

Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**„Immunhistochemische und molekularpathologische Untersuchungen zur
Subklassifikation und Bestimmung prognostischer und prädiktiver Marker
an Granulosazelltumoren des Ovars: Retrospektive Untersuchungen mit
Korrelation zu klinisch- pathologischen Daten und zum Überleben“**

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

vorgelegt von

Ulrike Beetz

aus

Berlin

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Doris Mayr

Mitberichterstatter: PD Dr. Fabian Trillsch
PD Dr. Beyhan Ataseven

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2021

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ulrike Beetz, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel
**„Immunhistochemische und molekularpathologische Untersuchungen zur
Subklassifikation und Bestimmung prognostischer und prädiktiver Marker an
Granulosazelltumoren des Ovars: Retrospektive Untersuchungen mit Korrelation zu
klinisch- pathologischen Daten und zum Überleben“**

eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Berlin, 19.10.2021
Ort, Datum

Ulrike Beetz
Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Granulosazelltumoren	4
1.2.1 Begriffsklärung.....	4
1.2.2 Epidemiologie	5
1.2.3 Granulosazellen	5
1.2.4 Klinik.....	6
1.2.5 Diagnostik	6
1.2.6 Pathologische und histopathologische Merkmale	7
1.2.7 Immunhistochemie	7
1.2.8 Angeborene Syndrome, chromosomale Veränderungen und genetisches Profil.....	8
1.2.9 Therapie.....	8
1.2.10 Prognose und prädiktive Faktoren.....	9
1.3 FOXL-2	10
1.3.1 Begriffsklärung.....	10
1.4. NanoString.....	10
1.5 Zielsetzung und Fragestellung:.....	11
2. Methoden und Material	12
2.1 Patientenkollektiv	12
2.2 TMA´s- Tissue Micro Arrays.....	15
2.3 Immunhistochemische Untersuchungen.....	16
2.3.1 Östrogen- ER alpha	16
2.3.2 Progesteron- PR.....	16
2.3.3 Inhibin α	17
2.3.4 Ki-67.....	17
2.3.5 FOXL2.....	17
2.3.4 Auswertung	18
2.4 Molekularbiologische Untersuchungen.....	20
2.4.1 DNA-Aufbereitung.....	20
2.4.2 PCR	21
2.4.3 Gelelektrophorese.....	21
2.4.4 Pyrosequenzierung	22
2.4.5 Auswertung Pyrosequenzierung.....	24
2.4.6 NanoString nCounter® PanCancer Pathways Panel	25
3. Ergebnisse	29
3.1 Immunhistochemie	29

3.1.1 Auswertbarkeit der IHC	29
3.1.2 Ergebnisse der Immunhistochemie.....	29
3.2 Pyrosequenzierung	32
3.2.1 Auswertbarkeit der FOXL2- Mutationsanalyse (Pyrosequenzierung)	32
3.2.2 Ergebnisse der Pyrosequenzierung.....	32
3.3 Korrelation der Mutationsanalyse mit der FOXL2- Immunhistochemie	33
3.4 Korrelationen mit dem Tumorstadium	34
3.4.1 Korrelation zwischen der Mutationsanalyse und dem Tumorstadium	34
3.4.2 Korrelation zwischen Tumortyp und Tumorstadiums.....	35
3.4.3 Korrelation zwischen der Östrogen α -Expression und dem Tumorstadium.....	36
3.4.4 Korrelation zwischen der Progesteronexpression und dem Tumorstadium	37
3.4.5 Korrelation zwischen der Inhibinexpression und dem Tumorstadium.....	38
3.4.6 Korrelation zwischen der Ki-67-Expression und dem Tumorstadium.....	39
3.4.7 Korrelation zwischen der FOXL2-Expression und dem Tumorstadium.....	40
3.5 Überleben	41
3.6 Korrelation zwischen der Immunhistochemie und dem Überleben	42
3.6.1. Östrogen α und Überleben.....	42
3.6.2 Progesteron und das Überleben.....	43
3.6.3 Inhibin und Überleben.....	45
3.6.4 Ki-67 und Überleben	46
3.6.5 FOXL2 und Überleben.....	47
3.7 Korrelation zwischen der Mutationsanalyse und dem Überleben.....	48
3.8 Nanostring.....	50
3.8.1 Gleiche Gene	50
3.8.2 Fold change	51
4. Diskussion	54
5. Zusammenfassung	63
6. Anhang zu Kapitel 2 Methoden und Material	66
6.1 Verbrauchsmaterialien.....	66
6.2 Chemikalien.....	66
6.3 Geräte	67
6.4 Software.....	68
7. Literaturverzeichnis.....	69
8. Abbildungsverzeichnis	78
9. Tabellenverzeichnis.....	79
10. Danksagung.....	81

1. Einleitung

1.1 Einführung

Ovarialtumoren gehören zu den fünf häufigsten Tumoren der Frau in der westlichen Welt [1]. Mit 3,2 % aller bösartigen Neubildungen der Frauen und 5,3 % aller Krebssterbefälle ist der Eierstockkrebs damit, nach dem Brustkrebs, die häufigste tödliche gynäkologische Krebserkrankung [2]. Ungefähr ein Drittel aller bösartigen Neubildungen der weiblichen Genitale und die Hälfte aller Sterbefälle an Krebserkrankungen dieser Organe fallen auf Krebserkrankungen der Eierstöcke [2]. Weltweit ist Eierstockkrebs die 20. häufigste Krebsart, bei der der Frau die 7. häufigste. Im Jahr 2020 erkrankten weltweit 295.414 Frauen an Eierstockkrebs [3]. In Deutschland erkrankten pro Jahr ca. 7800 Frauen an Eierstockkrebs. In 9 von 10 Fällen handelt es sich um epitheliale Tumoren [4]. Die Erkrankungsraten steigen bis zum 85. Lebensjahr kontinuierlich, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 68 Jahren [2]. 5-10 % aller bösartigen Erkrankungen des Eierstocks treten bereits unter dem 45. Lebensjahr auf. Hierbei handelt es sich dann jedoch meistens um den Typ des Keimzelltumors [5]. Der häufigste Ovarialtumor ist das schlecht differenzierte seröse Adenokarzinom [2]. Etwa eine von 75 Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an Eierstockkrebs. Seit der Jahrtausendwende sind die Neuerkrankungszahlen, sowie die Erkrankungs- und Sterberaten rückläufig [2].



Abbildung 1: Einteilung der bösartigen Neubildungen der Eierstöcke nach histologischem Typ in Deutschland (ohne Saarland) 2015-2016 [2]

Die Klassifikation der Ovarialtumoren erfolgt anhand ihrer Histogenese. Es gibt neun Hauptgruppen und die dazugehörigen Untergruppen. Die größte Hauptgruppe bilden die epithelialen Ovarialtumoren, sie machen 2/3 aller primären Ovarialneoplasien und ca. 90% der malignen Ovarialtumoren aus. Epitheliale Ovarialtumoren stammen alle vom Zölomepithel ab [6]. In der westlichen Welt gehören sie zu den häufigsten gynäkologischen Tumoren mit letalem Ausgang. Bei der Inzidenz der Erkrankung konnte man regionale Unterschiede feststellen, so erkrankten Frauen aus Japan, China oder Afrika seltener als hellhäutige Frauen [7]. Man unterscheidet benigne (50-60%), maligne (30-40%) und intermediäre Tumorformen, sog. Borderline-Tumoren (10-20%) [7]. Nicht-epitheliale Tumoren sind demzufolge nur 10% aller Ovarialtumoren. Die wichtigsten Vertreter der malignen nicht-epithelialen Ovarialtumoren sind Keimzelltumoren und Keimstrang-Stroma-

Tumoren [8]. Ca. 3-5% der malignen Ovarialtumoren sind maligne Keimzelltumoren, sie präsentieren jedoch 65-75% aller Ovarialmalignome bei Frauen unter 20 Jahren. Keimstrang-Stroma-Tumoren machen 5-8% aller Ovarialtumoren aus. Sie entstehen aus Keimsträngen (Granulosazellen, Sertoli-Zellen) und aus ovarialem Stroma (Theka-Zellen, Leydig-Zellen, Fibroblasten, Steroidzellen) [8]. Die meisten dieser Tumoren sezernieren Steroidhormone. Als Folge von Hyperöstrogenismus kommt es zu Pubertas praecox, postpubertären Blutungsstörungen infolge einer Endometriumhyperplasie sowie einer erhöhten Rate an Endometriumkarzinomen (5-25%). Selten kommt es in Folge von Hyperandrogenismus auch zu Virilisierung [6]. 15% aller malignen Ovarialtumoren sind Metastasen, diese treten dann meist bilateral auf. In 30% der Fälle ist der Primärtumor ein Endometriumkarzinom. In 15-20% der Fälle handelt es sich um Metastasen von Mamma- oder gastrointestinalen Karzinomen [6]

Epitheliale Tumoren	65-70%
Keimzelltumoren	15-20%
Keimstrang-Stroma-Tumoren	5-10%
Ovarialmetastasen	5%

Tabelle 1: Hauptgruppen der Ovarialtumoren [6]

Für die Diagnostik aller Ovarialtumoren ist eine ausführliche Anamnese und eine klinische Untersuchung (bimanuelle Palpation und Ultraschall) wichtig. Im Kindes- und Jugendalter gilt jeder Ovarialtumor als abnorm und ist somit abklärungsbedürftig. Dies gilt auch in der Postmenopause. Die Inzidenz maligner Ovarialtumoren steigt hier um Faktor 3. Klinische Symptome sind eher unspezifisch und die Patienten sind lange Zeit beschwerdefrei. Bei großen Tumoren kann es zu abdominellen Beschwerden und Völlegefühl kommen. In 10% aller malignen Ovarialtumoren, meist bei jüngeren Frauen, kommt es zur Stieldrehung und damit einhergehend Symptomen eines akuten Abdomens. Außerdem kann es zu Blutungsstörungen aufgrund endokrin aktiver Tumoren kommen. Fortgeschrittene Karzinome fallen häufig durch Darmobstruktion oder einen Ileus auf [6]. Bei der Feststellung ovarieller Raumforderungen ist abhängig vom Beschwerdebild, Alter bzw. Menopausenstatus, sonographischer Tumorgröße und -struktur, ob man zunächst sonographische Verlaufskontrollen machen kann oder eine Operation indiziert ist.

