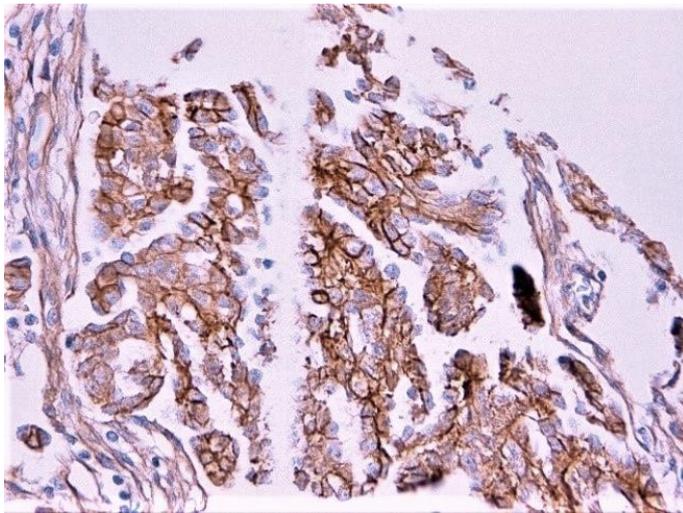


Abbildung 33: EGFR PP 90 membranständige und zytoplasmatische Färbung (40fache Vergrößerung)

Tabelle 14: EGFR Anteil gefärbter Zellen Verteilung

EGFR Anteil gefärbter Zellen

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	38	12,7	12,7	12,7
	5	31	10,4	10,4	23,1
	technisch nicht auswertbar	4	1,3	1,3	24,4
	10	34	11,4	11,4	35,8
	20	24	8,0	8,0	43,8
	30	26	8,7	8,7	52,5
	40	11	3,7	3,7	56,2
	50	21	7,0	7,0	63,2
	60	16	5,4	5,4	68,6
	70	36	12,0	12,0	80,6
	80	33	11,0	11,0	91,6
	90	24	8,0	8,0	99,7
	100	1	,3	,3	100,0
	Gesamt		299	100,0	100,0

4.1.7.1. Korrelation von EGFR-Expression zu ALK-FISH

Die beiden in der ALK-FISH amplifizierten Fälle (100%) sind EGFR positiv (p=0,037).

4.1.7.2. Korrelation von EGFR-Expression zur Histologie

Nach der EGFR-Auswertung >10% gefärbter Tumorzellen ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression und der Histologie (p=0,008). In absteigender Reihenfolge findet sich unter den histologischen

Subtypen eine EGFR-Positivität: serös G1 95,8%, muzinös 92,3%, seromuzinös und klarzellig je 75,0%, serös G3 74,0%, endometrioid 65,2% und undifferenziert 62,5%.

4.1.7.3. Korrelation von EGFR-Expression und T-Stadium

Zwischen T-Stadium und EGFR-Positivität >10% besteht ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,048$). Im T1-Stadium sind 64,3% der Fälle EGFR positiv, im T2-Stadium sind 71,4% positiv und im T3-Stadium sind es 77,6%.

4.1.7.4. Korrelation von EGFR und PD-L1

Wertet man als positiv ab 10% gefärbten Zellen, so ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang zu PD-L1 ($p=0,005$). 83,6% der EGFR positiven Fälle sind PD-L1 negativ und 16,3% positiv. Bei den EGFR negativen Fällen sind 65,2% PD-L1 negativ und 34,8% positiv.

4.1.8. ALK-Expression

Alle 299 Fälle waren in der ALK IHC auswertbar. 8 Fälle (2,7%) zeigten ein stark positives Ergebnis, 99,0% (296) waren negativ. Die 8 positiven Fälle wurden am Flächenschnitt nochmals überprüft. Hierbei wurden 5 der ursprünglich als positiv gewerteten Fälle aufgrund ihres unspezifischen Färbemusters als negativ identifiziert. Somit verbleiben 3 positive Fälle (1,0%). Alle Fälle konnten technisch ausgewertet werden. Folgende Tabelle vergleicht die drei in der IHC positiven Fälle.

Tabelle 15: Übersicht über die in der IHC positiven ALK-Fälle

	OVCA425	OVCA015	OVCA166
histologischer Subtyp	serös, high-grade	endometrioid	endometrioid
Grading	G3	G2	G2
FIGO-Stadium	III	III	II
Überlebenstage	41	392	1742
Diagnosealter	70 Jahre	34 Jahre	53 Jahre
ER	negativ	negativ	positiv
PR	negativ	positiv	positiv
HER2	negativ	unklar	negativ
PD-L1	positiv	negativ	negativ
BRAF-Mutation	negativ	positiv	positiv
EGFR membranös	positiv	positiv	negativ
EGFR ab 10%	positiv	positiv	positiv

4.1.8.1. Korrelation von ALK-Mutation und Grading

Es ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang mit $p=0,024$ zwischen dem Grading und immunhistochemisch nachgewiesener ALK-Mutation. 2 der 3 Fälle sind ein G2 Tumor (75%) und einer ist ein G3 Tumor (25%).

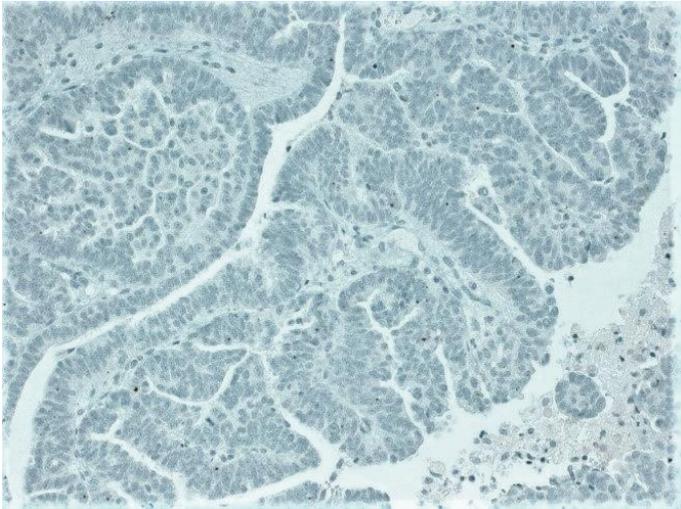


Abbildung 34: ALK negativ (40fache Vergrößerung)

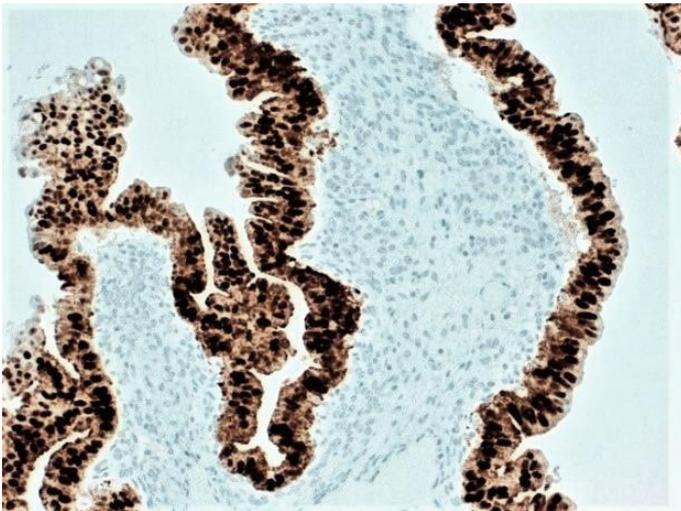


Abbildung 35: ALK stark positiv (40fache Vergrößerung)

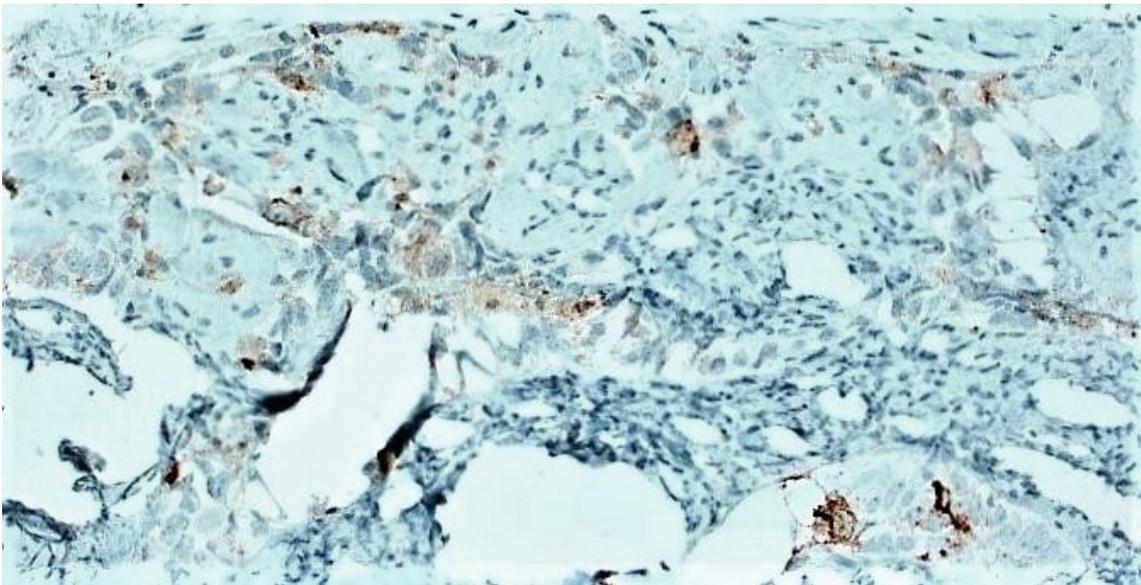


Abbildung 36: ALK unspezifische Färbung (40fache Vergrößerung)

4.1.9. HER2

Alle 299 Fälle waren für die IHC von HER2 auswertbar. 84,3% (252 Fälle) sind negativ, 13,7% (41 Fälle) unklar und 2,0% (6 Fälle) weisen eine Positivität für den HER2 auf.

Die mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nicht übereinstimmenden Fälle wurden an Flächenschnitten überprüft. Vier Fälle, die ursprünglich als negativ gewertet waren, wurden als unklar identifiziert.

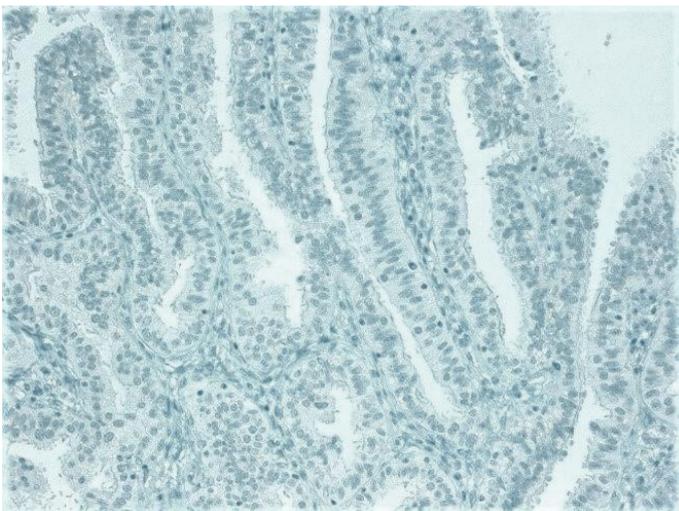


Abbildung 37: HER2 negativ (0) (40fache Vergrößerung)

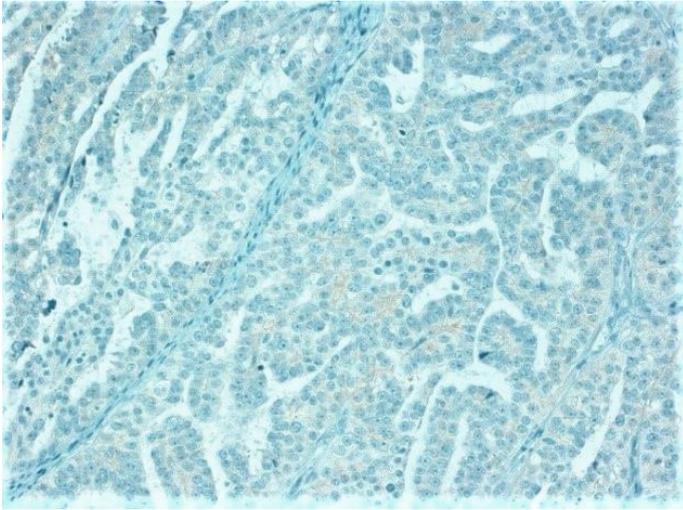


Abbildung 38: HER2 negativ (1+) (40fache Vergrößerung)