Eine Operation ist indiziert bei [6]:

- Größenzunahme einer Zyste
- Persistenz der Zyste über 5 Monate
- Beschwerden (Stieldrehung, Ruptur mit Blutung)
- Typische Ultraschallbefunde (z. B. Endometriose, Dermoid)
- Vor der Pubertät, postmenopausal
- Verdacht auf echte Neoplasie
- Verdacht auf malignen Ovarialtumor

Wenn eine Operation durchgeführt wird, muss der in der Onkologie gültige Grundsatz der unversehrten Bergung von Tumoren und Vermeidung von Kontamination gewahrt werden, da man in frühen Tumorstadien einen benignen zystischen Tumor von einem Borderline-Tumor oder einem Ovarialkarzinom nicht sicher unterscheiden kann [6]. Die anschließende Therapie ist von der Tumorart und dem Tumorstadium abhängig. Die Einteilung von Ovarialtumoren

erfolgt nach TNM oder FIGO. Die TNM-Klassifikation gilt für Ovarialkarzinome, Borderlinetumoren und auch für nicht-epitheliale Tumoren (z.B. Keimzell- und Keimstrangstumoren) [5].

	FIGO	Definition
Tx		Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
T0		Kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor auf die 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
T1c2	IC2	präoperative Kapsel- (Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
T1c3	IC3	Maligne Zellen im Ascites 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	IIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3		Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Metastasen ≤ 10 mm
N1b	IIIA1ii	Metastasen > 10 mm
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 ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c jedes N	IIIC	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
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)
-----	-----	---

Tabelle 2: Einteilung der Tumorstadien nach dem FIGO- und dem TNM-System [5]

1.2 Granulosazelltumoren

1.2.1 Begriffsklärung

Granulosazelltumoren (GCTs) gehören zu der Gruppe der Keimstrang-Stromatumoren (KSST), welche etwa 5-10% der Ovarialtumoren ausmachen [7]. Gemäß WHO werden KSST wie folgt eingeteilt [9]:

a) Reine Stromatumoren

- Fibrom
- zellreiches Fibrom
- Thekom
- luteinisiertes Thekom mit sklerosierender Peritonitis
- Fibrosarkom
- sklerosierender Stromatumor
- Siegelringzelliger Stromatumor,
- Mikrozystischer Stromatumor
- Leydig-Zell-Tumor
- Steoidzelltumor
- Steroidzelltumor, maligne

b) Reine Keimstrangtumoren

- Adulter Granulosazelltumor
- Juveniler Granulosazelltumor
- Sertoli- Zell- Tumor
- Keimstrangtumor mit Ringtubuli

c) Gemischte Keimstrang-Stromatumoren

- Sertoli- Leydig- Zell- Tumor
- Keimstrangtumor, NOS (nicht anders angegeben)

Granulosazelltumoren machen 1-2% aller Neoplasien des Ovars [6, 9, 10] und 5–10% der malignen Ovarialtumoren aus [8]. Erstmals beschrieben wurden GCTs 1859 von Rokitansky [11]. Diese Tumoren entsprechen einer tumorösen Proliferation der Granulosazellen, die in 80% mit einer Östrogenbildung einhergeht. In aller Regel weisen sie Thekazellanteile mit oder ohne Luteinisierung auf [7]. Etwa 95% der Granulosazelltumoren sind vom adulten Typ (AGCTs), die restlichen 5% sind vom juvenilen Typ (JGCTs) [8]. Jeder Granulosazelltumor gilt als potentiell maligne [6, 12]. In 2-5% aller Fälle tritt der Tumor bilateral auf [6, 8]. Typisch sind Spätrezidive, auch 20- 30 Jahre nach einer Operation. Die 10 Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 70-95% [6]. Granulosazelltumoren werden häufig im Tumorstadium FIGO I festgestellt [8, 13].

1.2.2 Epidemiologie

In Deutschland waren Tumorerkrankungen des Eierstocks 2016 bei Frauen die acht häufigste Tumorerkrankung. 3,1% aller bösartigen Neubildungen der Frau betrafen das Ovar. Es handelte sich um die fünft häufigste Krebstodesursache [5, 14]. 2016 gab es 7350 Neuerkrankungen, die Zahl der Neuerkrankungen ist in den letzten Jahren leicht rückläufig. Weniger als 2% aller Ovarialtumoren sind Granulosazelltumoren [15]. Die Inzidenz von Granulosazelltumoren liegt bei 0,6-0,8/100.000 pro Jahr [16]. Granulosazelltumoren treten bei Patientinnen verschiedenen Alters auf und zeigen dabei eine große Altersspanne, im Durchschnitt sind Patientinnen bei Erkrankung 53 Jahre alt [9]. Hierbei handelt es sich dann in der Regel um den adulten Typ. 5% der betroffenen Patienten erkranken vor der Pubertät [7]. Patientinnen, die an juvenilen Granulosazelltumoren erkranken sind zum Großteil, zu 44%, 10 Jahre alt oder jünger. 34% der Betroffenen sind zwischen 11 und 20 Jahren [17]. Obwohl es eher selten ist, können erwachsene Frauen auch am juvenilen Typ erkranken und Kinder bzw. Jugendliche am adulten Typ [18].

1.2.3 Granulosazellen

Granulosazellen sind Zellen des Epithels in Ovarialfollikeln [19]. Die Hauptfunktion der Granulosazellen ist die Produktion von Steroidhormonen. Außerdem sind sie entscheidend bei der Follikulogenese und bei der Ovulation [20]. In der zweiten Zyklushälfte findet die Follikelreifung statt. Durch das Luteinisierende Hormon (LH) wird der Primordial- in den Primärfollikel umgewandelt. Der Primärfollikel besteht aus der Eizelle, umgeben von einer einschichtigen Lage flacher Epithelien, ruhenden Granulosazellen. Durch den Einfluss von FSH entsteht der Sekundärfollikel. Die Eizelle wächst und die Granulosazellschicht verändert sich, es kommt zur kuboidalen Transformation und Mehrschichtigkeit des Follikelepithels [7]. Außerdem bildet sich zwischen Eizelle und innerster Granulosazellschicht die Membrana pellucida. Nach weiterer Reifung entsteht der Graaf-Tertiärfollikel, der am Rand von Granulosazellen ausgekleidet ist. Des Weiteren differenzieren die Thekazellen, die an die Granulosazellschicht grenzen aus und bilden die dann die Theka interna und externa [7]. Nach der Ovulation und damit einhergehender Follikelruptur vergrößern sich die endokrin aktiven Granulosa- und Theka-interna-Zellen, reichern Lipide an (d.h. luteinisieren) und werden zu reifen Steroidhormon-produzierenden Granulosalutein- bzw. Thekalutein-Zellen.

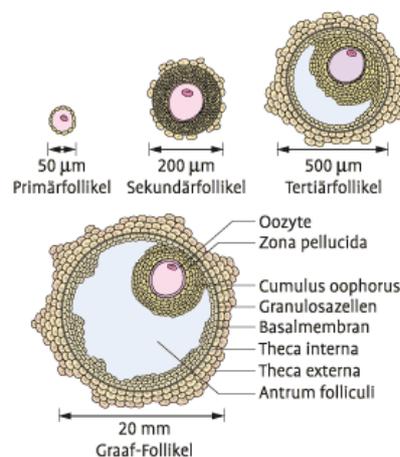


Abb. 2: Follikelentwicklung im Ovar im Verlauf des Zyklus [19]

Granulosazellen der zweiten Zyklushälfte produzieren neben Östradiol zunehmend Progesteron sowie mehrere folliculäre und regulatorische Peptide, z.B. Inhibin. Thekazellen synthetisieren Androgene und deren Vorläufer (Androstendion und Testosteron), die unter dem Einfluss von LH partiell zu Progesteron und Östradiol metabolisiert werden [7]. Auch wenn die Genese von Granulosazelltumoren nicht genau bekannt ist, weiß man, dass es durch Proliferation der Granulosazellen und Hemmung der Apoptose zur Entstehung dieser kommen kann [7, 18, 21].