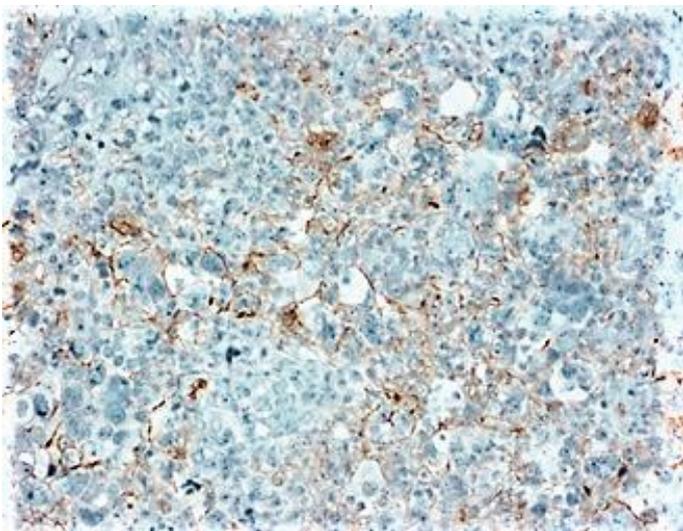


Abbildung 39: HER2 "unklar" (2+) (40fache Vergrößerung)

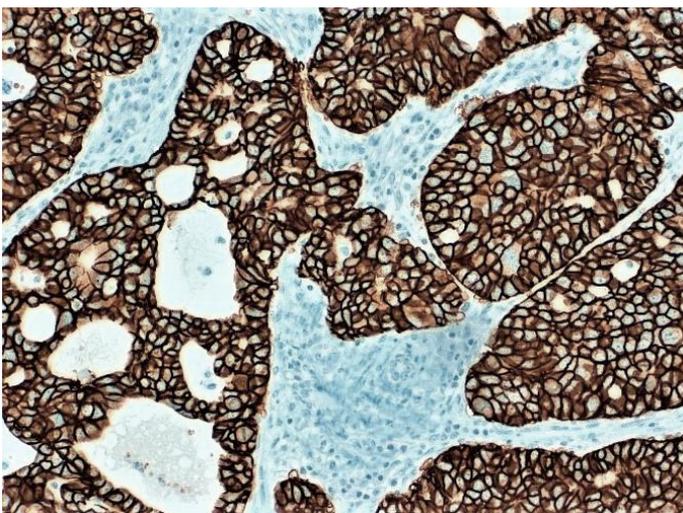


Abbildung 40: HER2 positiv (3+) (40fache Vergrößerung)

4.2. Ergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Korrelation mit der Immunhistochemie

4.2.1. ALK-FISH

Aufgrund technischer Probleme waren 6,3% (19 Fälle) nicht auswertbar. Der Großteil der Fälle (279 Fällen (93,0%)) war ohne nachweisbare ALK-Translokation. Bei zwei Fällen (0,7%) konnte in der FISH eine ALK-Inversion festgestellt werden. Im Fall OVCA 425 zeigten sich 63,3% ALK-Split-Signale mit einer Inversion in 43,3%. Bei OVCA 015 zeigten sich 23,3% ALK-Split-Signale mit einer ALK/EML4-Inversion in 11,7% der Tumorzellen.

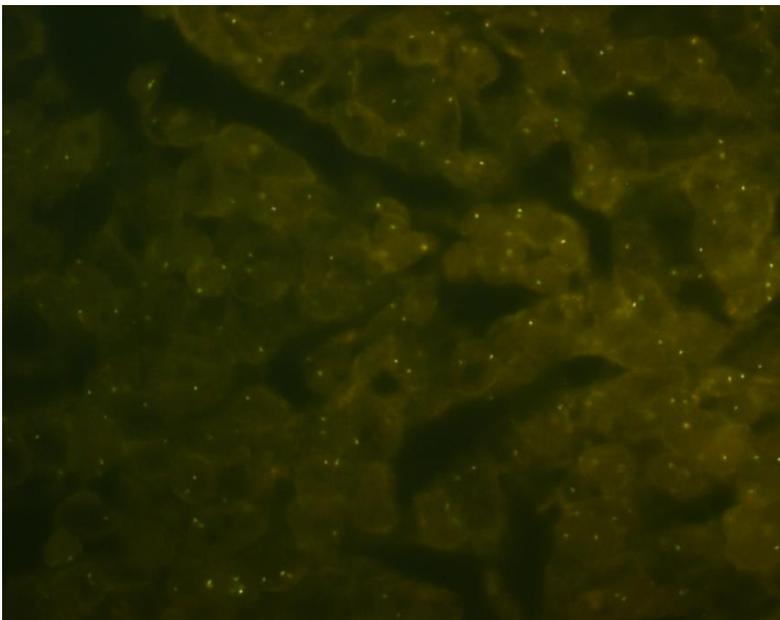


Abbildung 41: ALK negativ, viele gelbe Fusionssignale sichtbar

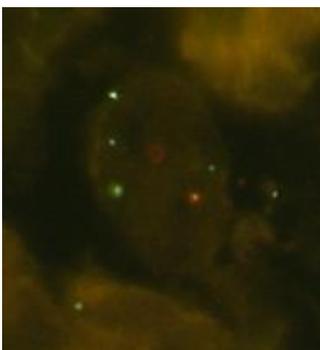


Abbildung 42: ALK positiv break apart OVCA 425

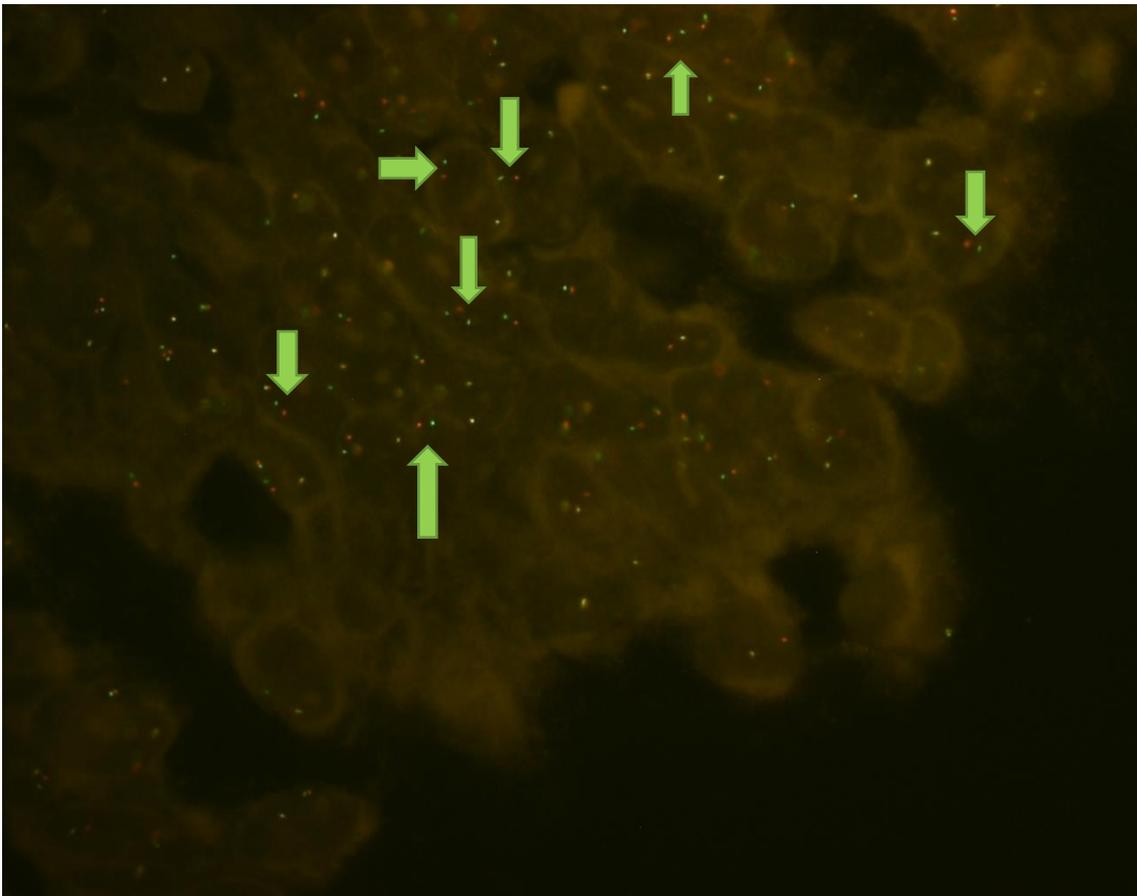
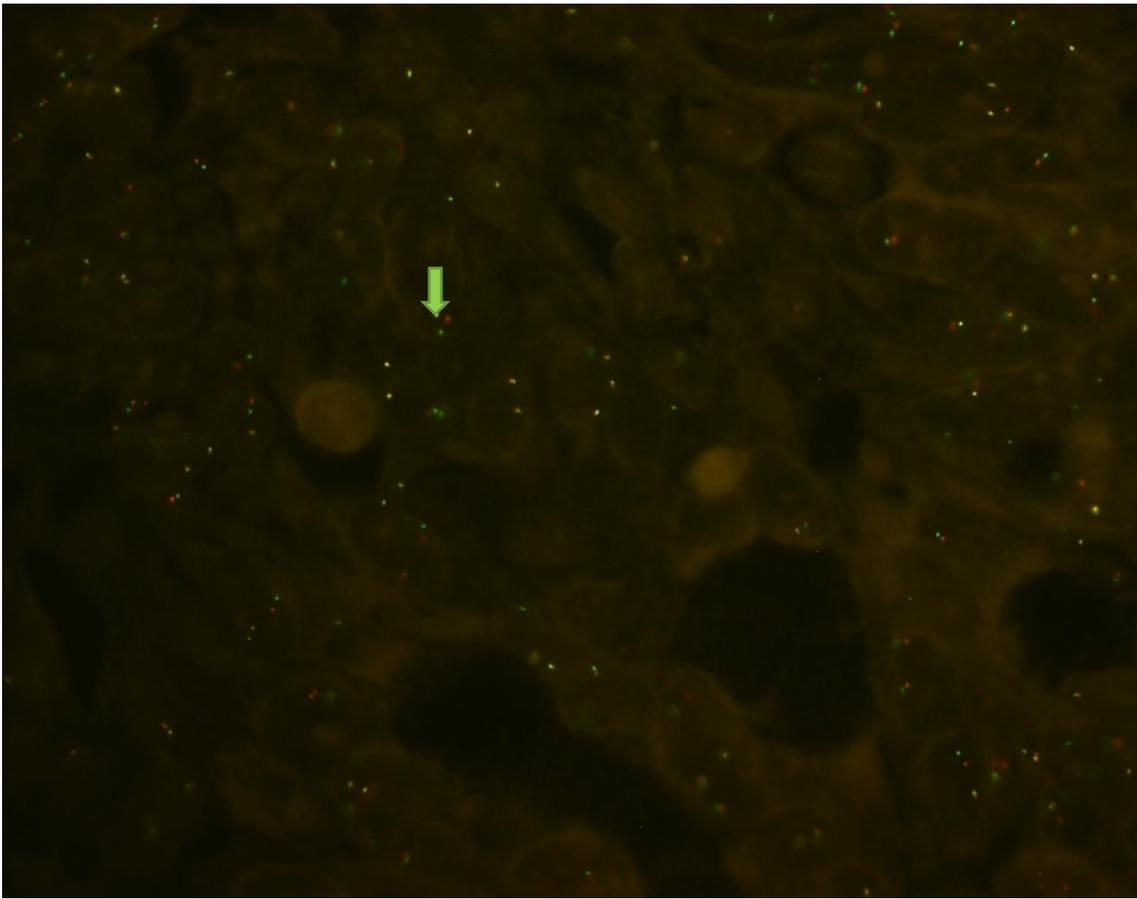


Abbildung 43: ALK positiv OVCA 015, break aparts mit Pfeilen gekennzeichnet

4.2.1.1. Korrelation von IHC zu FISH

Beide ALK-mutierte Fälle wurden immunhistochemisch identifiziert. Zwischen IHC und FISH besteht somit ein signifikanter Zusammenhang mit $p < 0,001$.

Die beiden positiven Fällen (vergleiche Tabelle 14 OVCA425 und OVCA015) weisen ein im Vergleich zum Gesamtkollektiv deutlich kürzeres Überleben auf. 392 Tage bzw. 41 Tage. In beiden Fällen ist ein tumorabhängiger Tod dokumentiert, ein FIGO Stadium III diagnostiziert und eine ER-Negativität gefunden worden. Eine weitere Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren wurde nicht gefunden. Der verbleibende immunhistochemisch positive Fall war in der FISH-Analyse nicht auswertbar.

4.2.1.2. Korrelation von ALK-FISH und ER-Expression

Ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen ER-Expression und ALK-FISH mit $p = 0,011$. Die beiden in der ALK-FISH positiven Fälle sind beide ER negativ (100%).

ALK-FISH und HER2-FISH weisen einen signifikanten Zusammenhang mit $p = 0,001$ auf. Keiner der HER2 amplifizierten Fälle ist in der ALK positiv. Bei den ALK positiven Fällen ist ein Fall HER2 negativ und einer verbleibt in der Kategorie unklar.