1.2.4 Klinik

Granulosazelltumoren sind häufig hormonell aktive Tumoren, sie können mit einer Östrogenisierung, seltener mit einer Androgenisierung einhergehen [5, 8]. Eine Androgensekretion geht mit Virilisierungserscheinungen einher [22]. 55% der Tumoren produzieren Östrogen, was für die Symptome verantwortlich ist [22]. Unter anderem konnte eine Vergrößerung der Mammæ beobachtet werden [20]. Patientinnen mit adulten Granulosazelltumoren leiden Patientinnen unter Menorrhagie, sekundärer Amenorrhoe und Metrorrhagie, sowie unter Infertilität [8, 9]. Auch ein späteres Einsetzen der Menopause, aufgrund einer Endometriumhyperplasie, kann beobachtet werden [9, 23]. Eine Endometriumhyperplasie tritt in 25-50% der Fälle auf [20]. In 10-15% tritt diese bei Granulosazelltumoren einhergehend mit einem Endometriumkarzinom auf [22, 24]. Häufig haben die Patientinnen unspezifische Bauchschmerzen (41,1%) und eine Bauchumfangszunahme (26,4%) [25]. In zehn Prozent der Fälle werden Patientinnen mit akuten abdominalen Beschwerden klinisch auffällig, in diesen Fällen handelt es sich um eine Torsion und Ruptur des Tumors [9, 16]. Zum Diagnosezeitpunkt sind die Tumore meist unilateral und ausschließlich auf das Ovar beschränkt [9]. Patientinnen mit juvenilen Granulosazelltumoren hingegen fallen in ihrer Kindheit und Jugend durch eine Pseudopubertas Praecox auf [6, 26]. Ein Drittel der juvenilen Granulosazelltumoren ist endokrin inaktiv [7]. Außerdem sind Tumoren, die vor der Pubertät auftreten manchmal bei rektaler Untersuchung oder Untersuchung des Beckens tastbar [10]. Abdominelle Schmerzen sind bei Betroffenen eher selten (23,8%) [27].

1.2.5 Diagnostik

Bei der Diagnostik stehen vor allem eine ausführliche Anamnese und die klinische Untersuchung im Vordergrund. Bei der klinischen Untersuchung sind sowohl die Palpation des Abdomens als auch die bimanuelle Palpation wichtig [6]. Auch eine Ultraschalluntersuchung sollte zur Abklärung und Dignitätsbeurteilung bei tastbaren Ovarialtumoren durchgeführt werden [6]. Adulte GCTs zeigen sich in der Sonographie zystisch bis solide. Intrazystische papilläre Strukturen wie bei epithelialen Tumoren kommen meist nicht vor. Ein Nachweis von Aszites ist selten [20]. Außerdem kann häufig ein verbreitertes Endometrium beobachtet werden [18]. Auch CT und MRT- Untersuchungen können ergänzend durchgeführt werden. Hier können hämorrhagische oder fibrotische Veränderungen des Ovars zu sehen sein [28]. Dadurch, dass die Tumoren häufig hormonell aktiv sind, bietet es sich an bei Diagnose Östradiol, Testosteron, FSH und LH im Serum der Patientinnen zu bestimmen [5]. Im Verlauf kann die Untersuchung von Tumormarkern zur Kontrolle des Therapieerfolges nach Operation oder Chemotherapie dienen oder aber auch zum Erkennen eines Rezidivs. Um einen guten Verlauf des Tumormarkers zu haben, sollte

man die erste Probe vor Beginn der Therapie abnehmen. Tumormarker, die der Verlaufskontrolle bei Granulosazelltumoren dienen sind Inhibin und AMH (Anti- Müller-Hormon) [5, 6].

1.2.6 Pathologische und histopathologische Merkmale

Granulosazelltumoren variieren in ihrer Größe, im Durchschnitt haben sie einen Durchmesser von zehn bis zwölf Zentimetern [9]. Die Größe kann von einer nicht palpablen Läsion bis zu einer großen Tumormasse variieren. In 73,5% der Fälle sind sie >10cm groß [20]. Makroskopisch ähneln sich adulte und juvenile GCTs. Die Tumoren sind häufig solide-lobulär aufgebaut mit graugelber Schnittfläche [9, 10, 29] wobei Tumoren vom adulten Typ oftmals zystisch aufgebaut sind [7] und Tumoren vom juvenilen Typ hingegen häufig nekrotische Areale aufweisen, weshalb sie für maligne gehalten werden können [10]. Beide Formen können geronnenes Blut enthalten, vor allem die eher seltenen Tumoren, die mit einer Ruptur assoziiert sind, weisen eine auffällige Hämorrhagie auf [9, 10, 30]. Mikroskopisch unterscheidet man fünf Wachstumsmuster. Das Häufigste ist der mikrofollikuläre Typ (65%), dabei zeigt sich eine rosettenförmige Anordnung der Zellen mit einem kleinen, zentralen Lumen in dem sich dichtes eosinophiles Material befindet, dabei handelt es sich um Call-Exner-Bodies [30, 31]. Call-Exner-Bodies finden sich typischerweise beim adulten GCT [4]. Sind jedoch nur in 30% der Fälle zu sehen [20]. Beim makrofollikulären Typ finden sich Zysten, die Graaf- Follikeln ähneln und mit Sekret und Zellschutt gefüllt sind. Der trabekuläre Typ weist eine palisadenartige Anordnung der Tumorzellen auf. Der insuläre Typ zeigt gut begrenzte, rundlich angeordnete Zellkomplexe. Der sarkomatöse/ diffuse Typ ähnelt mit seinen dicht liegenden, faszikulären Zellformationen mit häufigen Mitosen mikroskopisch einem anaplastischen Karzinom [30, 31].

Juvenile und adulte Granulosazelltumoren kann man mikroskopisch meist unterscheiden: Adulte Granulosazelltumoren haben große, blasse, ovale Kerne mit einer kaffeebohnenartigen Einkerbung, eher spärliches Zytoplasma und eine geringe mitotische Aktivität (1-2 Mitosen/ 10HPF). Juvenile Granulosazelltumoren hingegen haben in der Regel dunkle Zellkerne ohne Rillen, mit mäßig bis reichlich Zytoplasma und eine mitotische Aktivität von bis zu 7 Mitosen/ 10HPF [10, 30], weshalb sie auch das anaplastische Karzinom zur Differentialdiagnose haben.

1.2.7 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie positiv sind in der Regel Inhibin [20, 32], Calretinin [20], SF-1, WT-1, CD99 und CD56. Seltener hingegen FOXL2 [9]. Auch ER-alpha und -beta, sowie PR werden von GCTs exprimiert [33, 34]. Inhibin wird von Granulosazellen und von Granulosazelltumoren produziert. Man unterscheidet Inhibin A und B. Inhibin A wird während der späten Follikelphase und der Lutealphase sezerniert, Inhibin B während der frühen Follikelphase. Inhibin ist ein Wachstumsfaktor von Granulosazellen. Zudem sorgt Inhibin für die Suppression der FSH-Produktion in der Hypophyse. Granulosazelltumoren exprimieren beide Varianten [34]. In fortgeschrittenen Stadien ist die Expression von Inhibin schwächer ausgeprägt [20]. Bei Calretinin handelt es sich um ein Calcium-bindendes Protein, welches in Theka- und Stromazellen des Ovars gebildet wird. Es kann sowohl bei AGCTs als auch bei JGCTs nachgewiesen exprimiert werden [34], ebenso wie SF-1 [35]. Der Steroidogene Faktor 1 (SF-1) ist ein nukleärer Rezeptor, der eine wichtige Rolle bei der

Regulation der Entwicklung und Funktion der Nebenniere und der Ovarien hat [36]. Das Wilms-Tumor-Gen (WT-1) ist ein Tumorsuppressorgen und wichtig bei der Entwicklung des Urogenitalen-Systems. Es wird bei verschiedenen Tumoren, so auch bei diversen Keimstrang-Stromatumoren u.a. bei GCTs exprimiert [37]. CD99 ist ein Produkt des MIC2-Gens, es wird in verschiedenen Geweben überexprimiert, u.a. in unreifen Thymozyten und in Zellen des Ewing-Sarkoms. Außerdem wird es in normalen und neoplastischen Granulosa- und Sertolizellen vermehrt exprimiert. Es dient vor allem der Unterscheidung zwischen Keimstrang-Stromatumoren und anderen primären Ovarialtumoren [38]. CD56 ist ein membrangebundenes Oberflächenprotein, welches Zellinteraktion während der embryonalen Entwicklung, Zellmigration und Organogenese induziert. Vor allem wird es bei Zellen neuroektodermalen Ursprungs sowie bei unterschiedlichen Tumoren exprimiert. Ebenso wird CD56 in Primordialfollikeln und Thekazellen exprimiert, sodass man CD56 eine Rolle bei der Follikulogenese zuschreibt [39]. Auch CD56 wird in allen Keimstrang-Stromatumoren exprimiert. [40].

1.2.8 Angeborene Syndrome, chromosomale Veränderungen und genetisches Profil

Es gibt verschiedene Syndrome, die mit der Erkrankung an einem Granulosazellumom assoziiert sind. Dazu gehören das Potters-Syndrom, sowie das Preutz-Jeghers-Syndrom [20]. Für juvenile Granulosazelltumoren wurde über eine Assoziation mit dem M. Ollier und dem Maffucci-Syndrom berichtet [17, 20]. Adulte Granulosazelltumoren weisen häufig eine Trisomie der Chromosomen 12 und 14 auf, die Chromosomen 22 und 16 eine Monosomie bzw. das Chromosomen 16 auch eine Deletion [9]. BRCA1 und BRCA2 Mutationen haben keinen Einfluss auf die Entstehung von Granulosazelltumoren [20]. Jedoch haben über 90% der Tumoren eine Missense- Punktmutation im FOXL2-Gen (402C → G) [9]. Durch diese Punktmutation wird im FOXL2-Protein an Position 134 die Aminosäure Cystein durch Tryptophan ersetzt (Cys134Trp oder C134W) [41]. Die Mutation findet sich in 97% der AGCTs und nur in 10% der JGCTs [10, 41].

1.2.9 Therapie

Im Vordergrund steht die operative Therapie. Nach den aktuellen S3-Leitlinien wird empfohlen eine untere mediane Laparatomie mit Inspektion und Palpation der gesamten Abdominalhöhle, eine Entnahme einer Peritonealzytologie sowie die Entfernung des Tumors durch Salpingo-Oophorektomie durchzuführen. Analog zum Ovarialkarzinom sollte ein operatives Staging erfolgen. Dieses beinhaltet die Adnexektomie beidseits, die Hysterektomie, Biopsien aus allen auffälligen Stellen sowie Peritonealbiopsien aus unauffälligen Regionen, die Omentektomie, mind. Infrakolisch und die Appendektomie. Eine Lymphadenektomie ist hingegen nicht notwendig, da ein Nutzen der systematischen Lymphonodektomie bei unauffälligen Lymphknoten nicht belegt ist [5]. Zudem sind Lymphknoten bei Granulosazelltumoren selten positiv. In einer großen Registerstudie an 1350 Patientinnen mit Granulosazelltumor hatten über alle Stadien nur 3,1% der Betroffenen positive Lymphknoten [42]. Im Falle eines geringen Tumorstadiums (FIGO IA) und gewünschten Fertilitätserhaltes kann eine einseitige Adnektomie und eine Abrasio, zum Ausschluss eines Endometriumkarzinoms, vorgenommen werden [5, 6]. Bei einem auffälligen

kontralateralen Ovar sollte eine Biopsie entnommen werden. In 2-8% liegt ein kontralateraler Tumorbefall vor [16]. Bei postmenopausalen Frauen ist eine vollständige Operation auch im Stadium FIGO IA indiziert [8]. Eine makroskopisch vollständige Entfernung des Tumors ist ein wichtiger Prognosefaktor [22]. Bei Stadium IA bzw. IB und erfolgter Adnexektomie mit unauffälliger Zytologie ist eine Watch and Wait-Strategie mit engmaschiger klinischer und sonographischer Kontrolle möglich. Ab dem Stadium IC kann eine adjuvante Chemotherapie erwogen werden [5]. Ab dem Tumorstadium II und bei postoperativen Tumorresten sollte eine platinhaltige Chemotherapie durchgeführt werden. In der Regel kommt die Kombination Cisplatin, Etoposid, Bleomycin (PEB) oder Carboplatin/Paclitaxel (TC) zum Einsatz. Bei juvenilen Granulosazelltumoren ist alternativ auch die Gabe von Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid (PEI) möglich [5, 43]. Bei Lokalrezidiven erfolgt ein erneutes Tumordebulking sowie eine Radio- und/ oder eine Chemotherapie [43]. Die Wirksamkeit einer Radiotherapie ist nicht eindeutig belegt, jedoch konnte bei fortgeschrittenen Tumorstadien und Rezidivtumoren eine Tumorreduktion bzw. ein verlängertes Überleben beobachtet werden [20, 44]. Sollte keine Operation möglich sein oder der Tumor wurde nicht vollständig entfernt, kann neben einer Radiotherapie auch eine Chemotherapie (BEP oder TC) oder eine endokrine Therapie mit Östrogenrezeptorantagonisten, Aromatasehemmern oder GnRH-Analoga erfolgen [43]. Des Weiteren gibt es experimentelle Ansätze zur Therapie. So konnte man in Studien die Wirksamkeit von Bevacizumab, einem Angiogenese-Inhibitor, bei GCTs nachweisen [18, 45].

Nach abgeschlossener Therapie sollten regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen stattfinden. Diese beinhalten die klinische Untersuchung, sonographische Kontrollen und, wenn initial erhöht oder im Tumorgewebe nachgewiesen, die Bestimmung des Serum-Inhibin, Anti-Müller-Hormon oder gegebenenfalls auch anderer initial erhöhter Parameter (z. B. Östradiol). Bei adulten Granulosazelltumoren sollten halbjährliche Kontrollen mindestens über 10 Jahre, besser lebenslang durchgeführt werden, da Rezidive auch noch nach 25 Jahren beschrieben wurden [5].

1.2.10 Prognose und prädiktive Faktoren

Im Vergleich zu Ovarialkarzinomen epithelialen Ursprungs gelten Granulosazelltumoren eher als niedrig maligne. GCTs wachsen eher langsam und neigen eher zu späten Rezidiven [17]. Auch werden sie meist in frühen Tumorstadien entdeckt. 50-80% der Tumoren werden im Tumorstadium FIGO IA diagnostiziert [18]. Die Rezidivrate bei adulten Granulosazelltumoren im Stadium FIGO IA beträgt 10-15%, Stadium unabhängig ist die Rezidivrate 20-30% [9]. Rezidive und Metastasen treten häufig nach fünf Jahren auf, in manchen Fällen aber auch erst nach 20 Jahren [9, 46]. Metastasen sind eher selten, aber wenn sie auftreten, dann im Peritoneum und im Omentum, selten in der Leber oder in der Lunge [9]. Patienten mit Rezidiven, können mehrere Rezidive haben und 70-80% dieser betroffenen sterben letztendlich daran [47]. Entscheidend für die Prognose ist unter anderem das chirurgische Debulking. Patienten mit Residuen zeigten ein verkürztes Überleben [25, 48]. Insgesamt liegt das 10-Jahres Überleben bei 60-90% [10]. Im Stadium I 75-90%, im Stadium II 55-75% und im Stadium III 25-50% [46]. Nach 25 Jahren leben noch 40-60% der Betroffenen [20]. Patienten mit einer Erstdiagnose vor dem 50. Lebensjahr haben eine bessere Prognose [13]. Prognostisch ungünstige Faktoren sind ein fortgeschrittenes Tumorstadium, eine Bilateralität des Tumors, eine Ruptur des Tumors sowie ein Nachweis zytologisch positiver Aszites [9, 30]. Auch das Erkrankungsalter oder eine stattgefundene Tumorruptur haben Einfluss auf die Prognose [20]. Der wichtigste Faktor ist jedoch die Größe. Tumoren über 15cm haben eine deutlich schlechtere Prognose. Das mikroskopische Erscheinungsbild

hat keinen Einfluss auf die Prognose [9], jedoch eine hohe Expression von Ki-67, Kernatypien oder eine hohe mitotische Aktivität [20]. Ki-67 ist ein Protein, welches in allen aktiven Phasen der Zellteilung exprimiert wird und daher mit Zellproliferation in Verbindung gebracht wird [49]. Eine fehlende bzw. eine verminderte Expression von FOXL2 in der Immunhistochemie beim juvenilen Typ, wird mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht [17, 50].

1.3 FOXL-2

1.3.1 Begriffsklärung

FOXL 2 (Forkhead Box L2) ist ein Protein kodierendes Gen [51]. Das Gen ist 2,7 kb lang und kodiert 376 Aminosäuren [52]. FOXL2 ist lokalisiert auf dem humanen Chromosomen 3q23[52]. Es gehört zu den Forkhead-Box-Proteinen, die wichtig für die Transkription von Genen sind. Es handelt sich hierbei, um den am längsten bekannten Marker für Störungen bei der Differenzierung von Ovarien bei Säugetieren [53]. FOXL2 spielt eine wichtige Rolle in der fetalen Entwicklung, aber auch später bei der Fertilität der Frau [53, 54]. Das Gen ist verantwortlich für die Zelldifferenzierung des Ovars sowie für die Follikelentwicklung und deren Aufrechterhaltung [53]. FOXL2 wird benötigt für die Entwicklung von Granulosazellen, daher wird es in diesen auch stark exprimiert [41, 52], in Stromazellen hingegen nur schwach und in Eizellen gar nicht [41]. Studien haben gezeigt, dass FOXL2 die Granulosazellproliferation, die Follikelentwicklung und die ovarielle Homonsynthese reguliert [55]. FOXL2-Keimzell-Mutationen, welche autosomal dominant vererbt werden, haben das Blepharophimose- Ptosis-Epicanthus-inversus-Syndrom (BPES) zur Folge. Man unterscheidet hier BPES I und BPES II. BPES I resultiert aus einer Loss-of-Function-Mutation. Bei Betroffenen des Typs I kommt es zu einer vorzeitige Ovarialinsuffizienz (pematute ovarian failure= POF) [41, 56]. POF ist definiert als Einsetzen der Menopause vor dem 40. Lebensjahr [56]. Es kommt zu einer gestörten Follikulogenese und zu einer frühzeitigen Erschöpfung der Follikel [50]. Außerdem konnte bei Granulosazelltumoren eine Punktmutation 402C>G (C134W) des Gens beobachtet werden. Diese findet man in über 95% der adulten Granulosazelltumoren [57-59]. Bei Juvenilen Granulosazelltumoren tritt die FOXL2-Mutation nicht [60] bzw. selten auf [41, 61]. Auch bei Thekomen und Sertoli-Leydigzelltumoren konnte die Mutation beobachtet werden [41, 61]. Tumoren mit homozygoten FOXL2-Mutationen haben sind aggressiver und haben eher frühere Rezidive [62]. Studien haben ergeben, dass der FOXL2-Wildtyp die Apoptose induzieren kann, bei der mutierten Variante haben maligne veränderte Zellen einen Überlebensvorteil [63, 64]. Das mutierte FOXL2-Allel führt zur Unterdrückung und somit zur Hemmung des TGF- β Pathway, folglich wird die Apoptose gehemmt [65]. Bei aggressiv wachsenden juvenilen Granulosazelltumoren, war in der Immunhistochemie FOXL2 vermindert oder nicht vorhanden [50]. FOXL2 ist bedeutend für die Embryogenese, Zelldifferenzierung und die Tumorgenese [54].