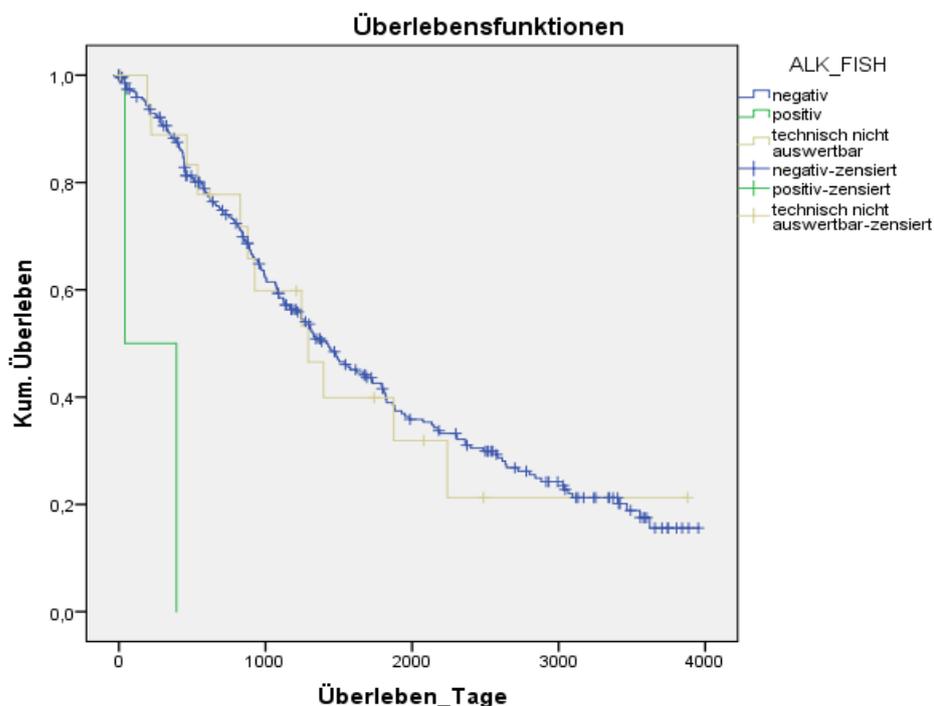


Abbildung 44: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die ALK-FISH

4.2.2. HER2-FISH

In 1,3% (4 Fällen) konnte die FISH nicht ausgewertet werden. Es zeigten sich 12 (4,0%) amplifizierte Fälle und 283 Fälle 90,6% nicht amplifizierte Fälle. Weitere 4% (12 Fälle) verbleiben in der Kategorie unklar.

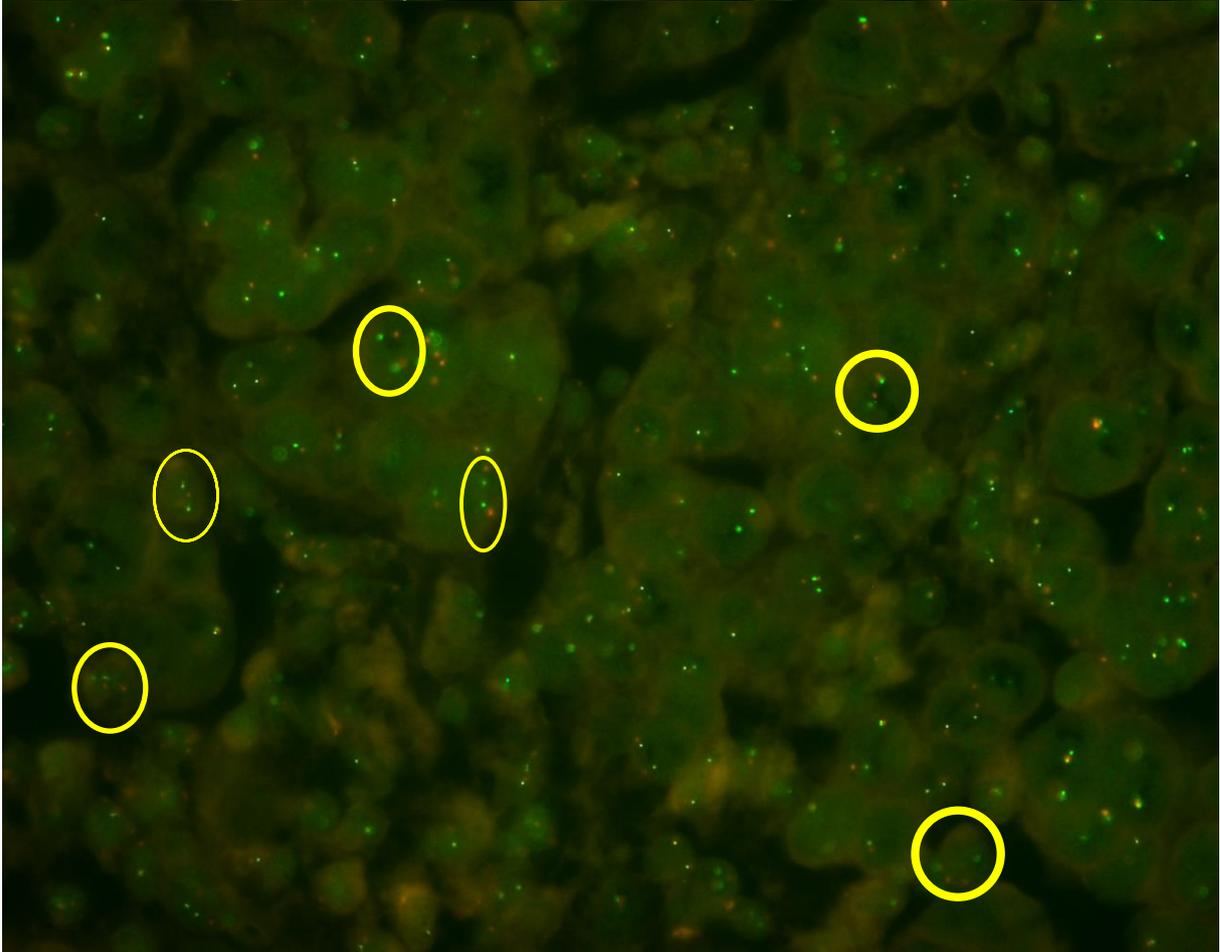


Abbildung 45: HER2 nicht amplifiziert, einige Zellkerne mit je 2 roten und 2 grünen Signalen sind per Kreis markiert

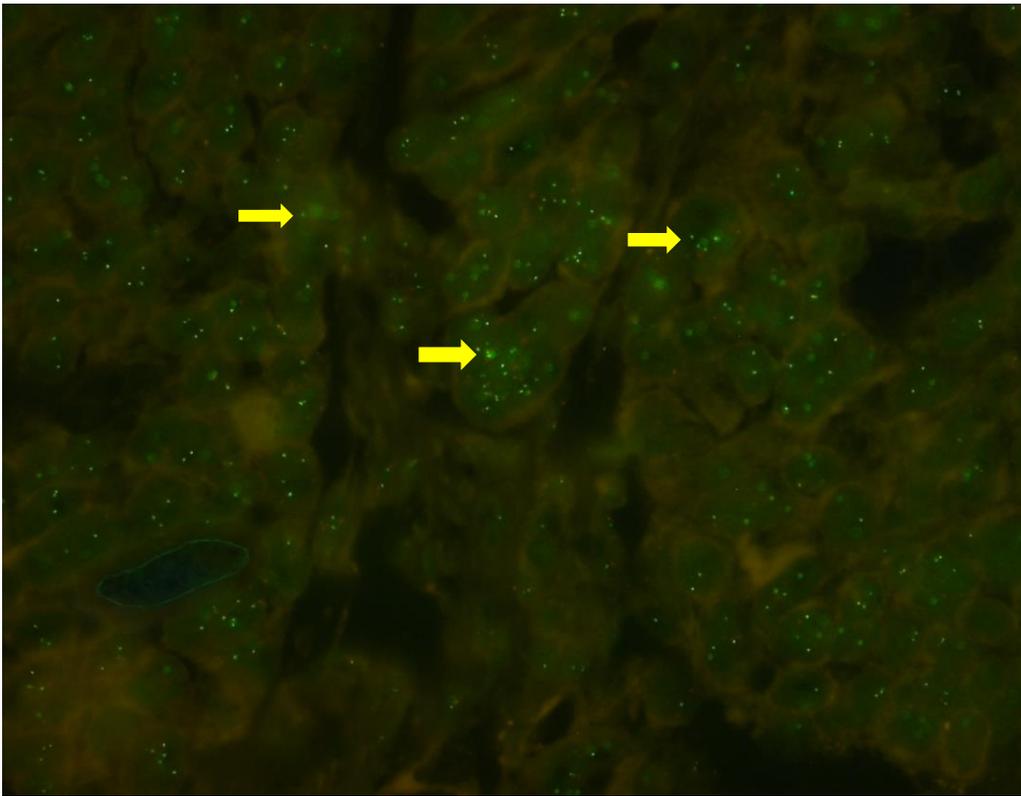


Abbildung 46: HER2-FISH von OVCA407: Amplifikation mit A: 2,26, viele grüne und wenig rote Signale, Mikrocluster (einige markiert mit gelbem Pfeil)

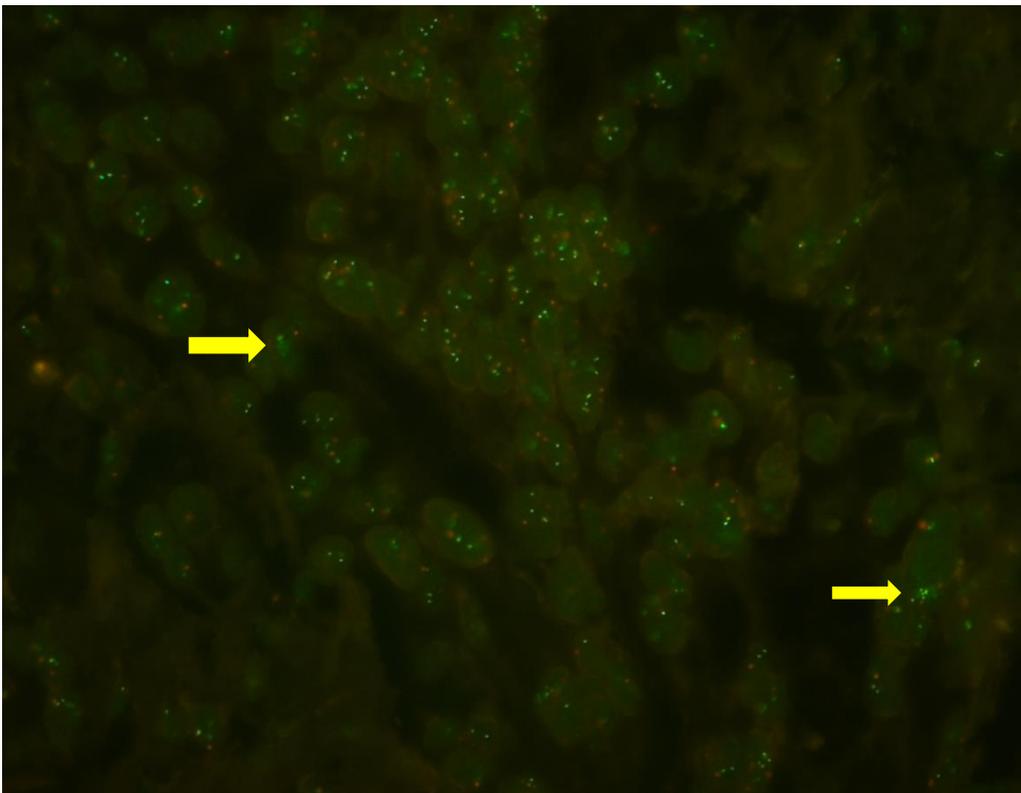


Abbildung 47: HER2-FISH von OVCA422: Amplifikation mit B: 6,28, viele Signale pro Zellkern sichtbar, Mikrocluster (einige markiert mit gelbem Pfeil)

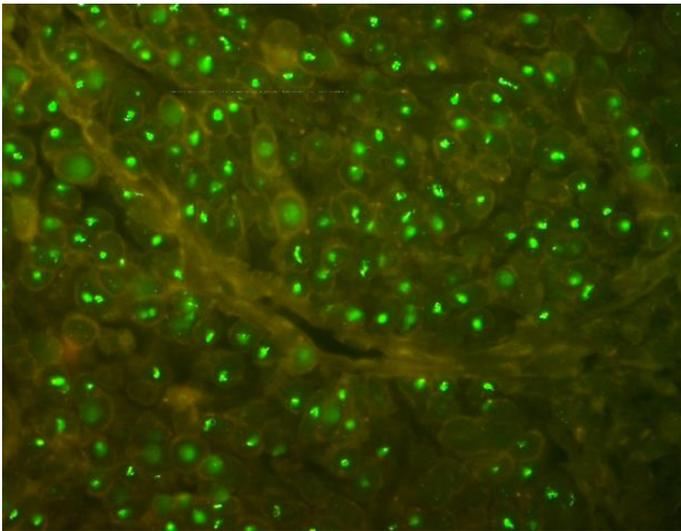


Abbildung 48: HER2-FISH OVCA 343: Amplifikation mit Clustern

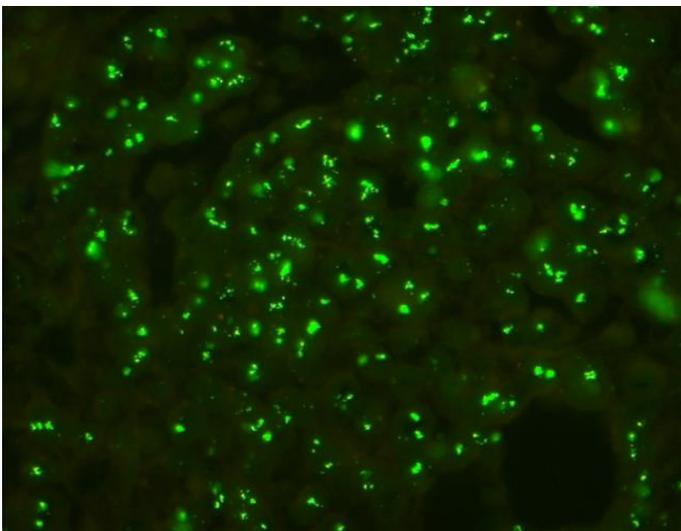


Abbildung 49: HER2-FISH OVCA 408: Amplifikation mit Clustern

4.2.2.1. Korrelation von IHC und FISH

Die immunhistochemische Testung und die FISH-Analyse weisen einen signifikanten Zusammenhang auf ($p < 0,001$). Von den 6 in der IHC als positiv klassifizierten Fällen ist ein Fall in der FISH nicht auswertbar, 2 Fälle sind negativ und 3 Fälle sind positiv. Bei den 41 durch IHC zunächst als unklar eingestuftten Fällen erwiesen sich 26 als negativ, 5 verblieben unklar und 9 stellten sich in der FISH amplifiziert dar. Ein Fall war technisch nicht auswertbar in der FISH. Die 252 in der IHC negativen Fälle enthalten 2 nicht auswertbare, 243 negative und 7 unklare Fälle in der FISH.

Eine Clusterbildung wurde in den drei, bereits in der IHC als positiv eingestuftten Fällen gesehen.

Tabelle 16: Übersicht über die HER2 positiven Fälle

Histologie	IHC	FISH
serös high-grade	unklar	
undifferenziert	unklar	
serös high-grade	positiv	Cluster
serös high-grade	positiv	Cluster
serös high-grade	unklar	
serös high-grade	unklar	
serös high-grade	positiv	Cluster
serös high-grade	unklar	
undifferenziert	unklar	

4.2.2.2. Korrelation von HER2-FISH zur Histologie

Ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen der HER2 FISH-Analyse und der Histologie mit einem $p=0,035$. Zehn der zwölf amplifizierten Fälle (83,3%) sind high-grade seröse Karzinome. Die restlichen 16,7% fallen auf undifferenzierte Karzinome (2 Fälle).

4.2.2.3. Korrelation von HER2-Amplifikation zu Grading

HER2-Amplifikation und Grading hängen signifikant zusammen mit einem $p=0,013$. Jeder der 12 amplifizierten Fälle weist ein G3 Grading auf. Bei den unklaren Fällen zeigt sich in 58,3% ebenfalls ein G3-, mit 25,0% ein G2- und in 16,7% ein G1-Stadium. Bei den nicht amplifizierten Fällen sind 81,2% G3 zugeordnet, 7,7% G2 und 11,1% G1.

Ergebnisse

Tabelle 17: Aufgedeckte Mutationen/Expressionsmuster und deren Histologie Übersicht

	High-grade serös N=223	Low-grade serös N=24	Endometrioid N=23	Muzinös N=13	Klarzellig N=4	Seromuzinös N=4	Undifferenziert N=8
PD-L1 N=60	53 (23,8%)	-	2 (8,7%)	-	2 (50%)	-	3 (37,5%)
MSI N=1	1 (0,4%)	-	-	-	-	-	-
ALK N=2	1 (0,4%)	-	1 (4,3%)	-	-	-	-
HER2 N=12	10 (4,5%)	-	-	-	-	-	2 (25%)
BRAF N=92	62 (27,8%)	9 (47,4%)	8 (34,8%)	7 (53,8%)	1 (25%)	2 (50%)	3 (37,5%)
mäßige N=5	4 (1,8%)	1 (5,3%)	-	-	-	-	-
EGFR mem. N=22	167 (74,8%)	20 (83,3%)	14 (60,8%)	11 (84,6%)	3 (75%)	3 (75%)	4 (50%)
>10% N=22	165 (73,9%)	23 (95,8%)	15 (65,2%)	12 (92,3%)	3 (75%)	3 (75%)	5 (62,5%)
6							

Ergebnisse

Korrelationstabelle (mit ALK und HER2 FISH-Ergebnissen):

Tabelle 18: Übersicht Zusammenhänge der spezifischen aufgedeckten Mutationen

	Histo logie	FI G O	Gra ding	TN M	Überl eben	ER	PR	p53	PD- L1	HE R2	ALK
PD -L1	p=0, 002	ns	p=0, 001	ns	p=0,0 02 Colo gne p=0,0 30	ns	p=0, 048	p=0, 008	-	ns	ns
BR AF	ns	ns	ns	ns	p=0,0 02	p=0, 007	p=0, 003	ns	ns	ns	ns
EG FR	>10 % p=0, 008	ns	ns	T:>1 0% p=0, 048	ns	ns	ns	ns	>10 % p=0, 005	ns	me m. P=0, 037
HE R2	p=0, 035	ns	p=0, 013	ns	ns	ns	ns	p=0, 035	Ns	-	ns
AL K	ns	ns	ns	ns	p<0,0 01	p=0, 011	ns	ns	Ns	p=0, 001	-
MS I	ns	ns	ns	ns	p=0,0 01	ns	ns	ns	Ns	ns	ns

5. Diskussion

5.1. Überblick

Ovarialkarzinome haben mit einer 5-Jahres-Gesamtüberlebenszeit von nur 41% eine schlechte Prognose und werden bislang nach aktuellen Leitlinien relativ einheitlich behandelt.(2) Hauptzielsetzung dieser Arbeit ist die Suche nach in anderen Tumoren beobachteten Mutationen und Expressionsmustern am Ovarialkarzinom, um im Weiteren eine Übertragung zielgerichteter Therapien in Aussicht stellen zu können. Aus vier aufeinander folgenden Jahren wurden alle (n=299) Ovarialkarzinome aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der LMU München zusammengetragen und für die geplanten Untersuchungen 10 TMAs hergestellt. Es wurden immunhistochemische Untersuchungen für ER, PR, HER2, p53, BRAF, EGFR, PD-L1 Expression, für MMR-Defekt und für ALK durchgeführt. Anschließend erfolgten zwei FISH-Untersuchungen (HER2- und ALK), um die Ergebnisse der immunhistochemischen Reaktionen zu verifizieren. Die Häufigkeiten der untersuchten Mutationen zeigten sich in der statistischen Auswertung wie folgt: 86% ER positiv, 68,9% PR positiv, HER2-Amplifikation in 4%, 78,6% mit p53-Mutation, BRAF in 30,8% oder 1,7%, EGFR in circa 75%, PD-L1 Expression in 20,4%, MMR-Defekt in einem Fall und ALK-Translokation in 2 Fällen. Ein möglicher Weg zur Prognoseverbesserung ist die klinische Erprobung zielgerichteter Therapien am Ovarialkarzinom. Auch wenn, mit relativ hohem Aufwand nur einzelne Fälle diesen Therapien zugeführt werden könnten, gilt es unter dem Motto „care for the rare“ eine verbesserte Individualmedizin voranzutreiben.

5.2. Diskussion der Methoden

5.2.1. Patientenkollektiv

Mit 299 selektierten Fällen handelt es sich um ein großes Kollektiv mit nahezu vollständig erfassten Überlebensdaten. Patientenalter, Histologie, Grading, TNM-Stadium und FIGO-Stadium lagen bereits vor oder wurden nachträglich erfasst. Nichtsdestotrotz sind seltene histologische Typen gering vertreten. Die Kollektivgröße anderer Studien ist sehr variabel. Viele Studien haben eine geringere Fallzahl, es gibt aber auch größere Fallzahlen insbesondere bei Metaanalysen, welche mehrere Studien miteinschließen wie zum Beispiel „Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: an Ovarian Tumor

Tissue Analysis consortium study“ von Sieh et al. veröffentlicht in the Lancet Oncology mit 2933 Fällen.(11, 17, 27, 55)

5.2.2. TMA

Eine Analyse aus 12 Studien mit TMAs an Ovarialkarzinomen zur immunhistochemischen Untersuchung des ER und PR Status zeigt, dass diese Technik auch bereits beim Ovarialkarzinom in Studien etabliert ist (17).

Als Schlussfolgerung für die Praxis gilt, dass TMAs gute Instrumente für Screening-Untersuchungen sein können, Nachtestungen an auffälligen Fällen an Flächenschnitten jedoch genauer und oft unerlässlich sind.

5.2.3. Immunhistochemische Färbungen

Nicht für alle Untersuchungen gibt es bereits etablierte Score-Systeme und für die mit etablierten Systemen ist nicht klar, ob entsprechende Cut-offs auf die Färbungen am Ovarialkarzinom übertragbar sind. Dies könnte auch Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse in Frage stellen.

ALK und HER2 IHC können nach vorliegenden Ergebnissen als Screeningverfahren vor der FISH-Untersuchung beim Ovarialkarzinom verwendet werden. Im Weiteren ist eine Erstellung von detaillierten Auswertungssystemen oder weitere Beurteilung der Übertragbarkeit für die einzelnen Testungen am Ovarialkarzinom durch Studien wünschenswert.

5.2.4. FISH

Hervorzuheben ist die höhere Verlässlichkeit der Ergebnisse im Gegensatz zur IHC aufgrund von Analysen direkt auf Genebene. In der Praxis sind FISH-Präparate jedoch sowohl in der Herstellung als auch in der Auswertung kosten-, zeit- und personalintensiv. Aufgrund der größeren Herstellungskomplexität der Präparate sind diese auch anfälliger für technische Probleme und führen somit häufiger als die IHC zu nicht auswertbaren Fällen. Fraglich ist weiterhin die Übertragbarkeit der etablierten Mamma und Lungenkriterien auf Ovarialkarzinomgewebe. Für die HER2 Untersuchung des muzinösen Ovarialkarzinom beispielsweise verwendeten Chao et al. bei der FISH-Auswertung die etablierten Mamma-Kriterien.(59)

FISHs am Ovarialkarzinom auf ALK sind auch bereits durchgeführt worden.(60) Die Festsetzung für Auswertkriterien für Ovarialkarzinome ist bei Einführung dieser Untersuchungen in der Praxis sicher notwendig. Gegebenenfalls können

diese sowie einzelne Schritte in der Herstellung, durch weitere Testung noch optimiert werden.

5.3. Diskussion der Ergebnisse

5.3.1. ER und PR

In einer großen Hormonrezeptor-Studie von Sieh et al. aus dem Lancet an 2933 Fällen erwiesen sich weniger Fälle als hormonrezeptorpositiv. Für den ER waren es insgesamt 63,9% und für den PR 32,3%. Für die Verteilung auf die histologischen Subgruppen ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Besonders häufiges Auftreten konnte bei serösen und endometrioiden Karzinomen gezeigt werden, seltenes bei muzinösen und klarzelligen Karzinomen.(17) Der Unterschied in der Fallzahl der Hormonrezeptor-Positiven ist durch die unterschiedliche Kollektivzusammensetzung an histologischen Subtypen begründet. Im Vergleich zu Sieh et al. liegt der Anteil an serösen und endometrioiden Karzinomen in der vorliegenden Arbeit höher. Zusätzlich treten weniger häufig muzinöse und klarzellige Karzinome auf. Zu den Überlebensdaten gibt es bislang widersprüchliche Ergebnisse. Während Kruchten et al. von einer Korrelation mit einem kurzen Überleben berichten, ergibt sich bei Sieh et al. oder Tkalia et al. ein reduziertes Sterberisiko bei Hormonrezeptorpositivität, wie in dieser Untersuchung.(17, 61, 62) Bei Sieh et al. zeigte sich eine Assoziation von Hormonrezeptor-Positivität und einem geringeren Grading. Dies steht im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen.