1.4. NanoString

NanoString® Technologies, Inc. ist ein im Privatbesitz befindlicher Anbieter für u.a. Molekulardiagnostikprodukte. Das Analysesystem nCounter® wird seit 2008 für die translatorische Forschung verwendet und wird seit 2013 in der Europäischen Union auch für

diagnostische Zwecke eingesetzt. Erstmals wurde die NanoString®- Technologie von Geiss und Kollegen 2008 vorgestellt [66]. Das System ermöglicht die Analyse von Hunderten von Genen, miRNAs oder Kopienzahlvariationen mit hoher Sensibilität und Präzision [67]. Die Analyse erfolgt hierbei automatisiert und mittels einer neuartigen Technologie, die auf einem farbcodierten Barcode beruht [68, 69]. Dabei gehört jeder Barcode zu einer einzigen Sonde, welche wiederum einem Gen zugeordnet ist [69]. Anhand der Häufigkeit, der jeweiligen Barcodes, wird die Expression der verschiedenen Gene gemessen [68]. Das Ziel der Analyse ist es herauszufinden, ob es verschiedene Expressionen von mRNA oder miRNA gibt [68]. Die exprimierten Gene werden automatisch von dem NanoString® nCounter System gezählt [70]. Die Analyse- Software führt automatisch die Daten Analyse und Normalisierung durch. Zudem erstellt sie einen Bericht, in dem auch die zugehörigen Signalwege aufgeführt werden [71]. Der Vorteil der NanoString Technologie ist, dass man keine Amplifikation benötigt und es sensitiv genug ist, schon eine kleine Menge an Molekülen zu erkennen [68, 71]. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Detektion der Gene komplett digital ist und auch das die Analyse automatisch mittels eigener Analyse-Software durchgeführt wird [71]. Man kann die Analyse mittels RNA aus in Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Gewebe (FFPE) durchführen [72, 73]. Andere mögliche Untersuchungsmaterialien sind frisch-eingefrorene Gewebe (FF) oder Zellysate [71]. In dem hier verwendeten nCounter® Pan Cancer Pathway Panel werden 770 Gene, die noch um 30 Gene erweiterbar sind, und 13 verschiedene Signalwege, die bei der Entstehung von Krebs von Bedeutung sind, untersucht [72]. Zur Normierung sind in dem nCounter® Pan Cancer Pathway Panel auch 40 „Housekeeping Gene“ enthalten, diese wurden aus TCGA (The Cancer Genome Atlas) ausgewählt. Es handelt sich um Gene, die immer wieder bei verschiedenen Krebsarten vorkommen [72, 73].

1.5 Zielsetzung und Fragestellung:

Die vorliegenden Untersuchungen sollen zur Beantwortung folgender Fragen beitragen:

- Gibt es eine Korrelation zwischen der FOXL2-Mutationsanalyse auf molekularbiologischer Ebene und der immunhistochemischen Expression?
- Hat eine Mutation im FOXL2 ein Einfluss auf das Tumorstadium und auf das Überleben?
- Hat die Expression von Östrogen- α , Progesteron, Inhibin oder Ki-67 in der Immunhistochemie ein Einfluss auf das Tumorstadium oder das Überleben bei Patientinnen mit Granulosazelltumoren?
- Können mittels NanoString Gene herausgefiltert werden, die offenbar eine Rolle der Entstehung von Granulosazelltumoren haben?
- Falls ja, gibt es hierbei Unterschiede zwischen den verschiedenen Granulosazelltumoren?

2. Methoden und Material

2.1 Patientenkollektiv

Ursprünglich umfasste das Patientenkollektiv 63 Patientenfälle von den Jahren 1987 bis 2014 des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München. Da ein Fall kein Tumorgewebe enthielt und somit nicht untersucht werden konnte, wurde er im oben aufgeführten Patientenkollektiv nicht einbezogen. Ein weiterer Fall wurde im Verlauf vom Kollektiv ausgeschlossen, da es sich doch um einen anderen Tumor handelte. In die Analyse wurden somit 61 Patientenfälle eingeschlossen. Von jedem Fall wurde ein Paraffinblock herausgesucht, von dem ein Schnittpräparat, für die HE- Färbung und 11 Leerschnitte erstellt wurden.

Die 61 Fälle sind 51 Patientinnen zuzuordnen, da auch Rezidivtumoren untersucht wurden. Von den 61 untersuchten Fällen, waren 93,4% (57) adulte Granulosazelltumoren und 6,6% (4) juvenile GCTs. In 59% (36/61) der Fälle der untersuchten Tumoren handelte es sich um einen Primärtumor, bei den restlichen handelte es sich um Rezidive.

Das Erkrankungsalter war im Mittel 54,5 Jahre. Der Median war 54 Jahre. Die jüngste Patientin war bei Ersterkrankung 6 Jahre alt, die älteste Patientin 89 Jahre. 82,3% Der Patientinnen befanden sich bei Erkrankung zwischen der 5.-8.Lebensdekade. Betrachtet man nur die adulten Fälle war das Erkrankungsalter zwischen 24- 89 Jahren, im Mittel waren die Patientinnen bei Ersterkrankung 57,4 Jahre alt. Patientinnen, die an einem juvenilen Granulosazelltumor erkrankten, waren im Alter zwischen 6- 32 Jahren. Das mittlere Ersterkrankungsalter lag hier bei 20,75 Jahren.

Nummer	TNM Primärtumor	Typ	Alter bei Erstdiagnose	Rezidiv	Todesursache/ Lebensstatus	Überleben (Monate)
1001	pT3aN1M0	adult	51	Ja	Tumor abhängig	175
1002a	pT3c	adult	34	Ja	Lebt	231
1002b	s.o.	adult	s.o.	Ja	s.o.	s.o.
1003	pT1aNxMx	adult	65	Nein	Lebt	72
1004	-	juvenil	23	Ja	Tumor abhängig	19
1005	pT2apNxpMx	adult	58	Nein	Unbekannter Status	-
1006a	pT1cpNxpMx	adult	34	Nein	Lebt	82
1006b	s.o.	adult	s.o.	Ja	s.o.	s.o.
1006c	s.o.	adult	s.o.	Ja	s.o.	s.o.
1007	pT1a	adult	47	Nein	Lebt	106
1008	pT2b	adult	49	Ja	Lebt	398
1009	-	adult	24	Ja	Lebt	87
1010	pT1cNxMx	adult	56	Nein	Tumor abhängig	138
1011	pT1a	adult	66	Nein	Lebt	63
1012	pT1aN0Mx	juvenil	32	Nein	Unbekannter Status	-
1013	pT1aN0Mx	adult	66	Nein	Unbekannter Status	-
365c	pT1aN?M0	adult	58	Ja	Tumor abhängig	292
365b	s.o.	adult	s.o.	Ja	s.o.	s.o.

Nummer	TNM Primärtumor	Typ	Alter bei Erstdiagnose	Rezidiv	Todesursache/ Lebensstatus	Überleben (Monate)
561	pT1aNxM0	adult	78	Nein	Tod durch andere Ursache	186
562	pT1aNxMx	adult	62	Nein	Tod durch andere Ursache	186
563	pT1a	adult	68	Nein	Tod durch andere Ursache	240
565	pT1aN?M0	adult	52	Nein	Lebt	196
566	pTNxM0	adult	50	Nein	Lebt	159
567	pT1aN0M0	adult	48	Nein	Lebt	312
569	pT1cN0M0	adult	45	Nein	Tod durch andere Ursache	86
571	pT1aN0M0	adult	54	Nein	Lebt	138
573	pT3	adult	63	Nein	Tumor abhängig	156
574	-	adult	70	Nein	Unbekannte Ursache	20
575	-	juvenil	22	Nein	Lebt	108
576a	pT1a	adult	67	Ja	Tumor abhängig	141
576b	s.o.	adult	s.o.	Ja	s.o.	s.o.
577a	pT3cN1Mx	adult	72	Ja	Tumor abhängig	101
577b	s.o.	adult	s.o.	Ja	s.o.	s.o.
577c	s.o.	adult	s.o.	Ja	s.o.	s.o.
578	-	adult	47	Ja	Tumor abhängig	288
579	pT3	adult	39	Ja	Tumor abhängig	48
587	-	adult	58	Nein	Lebt	44
588a	pT3bN0Mx	adult	45	Ja	Tumor abhängig	125
588b	s.o.	adult	s.o.	Ja	s.o.	s.o.
588c	s.o.	adult	s.o.	Ja	s.o.	s.o.
589a	-	adult	65	Ja	Tumor abhängig	91
589b	s.o.	adult	s.o.	Ja	s.o.	s.o.
590	-	adult	48	Ja	Tumor abhängig	417
592	pT1aN0M0	juvenil	6	Nein	Lebt	78
593	pT1cNxMx	adult	68	Nein	Lebt	81
594	pT1aN0Mx	adult	62	Ja	Unbekannte Ursache	240
596	pT2	adult	77	Nein	Unbekannte Ursache	0
597	pT1aNxMx	adult	42	Nein	Lebt	61
598	pT3	adult	45	Ja	Lebt	291
599	pT1aMxNx	adult	66	Nein	Lebt	126
GCT1	pT1b	adult	46	Nein	Lebt	12
GCT2	pT1aNxN0	adult	89	Nein	Lebt	57
GCT3	pT1a	adult	40	Nein	Unbekannter Status	-
GCT4	pT1c	adult	47	Nein	Unbekannter Status	-
GCT5	pT3aNx	adult	75	Nein	Lebt	10