Ein Zusammenhang mit einem verbesserten Überleben ist möglicherweise auf eine durch den PR ausgelöste Apoptose begründet.(17) Zusammenfassend bestätigen die vorliegenden Ergebnisse ein vermehrtes Auftreten von Hormonrezeptor-Positivität bei serösen und endometrioiden Karzinomen und ein verbessertes Überleben. Somit kann der Hormonrezeptor-Status als Prognosefaktor Verwendung finden und über die nötige Aggressivität der Behandlung mit Behandlungsalternativen besser entschieden werden. Aufgrund der hohen Expressionsrate der Hormonrezeptoren gibt es kleinere Studien für verschiedene antihormonelle Therapien bereits seit ungefähr 25 Jahren.(63) Bislang zeigten diese antiandrogenen Behandlungsansätze geringe Effekte bei einer Patientenminderheit. Studien mit Flutamid zeigten Ansprechraten von 4,3 und 6,3%, bei Letrozol waren es 7% und 15%, bei Tamoxifen 10%und 13% und in Kombination mit Goserelin 11,8%.(64) Eine Korrelation des Ansprechens mit

der Hormonrezeptor-Expression wird angenommen, einige der Studien konnten jedoch keinen Zusammenhang zeigen.(63, 65-68) Aufgrund der unbefriedigenden Ansprechraten sind neue Substanzen Gegenstand aktuellerer Forschungen wie zum Beispiel 17beta-Estradiol-Platin-gekoppelte Chemotherapiehybriden in vitro und am Mausmodell.(69) Die antihormonelle Therapie ist seit Langem als möglicher Ansatzpunkt bekannt, jedoch gibt es bislang keine ausreichend großen Studien zur adäquaten Evaluation der vorhandenen Substanzen. Die geringen Ansprechraten in kleineren Studien legen die Notwendigkeit der Entwicklung und Erprobung anderer Substanzen mit gleichem Zielpunkt nahe.

5.3.2. p53-Mutation

Es wurde das nach Gilks et al. veröffentlichte Auswertungsschema verwendet und eine große Fallzahl p53-mutierter Ovarialkarzinome konnte gefunden werden. Der Zusammenhang der Mutation mit der Histologie und das häufige Auftreten der p53-Mutation bei serösen high-grade Karzinomen deckt sich mit den aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen.(48) Laut dem Cancer Genome Network sind 96% der high-grade serösen Ovarialkarzinome p53-mutiert.(70) In dieser Arbeit konnten vergleichbar hohe Zahlen mit 90,6% gefunden werden. Bei muzinösen Karzinomen finden sich in der Literatur Angaben von 52 oder 54%, in der vorliegenden Arbeit liegt wiederum ein vergleichbarer Wert von 61,5% vor.(71) Bei endometrioiden Karzinomen stehen beispielsweise von Karamurzin et al. beschriebene 12,5% in der vorliegenden Arbeit 39,1% gegenüber.(52) Ein seltenes Vorkommen ist bei low-grade serösen und seromuzinösen Ovarialkarzinomen beschrieben.(72) Mögliche Erklärung für die höheren Prozentwerte bei den selteneren histologischen Gruppen ist möglicherweise durch deren geringe Fallzahl im Vorliegenden begründet. Bei insgesamt 4 seromuzinösen Fällen entsprechen 25,0% mit p53-Mutation lediglich einem Fall. Die signifikanten Zusammenhänge mit Grading, FIGO- und T-Stadium hängen auch mit dem histologischen Subtyp zusammen. Der Großteil der mutierten sind seröse G3 Karzinome, die sich meist aufgrund ihrer Aggressivität bereits in einem höheren T-Stadium und einer höheren FIGO-Klassifikation befinden. Diese Zusammenhänge wurden bereits durch vorangehende Studien dargestellt.(73) Der Zusammenhang mit dem Alter bei Diagnose steht nicht im Einklang mit vorherigen Beobachtungen. Im Gegensatz dazu ist beispielsweise ein früheres

Erkrankungsalter bei einem bestimmten Alleltyp in der Promotorregion des MDM2 Onkogens, welches inhibierend auf den p53-Tumorsuppressor-Signalweg einwirkt, berichtet.(74) Wenn p53 also nicht regelrecht funktionsfähig ist, wäre mit einem früheren Erkrankungsalter zu rechnen. Die Frage nach Grund und Richtigkeit des hier beobachteten Zusammenhangs mit einem höheren Diagnosealter bleibt somit offen. Wünschenswert wären weitere Studien zur Klärung des Zusammenhangs.

5.3.3. PD-L1

Mit 61 Fällen wurde eine relativ große Fallzahl an PD-L1 exprimierenden Karzinomen aufgedeckt. Für PD-L1 konnte ein verlängertes Überleben sowohl im positiv/negativ Vergleich wie auch in den einzelnen Gruppen gezeigt werden. Bezüglich des histologischen Subtyps ist bei serösen high-grade Karzinomen ein Vorkommen von 69,3% gegenüber den in dieser Arbeit aufgezeigten 23,7% berichtet worden.(75) Bei klarzelligen Karzinomen stimmen die beobachteten 50,0% gut mit den durch Zhu et al. beschriebenen 44,7% überein.(76) Bei muzinösen Ovarialkarzinomen ist ein Auftreten bei 14% beschrieben, wohingegen in dieser Arbeit kein Fall gefunden werden konnte.(77) Dies ist durch die geringe Fallzahl an muzinösen am Kollektiv erklärbar. 88,5% aller hier gefundenen PD-L1 positiven Fälle sind high-grade seröse Karzinome. Dies erklärt die vorliegende Korrelation mit dem Grading, da alle diese Karzinome G3 zuzuordnen sind. Bezüglich des Zusammenhanges mit dem PR gibt es bislang keine Daten oder möglichen Erklärungsansätze. Mit dem vorliegenden Ergebnis stimmt überein, dass PD-L1 bereits als positiver Prognosefaktor beschrieben wurde.(75) Gegenüber stehen aber auch Erkenntnisse, in denen PD-L1-Expression mit einer schlechteren Prognose einhergingen.(78) Als mögliche Erklärung für ein längeres Überleben werden die bei PD-L1-Expression häufig vorliegenden hohen Zahlen an tumorinfiltrierenden Lymphozyten gesehen.(75, 77) Bezüglich möglicher Therapie mit dem PD-L1 Angriffspunkt gibt es bislang kleinere Studien, welche einen Ausblick geben. Hamanashi et al. zeigten beispielsweise eine Gesamtansprechrate von 15% bei der Gabe von Nivolumab bei platinresistenten Ovarialkarzinomen und Brahmer et al. zeigten am fortgeschrittenen Ovarialkarzinom mit einem Anti-PD-L1-Antikörper ein totales Ansprechen von 5,9%.(78, 79) Bei den erwähnten Studien erfolgte bislang keine Vortestung der Fälle auf PD-L1-Expression. Ob ein immunhistochemisch

positives Ergebnis auch mit einem besseren Therapieansprechen einhergeht, sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

5.3.4. MSI

Als Screening Methode hat die immunhistochemische Färbung am TMA in der vorliegenden Arbeit lückenlos funktioniert. Vorangehende Studien beschreiben das Auftreten eines MMR-Defekts bei 0-37%. Die Mehrheit der beschriebenen Defekte liegt im Verlust des MLH1 und MSH2 Gens. In nichtserösen Ovarialkarzinomen wird eine höhere Frequenz an Defekten angenommen. In dieser Arbeit liegt der Defekt dem entgegen bei einem serösen Subtypen vor.(80) Wie oben bereits aufgeführt, handelt es sich laut Literatur bei einem MSH2 Defekt, wie in dem aufgedecktem Fall vorliegt, meist um eine Keimbahnmutation. Keimbahnmutationen gehen häufig mit einem frühen Erkrankungsalter und schwerem Verlauf, wie in diesem Fall, einher.(53) Das Durchschnittsalter bei Erkrankung durch ein Ovarialkarzinom ist beim Lynch-Syndrom mit 45,7 Jahren beschrieben worden, was gut zum Alter der Patientin in unserer Untersuchung passt. Ein 10-Jahresüberleben wird im Kontrast zu dem hier berichteten Fall mit 87% beschrieben.(81) Auch bei kolorektalen Karzinomen ist von einer verbesserten Prognose beim Vorliegen eines MMR-Defekt auszugehen.(82) Durch die vorliegende Arbeit konnte an einem großen Kollektiv ein Fall mit MMR-Defekt sicher identifiziert werden. Es lässt sich schlussfolgern, dass MMR-Defekte beim Ovarialkarzinom auftreten, jedoch sehr selten sind. Unter dem Aspekt „care for the rare“ könnte die Kenntnis des MMR-Status beim einzelnen Patienten zukünftig therapeutische und prognostische Relevanz erlangen, auch im Hinblick auf das Screening von Familienangehörigen.

5.3.5. BRAF

Für BRAF schwach positiv zeigten sich 29,1% und 1,7% (5 Fälle) mäßig positiv. Ein signifikanter Zusammenhang besteht mit dem ER-Status, dem PR-Status und dem Überleben. Für den ER sind alle der mäßig positiven Fälle, 93,1% der schwach positiven und 83,0% der BRAF negativen Fälle positiv. Für den PR sind BRAF-Positive häufiger positiv als BRAF-Negative. Ein kürzeres Überleben konnte bei BRAF-Positivität festgestellt werden.

BRAF-Mutationen sind in der Literatur ohne Vorkommen bei invasiven Ovarialkarzinomen oder in seltenen Fällen bei low-grade serösen Karzinomen

(<10%, 4%) beschrieben.(13, 25, 83, 84) Wenn man in dieser Arbeit ausschließlich die mäßig positiv gefärbten als BRAF mutiert wertet, entspricht dies eher dem zuvor berichteten seltenen Auftreten. Lenkt man den Fokus auf diese 5 Fälle, muss man wie oben beschrieben feststellen, dass es sich hier um ein low-grade seröses Karzinom (4% aller low-grade serösen Karzinome) und 4 high-grade seröse Karzinome handelt. Dies entspricht nicht dem bisher Beobachteten. Vergleichende Studien bei Schilddrüsenkarzinomen, bei Melanomen, bei serösen Borderlinetumoren des Ovars und bei serösen Ovarialkarzinomen zeigten jeweils eine gute Korrelation der Immunhistochemischen Färbung und dem Mutationsnachweis mittels Sanger-Sequenzierung oder der PCR.(24, 85-87) Der hier berichtete Zusammenhang mit einem kurzen Überleben lässt sich auch nicht mit der Literatur vereinbaren. Ovarialkarzinome mit BRAF-Mutation sind bereits vielfach mit einer verbesserten Prognose beschrieben worden.(88-90) Das kürzere Überleben der hier als mäßig positiv gewerteten Fälle ist eher mit deren hohem Grading und damit einhergehendem Tumorstadium zu sehen. Trotz der hier unzufriedenstellenden Ergebnisse bezüglich der BRAF-Untersuchung gibt es bereits erste therapeutische Ansätze beim Ovarialkarzinom mit BRAF-Inhibitoren und MEK-Inhibitoren.(91, 92) Die Einführung einer standardisierten Färbetechnik sowie eines Auswertungssystems sind Aufgabe weiterer Untersuchungen. Des Weiteren sollten die bereits vorhandenen Therapieansätze weiter erforscht und klinisch erprobt werden.

5.3.6. EGFR

Es wurden zwei verschiedene, bereits in der Literatur verwendete, Auswertungsschemata genutzt. Da sie dargestellten Zusammenhänge sich für die beiden Schemata unterscheiden, kann keines der beiden als besser oder schlechter gewertet werden.

In der Literatur findet man sehr unterschiedliche Angaben zur Häufigkeit der EGFR Expression beim Ovarialkarzinom. In zwei größeren Reviews sind Zahlen von 60% und bis zu 90% angegeben, es finden sich jedoch auch Zahlen von 8 bis 90%.(27, 93) Die Angaben dieser größeren Reviews stimmen gut mit den hier festgestellten Häufigkeiten überein. Die Unterschiedlichkeit der Angaben wird durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper und verschiedener Cut-offs bei Fehlen eines einheitlichen Scoring-Systems gesehen.(27, 94) EGFR-

Expression findet sich in allen histologischen Subtypen. In absteigender Häufigkeit wurde ein Vorkommen in low-grade serösen, muzinösen, klarzelligem, undifferenzierten, high-grade serösen und endometrioiden Karzinomen beschrieben.(93, 94) EGFR-Expressionsgewinn wurde als früherer Schritt in der Tumorgenese entdeckt, zusätzlich wird durch die Untersuchung an Borderlinetumoren angenommen, dass die EGFR-Expression eine Rolle in der Borderlinetumor-low-grade Ovarialkarzinom-Sequenz spielt.(94, 95) Dies könnte als mögliches Indiz für das hier beobachtete häufige Auftreten in low-grade Ovarialkarzinomen gesehen werden. Ein vermehrtes Auftreten bei muzinösen Karzinomen ist wie in dem vorliegenden Kollektiv mit der Literatur konkordant. Ein Zusammenhang mit einem höheren Tumorstadium, wie früher teilweise beschrieben, konnte nicht gezeigt werden.(27, 96) Jedoch trat ein Zusammenhang mit einem höheren T-Stadium auf. Zum Zusammenhang mit einer PD-L1-Expression wurde keine Literaturangabe gefunden und somit ist davon auszugehen, dass dies bisher noch nicht untersucht wurde. Ein häufigeres Vorkommen einer PD-L1-Expression bei EGFR-negativen Fällen könnte auf unterschiedliche beziehungsweise unabhängige Tumorgenesewege hindeuten. Bezüglich der Therapie am Ovarialkarzinom mit EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren konnten bislang nur geringe Erfolge erzielt werden mit berichteten Ansprechraten für Gefitinib mit 0 und 4% und 6% für Erlotinib.(97-99) Neuere Therapieansätze mit der Kombination von beispielsweise dualer Inhibition von EGFR und dem JAK/STAT3-Pathway zeigen vorteilhafte synergistische Effekte und können ein zukünftiger Weg zur verbesserten Nutzung dieses Therapieangriffspunktes sein.(100)

5.3.7. ALK

In der immunhistochemischen Färbung für ALK erwiesen sich drei Fälle als positiv. Zwei dieser Fälle zeigten sich auch in der FISH amplifiziert, einer war technisch nicht auswertbar. Somit zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen IHC und FISH. Weiterhin signifikante Abhängigkeiten bestehen zwischen ALK-Amplifikation und ER-Status, HER2-FISH, EGFR und dem Überleben. Beide amplifizierten Fälle waren ER und HER2 negativ, aber beide Fälle waren für EGFR positiv und zeigten bei fortgeschrittenem Tumorstadium ein verkürztes Überleben. Vom histologischen Subtyp handelte es sich um ein seröses high-grade Karzinom und ein endometrioides Karzinom.