Nummer	TNM Primärtumor	Typ	Alter bei Erstdiagnose	Rezidiv	Todesursache/ Lebensstatus	Überleben (Monate)
GCT6	pT1cNxMx	adult	54	Nein	Lebt	83
GCT7	pT1a	adult	73	Nein	Lebt	10
GCT8	pT2c	adult	72	Nein	Tod durch andere Ursache	1
CCT9	pT1a	adult	49	Nein	Unbekannter Status	-
GCT10	pT1cNxN0	adult	77	Nein	Lebt	8
GCT11	pT1a	adult	77	Nein	Lebt	6

Tabelle 3: Patientenkollektiv

Bei 90,2% (46/51) der 51 Patientinnen lagen klinische Follow-up Daten aus dem Münchner Tumorregister vor, von diesen sind 43,5% (20/51) verstorben. 60% (12/20) der Todesfälle waren tumorabhängig, 25% (5/20) der Todesfälle waren tumorunabhängig oder waren an einem anderen Tumor gestorben und in 15% (3/20) der Fälle war die Todesursache unbekannt.

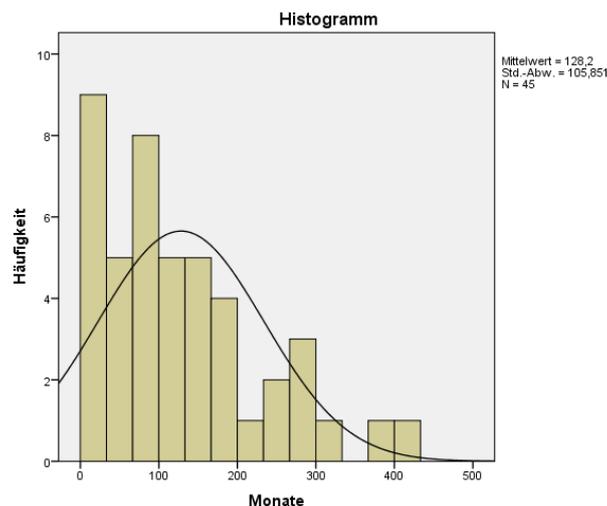


Abbildung 3: Gesamtüberleben

Der Beobachtungszeitraum lag zwischen 0 und 417 Monaten mit einem Mittelwert von 128,2 Monaten und einem Median von 105,9 Monaten.

Zur Auswertung des Tumorstadiums wurden nur die jeweiligen Primärtumoren berücksichtigt. Da in vielen Fällen keine Daten zum Nodalstatus und zur Metastasierung vorlagen, wurden diese nicht in die Auswertung einbezogen. Nur bei 38 von 51 Patientinnen lag eine genaue Einteilung des Tumorstadiums vor.

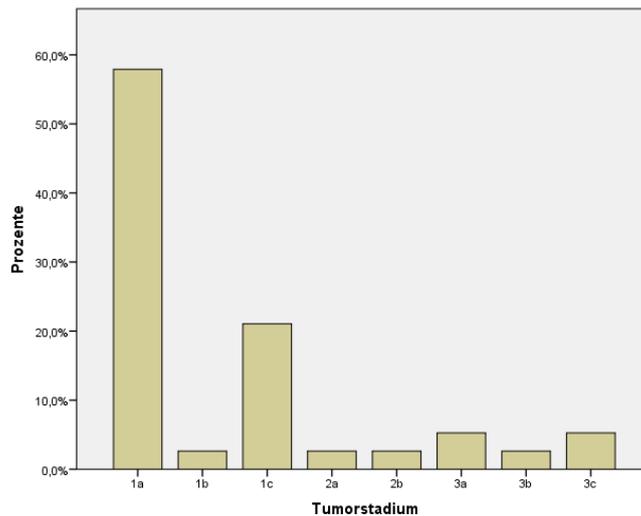


Abbildung 4: Häufigkeiten der verschiedenen Tumorstadien

2.2 TMA´s- Tissue Micro Arrays

Insgesamt wurden 2 TMA Blöcke von den 63 Fällen mit Granulosazelltumoren angefertigt, auswertbar waren jedoch nur 61 Fälle. Vor dem Stanzen wurde, in dem zum Block gehörigen HE Schnitt, mittels Lichtmikroskopie der Tumor ermittelt und mit einem wasserfesten Stift eingezeichnet. Von jedem Tumor wurden 2 Stanzen à 1,5mm Durchmesser in einen leeren Paraffinblock eingebracht. Das Ergebnis waren 1 Block mit 70 Stanzen, bestehend aus 2 Stanzen Kontrollgewebe (Lymphknoten) und je 2 Stanzen von 34 Fällen. Der zweite Block hatte 60 Stanzen, mit wieder 2 Stanzen Kontrollgewebe und je 2 Stanzen von 29 Fällen. Von den fertigen TMA Blöcken wurden Schnitte à 2µm angefertigt und in HE sowie unten genannten immunhistochemischen Färbungen gefärbt.



Abbildung 5: TMA Block 1



Abbildung 6: TMA Block 2

2.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Immunhistochemie ist eine Methode bei der ein Gewebeschnitt auf Proteine/Antigene untersucht wird. Es kann bestimmt werden, wie stark das jeweilige Protein exprimiert ist und in welchem Zellkompartiment (z.B. Zellkern, Zytoplasma). Die Untersuchung erfolgt mittels Marker gebundenen Antikörpern, die an Epitope der Antigene binden und somit das Protein sichtbar machen.

Die folgenden immunhistochemischen Färbungen wurden automatisch mit dem BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul gefärbt. Das Detektionssystem war XT ultraView DABv3.

2.3.1 Östrogen- ER alpha

Antikörper: Hersteller Ventana monoclonal rabbit IgG (ready to use); Klon SP1

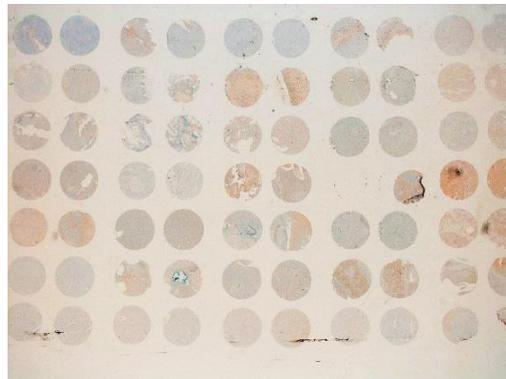


Abbildung 7: Übersicht TMA Block 1: ER alpha

2.3.2 Progesteron- PR

Antikörper: Hersteller Ventana monoclonal rabbit IgG (ready to use); Klon 1E2

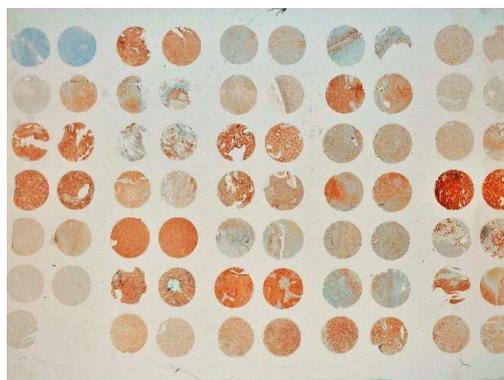


Abbildung 8: Übersicht TMA Block 1: PR

2.3.3 *Inhibin α*

Antikörper: Hersteller Cell Marque monoclonal mouse IgG2a (ready to use); Klon R1

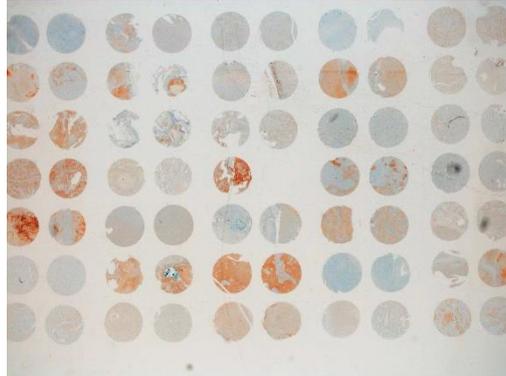


Abbildung 9: Übersicht TMA Block 1: Inhibin

2.3.4 *Ki-67*

Antikörper: Hersteller DAKO monoclonal mouse IgG1 κ (Verdünnung 1:150); Klon MIB-1

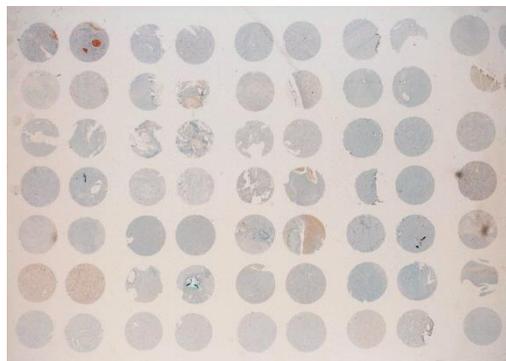


Abbildung 10: Übersicht TMA Block 1: Ki-67

2.3.5 *FOXL2*

Die immunhistochemische Färbung mittels FOXL2 Antikörper erfolgte manuell. Es wurde ein Antikörper der Firma Abcam verwendet und das Detektionssystem ImmPRESS Reagent Kit Anti-GOAT (Firma Vector). Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der TMA- Leerschnitte. Die Antigendemaskierung erfolgte mittels Target Retrieval Solution Citrate pH6 (Dako) bei einer Kochzeit von 2x15min in der Mikrowelle bei 750W. Danach kühlten die Schnitte bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte 2x5min in TRIS-Puffer pH7,5 gespült um den pH-Wert auszugleichen.