Untersuchungen durch Ren et al. an serösen Ovarialkarzinomen wiesen durch immunhistochemische Untersuchung am TMA eine Quote von 2-4% an ALK-Positiven auf. Bei Endometrioiden und Muzinösen konnte jeweils bei 8% eine ALK-Färbung festgestellt werden.(43) Das Auftreten von ALK-Positivität in lediglich 0,67% kann durch die zusätzliche Nachprüfung der IHC am Flächenschnitt und die FISH-Analyse Erklärung finden. Die histologischen Typen der beiden positiven Fälle entsprechen der Literatur einem endometrioiden und einem serösen Ovarialkarzinom. Beim Lungenkarzinom ist ein Screening mittels IHC zuverlässig.(101) Bei der ausschließlich am TMA durchgeführten IHC zeigten sich auch falsch positive Fälle, jedoch keine falsch Negativen. Eine Übertragung des Screeningtest-Verfahrens am TMA mit anschließendem Bestätigungstest mittels FISH wäre nach unseren Erkenntnissen somit möglich. Die kostengünstigere IHC könnte nach den vorliegenden Ergebnissen an Flächenschnitten sogar als einziges Testverfahren zukünftig erprobt werden. Beim NSCLC weist eine ALK-Positivität keinen Zusammenhang mit dem Überleben auf.(102) Das hier beim Ovarialkarzinom aufgewiesene schlechte Überleben kann bei den beiden vorliegenden Fällen auch durch das hohe FIGO-Stadium (III) und die damit bereits fortgeschrittene Erkrankung begründet sein. Wie bereits weiter oben aufgeführt, konnten präklinisch positive Effekte in der Kombinationstherapie von Crizotinib mit Cisplatin an Ovarialkarzinomzellen gezeigt werden.(44) Hier bedarf es zukünftig klinischer Erprobung und bei Erfolg auch der Etablierung eines standardisierten Screeningverfahrens am Ovarialkarzinom.

5.3.8. HER2

Die IHC-Untersuchung hat in der Studie als Screeningmethode funktioniert. Als alleinige Untersuchung waren ihre Aussagen trotz guter Korrelation zur FISH jedoch nicht ausreichend, da bei unklaren Fällen die FISH angeschlossen werden muss.

Bei 4,0% der Fälle konnte in dem vorliegenden Patientenkollektiv eine HER2-Expression nachgewiesen werden. Angaben über die Häufigkeit des Auftretens von HER2-Expression beim Ovarialkarzinom differieren stark mit bis zu 35%.(34) Bei dem am häufigsten exprimierenden histologischen Subtyp, den muzinösen Vertretern, finden sich demgegenüber Angaben von ungefähr 11 oder 19%, also deutlich weniger.(77, 103, 104) Bei hier untersuchten 13 muzinösen Fällen wäre

somit statistisch ein HER2 positiver Fall zu erwarten gewesen. Bei den klarzelligen Karzinomen ist ein Auftreten in 12,6% berichtet und beim high-grade serösen Karzinom von 2,7%.⁽¹⁰⁵⁾ Wir beobachteten ein Auftreten in 4,5% der serösen high-grade Ovarialkarzinome. Durch Coronado et al. wurde ein Zusammenhang zwischen HER2-Expression und klarzelligen Karzinomen, sowie den undifferenzierten Ovarialkarzinomen gezeigt.⁽¹⁰⁶⁾ Hiermit ist das Auftreten der beiden undifferenzierten Karzinome zu vereinbaren. Aufgrund der bereits zuvor beschriebenen relativen Seltenheit von bestimmten histologischen Subgruppen sowie der beobachteten HER2-Expression, lässt sich die im Vorliegenden auftretende Verteilung der histologischen Einordnung deuten. Da das Grading mit dem histologischen Subtyp des serösen high-grade Karzinoms verknüpft ist, ist es sich durch das hier beschriebene Auftreten vor allem bei dieser Histologie erklärbar. Es konnte kein Zusammenhang mit dem Überleben dargestellt werden, wie auch schon in einigen vorangehenden Studien.⁽¹⁰⁷⁾ Im Gegensatz dazu steht eine aktuelle Metaanalyse von Luo et al., welche eine schlechte Prognose bei HER2-Positivität als Ergebnis hat.⁽¹⁰⁸⁾ Therapeutisch gesehen hat die HER2 gerichtete Therapie bislang nur unbefriedigende Ergebnisse hervorbringen können mit beispielsweise einer Gesamtansprechrates von 7,3% (1 Fall komplett, 2 Fälle partial) für Trastuzumab bei einem zuvor auf HER2-Positivität getesteten Kollektiv.⁽¹⁰⁴⁾ Neuerer Therapieansatz ist präklinisch beispielsweise eine Kombination aus HER2-Antikörper und dessen photochemischer Internalisierung.⁽³⁴⁾ Diese und weitere solcher neuen kombinierenden HER2-gerichteten Therapien sollten zukünftig erforscht und klinisch getestet werden, um neue individualisierte Therapien, gerade bei schlechterer Prognose, anbieten zu können.

6. Zusammenfassung

Mit ungefähr 7000 Neuerkrankungen jährlich in Deutschland stellen maligne Neoplasien der Ovarien oder Adnexen die fünfthäufigste Krebsart dar. Am häufigsten liegen Karzinome vor, welche mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 41% eine schlechte Prognose aufweisen.⁽²⁾ Trotz der Inhomogenität der einzelnen Subtypen wird bislang leitliniengerecht relativ einheitlich operativ und chemotherapeutisch behandelt. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Entdeckung von möglichen Prognose- und Therapieangriffspunkten, die in anderen Geweben bereits bekannt sind oder therapeutisch genutzt werden und die Herausarbeitung deren Zusammenhänge, um besseres Verständnis zu erlangen. Das Patientenkollektiv wurde aus Ovarialkarzinomen die an den Universitätskliniken der LMU behandelt wurden, erstellt. Es wurden alle geeigneten Fälle aus 4 Jahren miteingeschlossen. Die dadurch gewonnenen 299 Fälle wurden zu TMAs verarbeitet mit je zwei 2,00 mm messenden Gewebezylindern pro Fall. Es erfolgte die vollautomatische IHC von ER, PR, HER2, p53, EGFR, PD-L1, MMR-Proteine und ALK, während die immunhistochemische Färbung für BRAF manuell durchgeführt wurde. FISH-Analysen wurden für HER2 und ALK als Bestätigungstests durchgeführt. Die Präparatebeurteilung erfolgte, soweit vorhanden, anhand etablierter Scoring-Systeme. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS Version 23/24 mittels Häufigkeitsanalysen, Chi-Quadrat, Fishers Exakt Test, t-Test und Kaplan-Meier-Überlebensanalysen mit log-rank-Test durchgeführt. Als Ergebnis wurde zu jedem der untersuchten Parameter mindestens ein positiver Fall gefunden. Häufig fanden sich ER, PR, p53-Mutation und EGFR, wohingegen BRAF und PD-L1 seltener beobachtet werden konnten. HER2- Amplifikation konnte nur in 4% nachgewiesen werden, ALK-Expression trat in lediglich 2 Fällen und MSI nur in einem Fall auf. Als mögliche positive Prognosefaktoren stellten sich ER-Expression und PD-L1-Expression heraus. Mögliche negative Prognosefaktoren waren BRAF-Positivität, MSI und ALK-Expression. Aufgrund der Seltenheit der entdeckten Expressionsmuster ist die Aussagekraft von PD-L1, MSI und ALK sehr eingeschränkt. Zusammenhänge mit der Histologie konnten für ER (v.a. serös), p53 (v.a. high-grade serös und undifferenziert), PD-L1 (v.a. klarzellig, undifferenziert, high-grade serös), EGFR (v.a. low-grade serös, muzinös) und HER2 (v.a. high-grade serös und undifferenziert) gezeigt werden. Die schlechte

Zusammenfassung

Prognose der Patientinnen begründet einen Handlungsbedarf, neue gezielte Therapieformen zu erforschen. Wie bereits teilweise begonnen, ist eine Erprobung und Weiterentwicklung in klinischen Studien notwendig. Im Zuge dessen könnte die Etablierung eines Screeningverfahrens für die wichtigsten Marker in der Standardtherapie ähnlich den vorliegenden Untersuchungen durchgeführt werden, um unter dem Motto „care for the rare“ eine verbesserte Individualtherapie anbieten zu können.

7. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon 2003.
2. Gesellschaft des Epidemiologischen Krebsregisters e. V., Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch Institut. Eierstöcke - C56. Krebs in Deutschland für die Jahre 2013/14. 2017(11).
3. deutsche Krebsgesellschaft. Available from: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/basis-informationen-krebs-allgemeine-informationen/krebshaeufigkeit-die-aktuellen-.html>.
4. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) DGfGuG. S3- Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. Langversion. 2019.
5. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS. World Health Organisation Classification of Tumours of the Female Reproductive Organs: International Agency for Research on Cancer; 2014.
6. Klöppel G, Kreipe H, Remmele W, Dietel M. Pathologie - Mamma, weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013.
7. Rambau PF, McIntyre JB, Taylor J, Lee S, Ogilvie T, Sienko A, et al. Morphologic Reproducibility, Genotyping, and Immunohistochemical Profiling Do Not Support a Category of Seromucinous Carcinoma of the Ovary. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(5):685-95.
8. Karpathiou G, Chauleur C, Corsini T, Venet M, Habougit C, Honeyman F, et al. Seromucinous ovarian tumor A comparison with the rest of ovarian epithelial tumors. *Annals of diagnostic pathology*. 2017;27:28-33.
9. Taylor J, McCluggage WG. Ovarian seromucinous carcinoma: report of a series of a newly categorized and uncommon neoplasm. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(7):983-92.
10. Mayr D, Hirschmann A, Löhrs U, Diebold J. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: A comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecologic Oncology*. 103(3):883-7.
11. Shih Ie M, Chen L, Wang CC, Gu J, Davidson B, Cope L, et al. Distinct DNA methylation profiles in ovarian serous neoplasms and their implications in ovarian carcinogenesis. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2010;203(6):584.e1-22.
12. McCluggage WG. My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas. *Journal of Clinical Pathology*. 2008;61(2):152-63.
13. Murali R, Grisham RN, Soslow RA. The roles of pathology in targeted therapy of women with gynecologic cancers. *Gynecologic Oncology*. 2018;148(1):213-21.
14. Xiao X, Melton DW, Gourley C. Mismatch repair deficiency in ovarian cancer -- molecular characteristics and clinical implications. *Gynecol Oncol*. 2014;132(2):506-12.
15. Alferez DG, Simoes BM, Howell SJ, Clarke RB. The Role of Steroid Hormones in Breast and Effects on Cancer Stem Cells. *Current stem cell reports*. 2018;4(1):81-94.
16. Arendt LM, Kuperwasser C. Form and function: how estrogen and progesterone regulate the mammary epithelial hierarchy. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2015;20(1-2):9-25.
17. Sieh W, Kobel M, Longacre TA, Bowtell DD, deFazio A, Goodman MT, et al. Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *The Lancet Oncology*. 2013;14(9):853-62.
18. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, Jöhrens K, Kirchner T, Reu S, et al. Prädiktive PD-L1-Immunhistochemie beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom. *Der Pathologe*. 2016;37(6):557-67.
19. Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Current opinion in pharmacology*. 2015;23:32-8.
20. Viale G, Trapani D, Curigliano G. Mismatch Repair Deficiency as a Predictive Biomarker for Immunotherapy Efficacy. *BioMed research international*. 2017;2017:4719194.

21. Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*. 2014;120(22):3446-56.
22. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research*. 2002;12(1):9-18.
23. Aittomaki S, Pesu M. Therapeutic targeting of the Jak/STAT pathway. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2014;114(1):18-23.
24. Oh HS, Kwon H, Park S, Kim M, Jeon MJ, Kim TY, et al. Comparison of Immunohistochemistry and Direct Sanger Sequencing for Detection of the BRAF(V600E) Mutation in Thyroid Neoplasm. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*. 2018.
25. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
26. Dako. EGFR pharmDx interpretation manual. 20.03.2018.
27. Mehner C, Oberg AL, Goergen KM, Kalli KR, Maurer MJ, Nassar A, et al. EGFR as a prognostic biomarker and therapeutic target in ovarian cancer: evaluation of patient cohort and literature review. *Genes & Cancer*. 2017;8(5-6):589-99.
28. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Storkel S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2004;52(7):893-901.
29. Hirano T, Yasuda H, Tani T, Hamamoto J, Oashi A, Ishioka K, et al. In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 2015;6(36):38789-803.
30. Lambertz I, Kumps C, Claeys S, Lindner S, Beckers A, Janssens E, et al. Upregulation of MAPK Negative Feedback Regulators and RET in Mutant ALK Neuroblastoma: Implications for Targeted Treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(14):3327-39.
31. Shaw AT, Engelman JA. ALK in Lung Cancer: Past, Present, and Future. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(8):1105-11.
32. Patel Y, Shah N, Lee JS, Markoutsas E, Jie C, Liu S, et al. A novel double-negative feedback loop between miR-489 and the HER2-SHP2-MAPK signaling axis regulates breast cancer cell proliferation and tumor growth. *Oncotarget*. 2016;7(14):18295-308.
33. Aceto N, Sausgruber N, Brinkhaus H, Gaidatzis D, Martiny-Baron G, Mazzarol G, et al. Tyrosine phosphatase SHP2 promotes breast cancer progression and maintains tumor-initiating cells via activation of key transcription factors and a positive feedback signaling loop. *Nature medicine*. 2012;18(4):529-37.
34. Bull-Hansen B, Berstad MB, Berg K, Cao Y, Skarpen E, Fremstedal AS, et al. Photochemical activation of MH3-B1/rGel: a HER2-targeted treatment approach for ovarian cancer. *Oncotarget*. 2015;6(14):12436-51.
35. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. 2017.
36. Sullivan RJ, Flaherty KT. BRAF in Melanoma: Pathogenesis, Diagnosis, Inhibition, and Resistance. *Journal of skin cancer*. 2011;2011:423239.
37. Wahid M, Jawed A, Mandal RK, Dar SA, Akhter N, Somvanshi P, et al. Recent developments and obstacles in the treatment of melanoma with BRAF and MEK inhibitors. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2018;125:84-8.
38. Weart TC, Miller KD, Simone CB, 2nd. Spotlight on dabrafenib/trametinib in the treatment of non-small-cell lung cancer: place in therapy. *Cancer management and research*. 2018;10:647-52.
39. Yaeger R, Yao Z, Hyman DM, Hechtman JF, Vakiani E, Zhao H, et al. Mechanisms of Acquired Resistance to BRAF V600E Inhibition in Colon Cancers Converge on RAF Dimerization and Are Sensitive to Its Inhibition. *Cancer research*. 2017;77(23):6513-23.

40. Juchum M, Gunther M, Laufer SA. Fighting cancer drug resistance: Opportunities and challenges for mutation-specific EGFR inhibitors. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2015;20:12-28.
41. Awad MM, Shaw AT. ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: crizotinib and beyond. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*. 2014;12(7):429-39.
42. Sgambato A, Casaluze F, Maione P, Gridelli C. Targeted therapies in non-small cell lung cancer: a focus on ALK/ROS1 tyrosine kinase inhibitors. *Expert review of anticancer therapy*. 2018;18(1):71-80.
43. Ren H, Tan ZP, Zhu X, Crosby K, Haack H, Ren JM, et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a potential therapeutic target in ovarian cancer. *Cancer research*. 2012;72(13):3312-23.
44. Huang XX, Xie FF, Hou LJ, Chen XX, Ou RY, Yu JT, et al. Crizotinib synergizes with cisplatin in preclinical models of ovarian cancer. *American journal of translational research*. 2017;9(4):1667-79.
45. Boekhout AH, Beijnen JH, Schellens JH. Trastuzumab. *The oncologist*. 2011;16(6):800-10.
46. Schramm A, De Gregorio N, Widschwendter P, Fink V, Huober J. Targeted Therapies in HER2-Positive Breast Cancer - a Systematic Review. *Breast care (Basel, Switzerland)*. 2015;10(3):173-8.
47. Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EN, Gershenson DM, et al. Grading Ovarian Serous Carcinoma Using a Two-Tier System. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2004;28(4):496-504.
48. Diebold J. Serous ovarian tumors. *Der Pathologe*. 2014;35(4):314-21.
49. Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie: Urban und Fischer; 2000.*
50. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987;8(3):138-40.
51. Remmele W, et al. *Pathologie Bd. 4. Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen; Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen; Tumoren des Kindesalters; Endokrine Organe. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag; 1997.*
52. Karamurzin Y, Leitao MM, Jr., Soslow RA. Clinicopathologic analysis of low-stage sporadic ovarian carcinomas: a reappraisal. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(3):356-67.
53. Burkart AL. Immunohistochemical Testing of DNA Mismatch Repair (MMR) Proteins. 2011 27.08.2011. In: *Quick Reference Handbook for Surgical Pathologists [Internet]. Springer Science & Business Media; [34].*
54. Taylor CR, Jensen SS, Colley EC, Stead RM, Mollerup J, Lykke A, et al. *Dako's Guidebook to Immunohistochemical Staining Methods*. 2013.
55. Kim CH, Kim SH, Park SY, Yoo J, Kim SK, Kim HK. Identification of EGFR Mutations by Immunohistochemistry with EGFR Mutation-Specific Antibodies in Biopsy and Resection Specimens from Pulmonary Adenocarcinoma. *Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association*. 2015;47(4):653-60.
56. Available from: <https://www.roche.de/pharma/wissen/her2/her2-diagnostik.html>.
57. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, Elmerger G, Kerr K, Lopez-Rios F, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2012;461(3):245-57.
58. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(31):3997-4013.
59. Chao WR, Lee MY, Ruan A, Sheng HP, Hsu JD, Han CP, et al. Assessment of HER2 Status Using Immunohistochemistry (IHC) and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Techniques in

- Mucinous Epithelial Ovarian Cancer: A Comprehensive Comparison between ToGA Biopsy Method and ToGA Surgical Specimen Method. *PloS one*. 2015;10(11):e0142135.
60. Tang S, Yang F, Du X, Lu Y, Zhang L, Zhou X. Aberrant Expression of Anaplastic Lymphoma Kinase in Ovarian Carcinoma Independent of Gene Rearrangement. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2016;35(4):337-47.
61. van Kruchten M, van der Marel P, de Munck L, Hollema H, Arts H, Timmer-Bosscha H, et al. Hormone receptors as a marker of poor survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2015;138(3):634-9.
62. Tkalia IG, Vorobyova LI, Svintsitsky VS, Nespryadko SV, Goncharuk IV, Lukyanova NY, et al. Clinical significance of hormonal receptor status of malignant ovarian tumors. *Experimental oncology*. 2014;36(2):125-33.
63. Hatch KD, Beecham JB, Blessing JA, Creasman WT. Responsiveness of patients with advanced ovarian carcinoma to tamoxifen. A Gynecologic Oncology Group study of second-line therapy in 105 patients. *Cancer*. 1991;68(2):269-71.
64. Markman M, Iseminger KA, Hatch KD, Creasman WT, Barnes W, Dubeshter B. Tamoxifen in Platinum-Refractory Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Ancillary Report. *Gynecologic Oncology*. 1996;62(1):4-6.
65. Vassilomanolakis M, Koumakis G, Barbounis V, Hajichristou H, Tsousis S, Efremidis A. A Phase II Study of Flutamide in Ovarian Cancer. *Oncology*. 1997;54(3):199-202.
66. Tumolo S, Rao BR, van der Burg ME, Guastalla JP, Renard J, Vermorken JB. Phase II trial of flutamide in advanced ovarian cancer: an EORTC Gynaecological Cancer Cooperative Group study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 1994;30a(7):911-4.
67. Papadimitriou CA, Markaki S, Siapkarakas J, Vlachos G, Efstathiou E, Grimani I, et al. Hormonal therapy with letrozole for relapsed epithelial ovarian cancer. Long-term results of a phase II study. *Oncology*. 2004;66(2):112-7.
68. Smyth JF, Gourley C, Walker G, MacKean MJ, Stevenson A, Williams AR, et al. Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor-positive patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(12):3617-22.
69. Brasseur K, Leblanc V, Fabi F, Parent S, Descoteaux C, Berube G, et al. ERalpha-targeted therapy in ovarian cancer cells by a novel estradiol-platinum(II) hybrid. *Endocrinology*. 2013;154(7):2281-95.
70. The Cancer Genome Atlas Research N. Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.
71. Rojas V, Hirshfield KM, Ganesan S, Rodriguez-Rodriguez L. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(12):2113.
72. Testa U, Petrucci E, Pasquini L, Castelli G, Pelosi E. Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Medicines*. 2018;5(1):16.
73. Godoy H, Mhawech-Fauceglia P, Beck A, Miller A, Lele S, Odunsi K. Expression of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase and p53 in epithelial ovarian cancer and their role in prognosis and disease outcome. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2011;30(2):139-44.
74. Bartel F, Jung J, Bohnke A, Gradhand E, Zeng K, Thomssen C, et al. Both germ line and somatic genetics of the p53 pathway affect ovarian cancer incidence and survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(1):89-96.
75. Darb-Esfahani S, Kunze CA, Kulbe H, Sehouli J, Wienert S, Lindner J, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(2):1486-99.

76. Zhu J, Wen H, Bi R, Wu Y, Wu X. Prognostic value of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in ovarian clear cell carcinoma. *Journal of gynecologic oncology*. 2017;28(6):e77.
77. Perren TJ. Mucinous epithelial ovarian carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2016;27 Suppl 1:i53-i7.
78. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Murayama T, et al. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(34):4015-22.
79. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;366(26):2455-65.
80. Pal T, Permuth-Wey J, Sellers TA. A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. *Cancer*. 2008;113(4):733-42.
81. Niskakoski A, Kaur S, Renkonen-Sinisalo L, Lassus H, Jarvinen HJ, Mecklin JP, et al. Distinct molecular profiles in Lynch syndrome-associated and sporadic ovarian carcinomas. *International journal of cancer*. 2013;133(11):2596-608.
82. Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Current treatment options in oncology*. 2015;16(7):30.
83. Cohn AL, Day BM, Abhyankar S, McKenna E, Riehl T, Puzanov I. BRAF(V600) mutations in solid tumors, other than metastatic melanoma and papillary thyroid cancer, or multiple myeloma: a screening study. *OncoTargets and therapy*. 2017;10:965-71.
84. Mayr D, Hirschmann A, Lohrs U, Diebold J. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol Oncol*. 2006;103(3):883-7.
85. Tetzlaff MT, Pattanaprichakul P, Wargo J, Fox PS, Patel KP, Estrella JS, et al. Utility of BRAF V600E Immunohistochemistry Expression Pattern as a Surrogate of BRAF Mutation Status in 154 Patients with Advanced Melanoma. *Human pathology*. 2015;46(8):1101-10.
86. Hayashi Y, Sasaki H, Takeshita S, Nishikawa R, Nishikawa H, Arakawa A, et al. Usefulness of immunohistochemistry for the detection of the BRAF V600E mutation in ovarian serous borderline tumors. *Oncology reports*. 2014;32(5):1815-9.
87. Bosmuller H, Fischer A, Pham DL, Fehm T, Capper D, von Deimling A, et al. Detection of the BRAF V600E mutation in serous ovarian tumors: a comparative analysis of immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody and allele-specific PCR. *Human pathology*. 2013;44(3):329-35.
88. Wong K-K, Tsang YTM, Deavers MT, Mok SC, Zu Z, Sun C, et al. BRAF Mutation Is Rare in Advanced-Stage Low-Grade Ovarian Serous Carcinomas. *The American Journal of Pathology*. 2010;177(4):1611-7.
89. Grisham RN, Iyer G, Garg K, Delair D, Hyman DM, Zhou Q, et al. BRAF mutation is associated with early stage disease and improved outcome in patients with low-grade serous ovarian cancer. *Cancer*. 2013;119(3):548-54.
90. Gershenson DM, Sun CC, Wong K-K. Impact of mutational status on survival in low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum. *British journal of cancer*. 2015;113:1254.
91. Farley J, Brady WE, Vathipadiakal V, Lankes HA, Coleman R, Morgan MA, et al. Selumetinib in women with recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: an open-label, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2013;14(2):134-40.
92. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay JY, et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *The New England journal of medicine*. 2015;373(8):726-36.
93. Siwak DR, Carey M, Hennessy BT, Nguyen CT, McGahren Murray MJ, Nolden L, et al. Targeting the epidermal growth factor receptor in epithelial ovarian cancer: current knowledge and future challenges. *Journal of oncology*. 2010;2010:568938.