Um in folgenden Schritt die Peroxidase sichtbar zu machen und eine diffuse Anfärbung des Gewebes zu verhindern, wurde die endogene Peroxidase blockiert. Dazu wurden die Schnitte 10min in 7,5% wässriges Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur eingelegt, 10min fließend

gewässert und erneut 2x5min mit TRIS-Puffer gespült. Es folge die Zugabe des Blocking Serums (Detektionssystem s.o.), der Überstand wurde abgekippt.

Der Primär-Antikörper FOXL2, Verdünnung 1:100, wurde nun auf die Präparate aufgetragen und 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Erneutes spülen mit TRIS- Puffer für 2x5min. Das Anti- GOAT Ag (Detektionssystem) inkubierte 30min und wurde wiederum mit TRIS-Puffer (s.o.) gespült. Daraufhin wurde das entsprechende Chromogen- Substrat AEC (Firma Dako) aufgetragen und inkubierte 10min. Anschließend wurde 10min gewässert.

Nachdem die TMA- Schnitte 10 Sekunden mit Hematoxylin Gils Formula gegengefärbt und erneut 10min fließend gewässert wurden, wurden sie mit Kaisers Glyceringelantine eingedeckt.

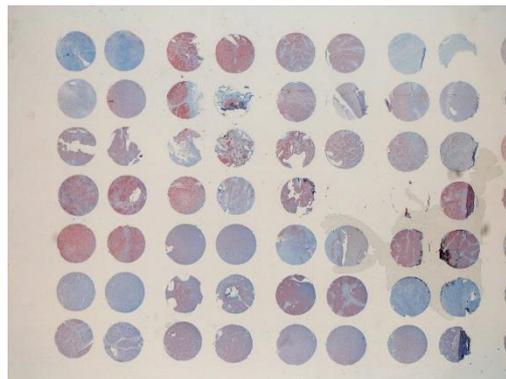


Abbildung 11: Übersicht TMA Block 1: FOXL2

2.3.4 Auswertung

Die immunhistochemischen Färbungen Östrogen, Progesteron, Inhibin und FOXL2 wurden mittels eines Scores von Remmele und Stegner ausgewertet. Dabei wurde die Intensität der Färbung sowie der prozentuale Anteil der gefärbten Zellkerne bzw. bei der Inhibin-Färbung der prozentuale Anteil des gefärbten Zytoplasmas beurteilt. Das Produkt aus den Punkten der Färbeintensität und dem Prozentsatz positiver Kerne ergibt einen Score zwischen 0-12 [74]. Dabei gilt ein Wert von 0-2 als negativer Immunreaktiver Score, Werte ≥ 2 als positiv.

Punkte	Färbeintensität	Anteil positiver Kerne
0	Keine Farbreaktion	Keine positiven Zellkerne
1	Schwache Farbreaktion	<10% positive Zellkerne
2	Mäßige Farbreaktion	10-50% positive Zellkerne
3	Starke Farbreaktion	51- 80% positive Zellkerne
4	/	81-100% positive Zellkerne

Tabelle 4: Bewertung nach Score von Remmele und Stegner

Für die statistische Auswertung wurde ein Score von 0-2 als negativ, von 3-4 als schwach positiv, von 6-8 als mäßig positiv und von 9-12 als stark positiv gewertet.

Beispiel der Färbeintensität anhand der IHC von Östrogen:

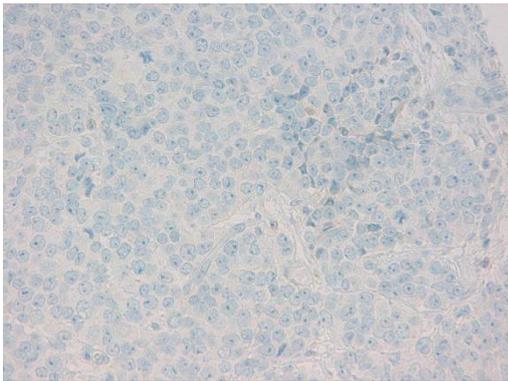


Abb. 12: keine Farbreaktion 40fache Vergrößerung

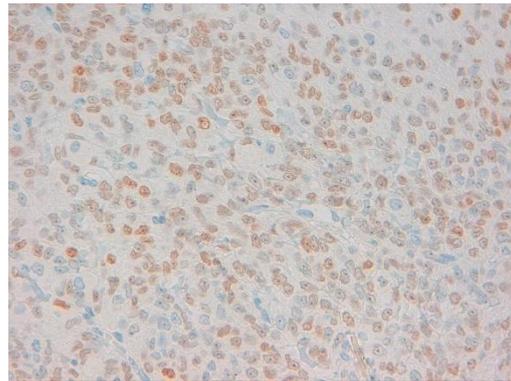


Abb. 13: leichte Farbreaktion 40fache Vergrößerung

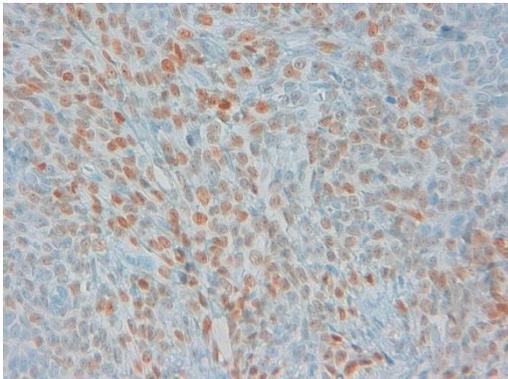


Abb. 14: mäßige Farbreaktion 40fache Vergrößerung

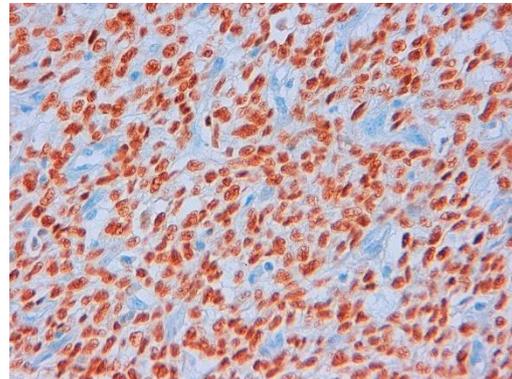


Abb. 15: starke Farbreaktion 40fache Vergrößerung

Bei der Ki-67 Färbung wurde nur der Prozentsatz der positiven Zellkerne bewertet. Dabei gab es 4 verschiedene Gruppen:

Gruppe	Prozentsatz
1	<5%
2	5-10%
3	11-20%
4	>20%

Tabelle 5: Einteilung der Ki-67 IHC

Es wurden jeweils beide Stanzpaare betrachtet, in Fällen, in denen sich die Intensität und/oder der Prozentuale Anteil zwischen den Stanzen eines Paares unterschieden, wurde die qualitativ bessere Stanze bewertet. War die Qualität in beiden Stanzen gleich, wurde der höhere Wert genommen.

2.4 Molekularbiologische Untersuchungen

2.4.1 DNA-Aufbereitung

Für die DNA-Aufbereitung wurden zunächst die Leerschnitte 3x8min in Xylol und 3x8min in Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde das Tumoreal, welches zuvor mittels Lichtmikroskopie im HE-Schnitt ermittelt und eingezeichnet wurde, mit einem wasserfesten Stift auf die entparaffinierten Schnitte übertragen. Die Dissektion der Gewebeproben fand mit einer Skalpellklinge statt. Diese wurden in ein 2ml Tube mit 20µl Proteinase K und 180µl ATE Puffer, beides enthalten im QIAGEN QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit, überführt. Anschließend wurden die in Puffer gelösten Gewebeproben im Eppendorf ThermoMixer® comfort bei 56°C und 400r/min eine Stunde temperiert. Um die DNA zu isolieren wurde nun der QIACube mit den Puffern des QIAGEN QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit nach Protokoll beladen. Die fertigen DNA-Proben konnten für die PCR verwendet werden.