94. Dimova I, Zaharieva B, Raitcheva S, Dimitrov R, Doganov N, Toncheva D. Tissue microarray analysis of EGFR and erbB2 copy number changes in ovarian tumors. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2006;16(1):145-51.
95. Showeil R, Romano C, Valganon M, Lambros M, Trivedi P, Van Noorden S, et al. The status of epidermal growth factor receptor in borderline ovarian tumours. *Oncotarget*. 2016;7(9):10568-77.
96. Alshenawy HA. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor, E-cadherin, and matrix metalloproteinase-9 in ovarian epithelial cancer and relation to patient deaths. *Annals of diagnostic pathology*. 2010;14(6):387-95.
97. Posadas EM, Liel MS, Kwitkowski V, Minasian L, Godwin AK, Hussain MM, et al. A phase II and pharmacodynamic study of gefitinib in patients with refractory or recurrent epithelial ovarian cancer. *Cancer*. 2007;109(7):1323-30.
98. Gordon AN, Finkler N, Edwards RP, Garcia AA, Crozier M, Irwin DH, et al. Efficacy and safety of erlotinib HCl, an epidermal growth factor receptor (HER1/EGFR) tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ovarian carcinoma: results from a phase II multicenter study. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2005;15(5):785-92.
99. Schilder RJ, Sill MW, Chen X, Darcy KM, Decesare SL, Lewandowski G, et al. Phase II study of gefitinib in patients with relapsed or persistent ovarian or primary peritoneal carcinoma and evaluation of epidermal growth factor receptor mutations and immunohistochemical expression: a Gynecologic Oncology Group Study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(15):5539-48.
100. Wen W, Wu J, Liu L, Tian Y, Buettner R, Hsieh MY, et al. Synergistic anti-tumor effect of combined inhibition of EGFR and JAK/STAT3 pathways in human ovarian cancer. *Molecular cancer*. 2015;14:100.
101. Le Quesne J, Maurya M, Yancheva SG, O'Brien M, Popat S, Wotherspoon AC, et al. A comparison of immunohistochemical assays and FISH in detecting the ALK translocation in diagnostic histological and cytological lung tumor material. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2014;9(6):769-74.
102. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(26):4247-53.
103. Anglesio MS, Kommos S, Tolcher MC, Clarke B, Galletta L, Porter H, et al. Molecular characterization of mucinous ovarian tumours supports a stratified treatment approach with HER2 targeting in 19% of carcinomas. *The Journal of pathology*. 2013;229(1):111-20.
104. Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA, Horowitz IR. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(2):283-90.
105. Li M, Li H, Liu F, Bi R, Tu X, Chen L, et al. Characterization of ovarian clear cell carcinoma using target drug-based molecular biomarkers: implications for personalized cancer therapy. *Journal of ovarian research*. 2017;10(1):9.
106. Coronado Martin PJ, Fasero Laiz M, Garcia Santos J, Ramirez Mena M, Vidart Aragon JA. [Overexpression and prognostic value of p53 and HER2/neu proteins in benign ovarian tissue and in ovarian cancer]. *Medicina clinica*. 2007;128(1):1-6.
107. Pfisterer J, Du Bois A, Bentz EK, Kommos F, Harter P, Huober J, et al. Prognostic value of human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2)/neu in patients with advanced ovarian cancer treated with platinum/paclitaxel as first-line chemotherapy: a retrospective evaluation

of the AGO-OVAR 3 Trial by the AGO OVAR Germany. International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society. 2009;19(1):109-15. 108. Luo H, Xu X, Ye M, Sheng B, Zhu X. The prognostic value of HER2 in ovarian cancer: A meta-analysis of observational studies. PloS one. 2018;13(1):e0191972.

8. Tabellen-, Abbildungs- und Abkürzungsverzeichnis

8.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation epithelialer Tumoren des Ovars 2014	6
Tabelle 2: TNM-Klassifikation und FIGO-Stadieneinteilung nach WHO	9
Tabelle 3: Übersicht über Patientendaten und histopathologische Parameter .	26
Tabelle 4: Remmele-Score zur Auswertung immunhistochemischer Hormonrezeptorfärbungen - Färbeintensität.....	36
Tabelle 5: Remmele-Score zur Auswertung immunhistochemischer Hormonrezeptorfärbungen - Anzahl positiver Zellen	36
Tabelle 6: Cologne Score/Proportion-Score zur Auswertung der immunhistochemischen PD-L1-Färbung	37
Tabelle 7: Interpretation der IHC von MMR-Proteinen nach Burkart	38
Tabelle 8: Auswertungsschema für HER2 IHC beim Mammakarzinom nach Roche	40
Tabelle 9: Kreuztabelle ER und Histologie	45
Tabelle 10: Häufigkeiten ER, PR, p53.....	50
Tabelle 11: signifikante Zusammenhänge ER, PR, p53 und Grundparameter .	50
Tabelle 12: Histologie und PD-L1 Expression	53
Tabelle 13: Übersicht über den Fall mit MMR-Defekt.....	59
Tabelle 14: EGFR Anteil gefärbter Zellen Verteilung.....	63
Tabelle 15: Übersicht über die in der IHC positiven ALK-Fälle.....	64
Tabelle 16: Übersicht über die HER2 positiven Fälle	74
Tabelle 17: Aufgedeckte Mutationen/Expressionsmuster und deren Histologie Übersicht	75
Tabelle 18: Übersicht Zusammenhänge der spezifischen aufgedeckten Mutationen.....	76

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der bösartigen Neubildungen der Eierstöcke nach histologischem Typ nach Robert Koch-Institut	7
Abbildung 2: MAPK-, PI3K und JAK/STAT Signalwege, untersuchte Biomarker und Beispiele möglicher Therapieansatzpunkte	18
Abbildung 3: Fotografie TMA HE-Schnitt.....	34
Abbildung 4: TMA Lageplan	35
Abbildung 5: ER PP 1, SI 1, Score 2, negativ (40fache Vergrößerung)	44
Abbildung 6: ER PP 4, SI 3, Score 7, positiv (40fache Vergrößerung)	44
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für ER-Status	46
Abbildung 8: PR PP 1, SI 1, Score 2, negativ (40fache Vergrößerung)	47
Abbildung 9: PR PP 2, SI 2, Score 4, positiv (40fache Vergrößerung)	47
Abbildung 10: PR PP 4, SI 3, Score 7, positiv (40fache Vergrößerung)	47
Abbildung 11: Diagramm Verhältnis ER und PR	48
Abbildung 12: p53 Expressionsverlust, positiver Fall (40fache Vergrößerung)	49
Abbildung 13: p53 Überexpression, positiver Fall (40fache Vergrößerung)	49
Abbildung 14: PD-L1 negativ (40fache Vergrößerung).....	51
Abbildung 15: PD-L1 positiv, Kategorie 4 (40fache Vergrößerung).....	51
Abbildung 16: PD-L1 positiv, Kategorie 5 (40fache Vergrößerung).....	52
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für PD-L1 Status.....	54
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für PD-L1 Status nach Cologne-Score	55
Abbildung 19: MLH1 - (40fache Vergrößerung).....	56
Abbildung 20: MLH1 + (40fache Vergrößerung).....	56
Abbildung 21: MSH2 - (40fache Vergrößerung)	56
Abbildung 22: MSH2 + (40fache Vergrößerung)	57
Abbildung 23: MSH6 - (40fache Vergrößerung)	57
Abbildung 24: MSH6 + (40fache Vergrößerung)	57
Abbildung 25: PMS2 - (40fache Vergrößerung)	58
Abbildung 26: PMS2 + (40fache Vergrößerung)	58
Abbildung 27: BRAF negativ (40fache Vergrößerung)	59
Abbildung 28: BRAF positiv, mäßige Färbeintensität (40fache Vergrößerung)	60
Abbildung 29: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für BRAF-Status	61
Abbildung 30: EGFR negativ (40fache Vergrößerung).....	62

Abbildung 31: EGFR membranständige Färbung (40fache Vergrößerung)	62
Abbildung 32: EGFR PP 50 (40fache Vergrößerung).....	62
Abbildung 33: EGFR PP 90 membranständige und zytoplasmatische Färbung (40fache Vergrößerung)	63
Abbildung 34: ALK negativ (40fache Vergrößerung)	65
Abbildung 35: ALK stark positiv (40fache Vergrößerung).....	65
Abbildung 36: ALK unspezifische Färbung (40fache Vergrößerung).....	66
Abbildung 37: HER2 negativ (0) (40fache Vergrößerung)	66
Abbildung 38: HER2 negativ (1+) (40fache Vergrößerung).....	67
Abbildung 39: HER2 "unklar" (2+) (40fache Vergrößerung)	67
Abbildung 40: HER2 positiv (3+) (40fache Vergrößerung)	67
Abbildung 41: ALK negativ, viele gelbe Fusionssignale sichtbar.....	68
Abbildung 42: ALK positiv break apart OVCA 425	68
Abbildung 43: ALK positiv OVCA 015, break aparts mit Pfeilen gekennzeichnet	69
Abbildung 44: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die ALK-FISH.....	70
Abbildung 45: HER2 nicht amplifiziert, einige Zellkerne mit je 2 roten und 2 grünen Signalen sind per Kreis markiert	71
Abbildung 46: HER2-FISH von OVCA407: Amplifikation mit A: 2,26, viele grüne und wenig rote Signale, Mikrocluster (einige markiert mit gelbem Pfeil)	72
Abbildung 47: HER2-FISH von OVCA422: Amplifikation mit B: 6,28, viele Signale pro Zellkern sichtbar, Mikrocluster (einige markiert mit gelbem Pfeil)..	72
Abbildung 48: HER2-FISH OVCA 343: Amplifikation mit Clustern	73
Abbildung 49: HER2-FISH OVCA 408: Amplifikation mit Clustern	73

8.3. Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>Avidin-Biotin-Complex</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
ALK	<i>anaplastische Lymphomkinase</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
CKIT	<i>Stammzellfaktor-Rezeptor</i>
EGFR	<i>epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor</i>
EML4	<i>echinoderm microtubule associated protein like 4</i>
ER	<i>Östrogenrezeptor</i>

Verzeichnisse

FIGO	<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>
FISH	<i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</i>
GnRH	<i>Gonadotropes Releasinghormon</i>
HCl	<i>Chlorwasserstoff</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HNPCC	<i>Hereditäres Nicht Polypöses Kolorektalkarzinom</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
JAK-STAT	<i>Januskinasen-signal transducer and activation of transcript"</i>
LLC	<i>Limited Liability Company</i>
LMU	<i>Ludwig-Maximilians-Universität</i>
MAP	<i>Mitogen-aktiviertes Protein</i>
MAPK/ERK	<i>Mitogen-aktivierte Proteinkinase/extrazellulär Signal reguliert</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
MMR	<i>Mismatch-Reparatur</i>
MSI	<i>Mikrosatelliteninstabilität</i>
N	<i>Anzahl</i>
ns	<i>nicht signifikant</i>
NSCLC	<i>Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom</i>
OVCA	<i>Ovarialkarzinom</i>
PARP	<i>Poly-ADP-Ribose Polymerase</i>
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
PD-1	<i>programmed death cell 1</i>
PDGFR	<i>platelet-derived Wachstumsfaktorrezeptor</i>
PD-L1	<i>programmed death cell ligand 1</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PP	<i>Prozentsatz positiver Zellen</i>
PR	<i>Progesteronrezeptor</i>
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor kB ligand</i>
RTK	<i>Rezeptortyrosinkinase</i>
SHP2	<i>Src-homology 2 domain-containing phosphatase 2</i>
SI	<i>Färbeintensität</i>
TKI	<i>Tyrosinkinaseinhibitor</i>
TMA	<i>Tissue-Micro-Array</i>
TNM	<i>Tumour-Node-Metastasis</i>
VEGF	<i>vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor</i>
VEGFR	<i>vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor</i>

10. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med. Doris Mayr für die großartige Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit genauso wie Dr. med. Elisa Schmöckel. Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des pathologischen Instituts der LMU München, besonders bei den Damen aus dem Archiv, bei Frau Mona Melz, Frau Beate Luthardt und Frau Dr. med. Veronika Kanitz für ihre Hilfe bedanken. Danke auch an meine Mitdoktoranden und Freunde Ulrike Beetz und Daniel Fromberger. Für die persönliche Unterstützung möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder Max und meinem Mann Jonas bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

Bühler, Sophie

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Care for the rare: Prädiktive Biomarker für eine individualisierte Therapie des Ovarialkarzinoms

selbstständig angefertigt habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Memmingen, den 07.06.2021

Sophie Bühler