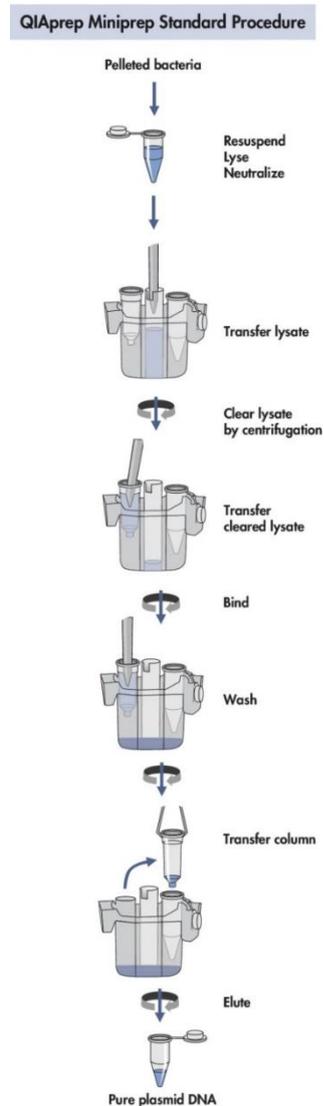


Abbildung 16: DNA-Isolierung [168]

2.4.2 PCR

Die Polymerase- Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction= PCR) dient der Vermehrung, Amplifikation, eines bestimmten DNA-Abschnittes. Somit wurde der DNA- Bereich aus den bisher geringen Mengen gewonnener DNA, amplifiziert, der für die spätere Mutationsanalyse mittels Pyrosequenzierung benötigt wurde.

Ein PCR- Ansatz (40µl) enthielt:

- 30,80µl H₂O
- 4,00µl 10xbuffer (Thermo Scientific Buffer Hot Start)
- 2,40µl MgCl₂ (25mM)
- 0,80µl dNTPs
- 0,80µl PrimerMix (20µM)
- 0,20µl Taq-Polymerase (5U/µl)
- 1,00µl DNA

FOX L2	Name	Sequenz
Primer	A3283 FOX L-2-F2	5'-aac ctc agc ctc aac gag tgc-3'
Primer	A3284 FOX L-2-R6~Bio	5'-gtt gcc ctt ctc gaa cat gtc-3'

Tabelle 6: Amplifikations-Primer

Die PCR umfasst folgende Schritte:

Vor Beginn der eigentlichen PCR, wird der PCR-Mix für 15min auf 95°C erhitzt, um die Taq Polymerase zu aktivieren. Im ersten Schritt wird die DNA für 30 Sekunden auf 95°C erhitzt, wodurch die Doppelstränge getrennt werden (Denaturierung). Im nächsten Schritt wird der Mix auf 60°C abgekühlt, 30 Sekunden, damit sich die Primer an die getrennten Stränge anlagern können (Annealing). Die Taq Polymerase beginnt nun die Replikation. Dafür werden Magnesium-Ionen und freie Nukleotide (dNTPs) benötigt. Im dritten Schritt wird das Gemisch nun wieder auf 72°C (30sec) erhitzt, dies ist die optimale Temperatur für die Polymerase. Die DNA- Stränge werden nun komplementiert und verlängert (Extension). Alle drei Schritte, Denaturierung- Annealing- Extension, werden in 50 Zyklen wiederholt. Anschließend erfolgt eine abschließende Extension bei 72°C für zwei Minuten und die Abkühlung des Gemisches auf 20°C.

Da die PCR großen Temperaturschwankungen unterliegt, benötigt man eine hitzestabile Polymerase, in diesem Fall wurde die Thermo Scientific Maxima® Hot Start Taq DNA-Polymerase verwendet. Für den korrekten Ablauf der PCR wird ein Thermocycler, der VAPO.Protect Mastercycler® pro, von Eppendorf verwendet.

Bei der PCR wurden auch Positivkontrollen, Human Genomic DNA:Male von PROMEGA, und Negativkontrollen, Mix ohne DNA, durchgeführt.

2.4.3 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle, ob die PCR erfolgreich gelaufen ist, erfolgte eine Gelelektrophorese. Zunächst wurde das Gel hergestellt. Hierfür wurden 2g Agarose mit 100ml TBE-Puffer in einem Glaskolben gemischt, in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und schwenkend unter kaltem

Wasser abgekühlt. Anschließend wurden 5µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gemisch in einen Gelträger gegossen. Ethidiumbromid ist eine DNA bindende Substanz und kann diese durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar machen. Im erkaltenden Gel befanden sich Gelelektrophoresekämme, die nach Herausziehen, die Taschen für die Probenbeladung bildeten. Das erkaltete Gel wurde in die mit TBE- Puffer gefüllte Gelkammer übertragen. Den DNA- Proben (je 5µl) wurde 1µl Thermo Scientific 6xDNA Loading Dye zur besseren Sichtbarkeit hinzugefügt. Das Gemisch wurde nun in die Taschen hinein pipettiert, parallel wurde zum Größenvergleich der Gene Ruler Low Range Ladder (Thermo Scientific) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 120V und eine Stromstärke von 400A angelegt und das Gel für ca. 25min laufen gelassen. Mittels Imager konnte das Gel sichtbar gemacht und fotografiert werden.

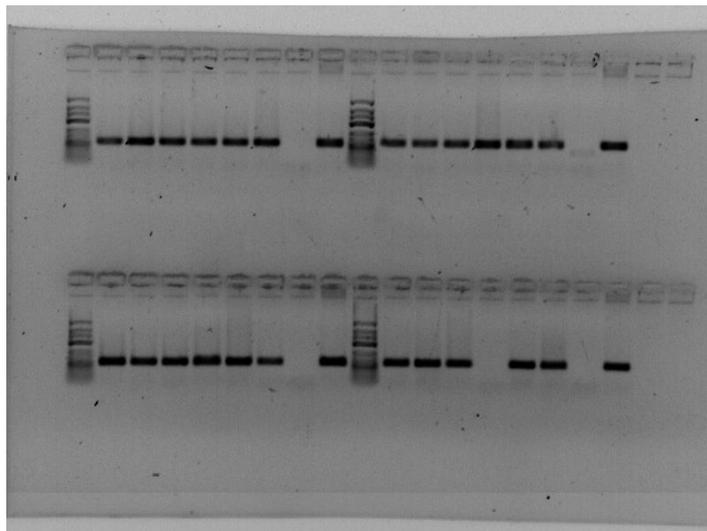


Abbildung 17: PCR-Produkte

2.4.4 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ist eine Methode zur Bestimmung der Basenabfolge eines DNA-Stranges. Untersucht wurden hier, die vorher mittels PCR amplifizierte DNA. Die Pyrosequenzierung erfolgte automatisiert mittels PyroMark Q24 Advanced von QIAGEN. Das Prinzip ist dabei eine enzymatische Lichtreaktion, die mittels Kamera detektiert wird. Dies erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst wird der DNA-Strang denaturiert und anschließend mit dem Primer hybridisiert, daran werden mittels DNA- Polymerase dNTPs angefügt. Bei Einbau eines Nukleotids wird Pyrophosphat (PPi) frei, welches durch ATP-Sulfurylase zu Adenosintriphosphat (ATP) umgesetzt wird. Durch ATP reagiert Luziferin zu Oxyluziferin, bei dieser Reaktion entsteht ein Lichtsignal, welches proportional zur ATP Menge ist und somit auch proportional zur Menge der eingebauten Nukleotide. Mittels dieser Peaks kann man später im Pyrogram die Basenabfolge ablesen [75].

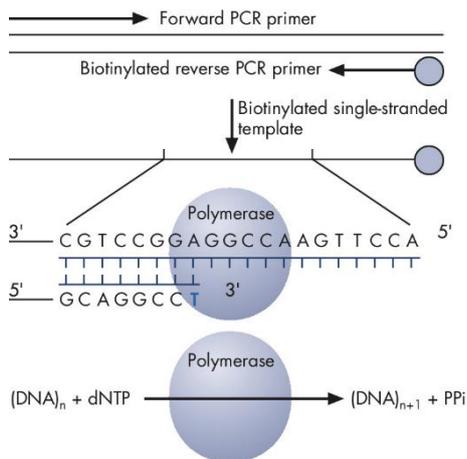
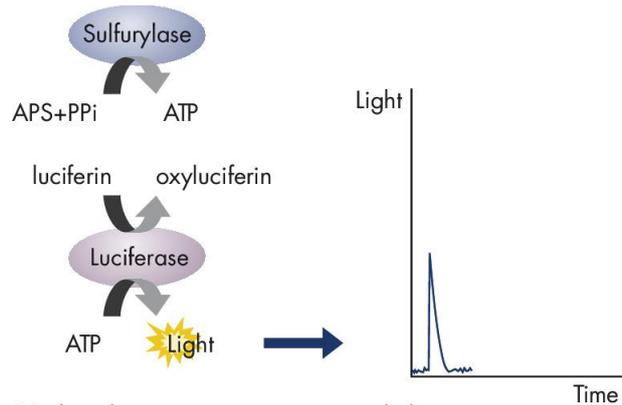


Abbildung 18: Einbau der dNTPs [75]



Nucleotide incorporation generates light seen as a peak in the Pyrogram trace

Abbildung 19: Luziferase katalysierte Reaktion [75]

Zu Beginn wurde am Computer mithilfe der Software Pyromark Q24 ein Run kreiert. Dazu wurde die Anzahl der Proben, bis zu 24, ausgewählt und benannt. Anschließend wurde der vorbereitete Run auf einem USB-Stick gespeichert. Das bei jedem einzelnen Run benötigte Volumen für Enzym, Substrat und Nukleotide wurde durch die Software berechnet. Für die Durchführung wurden zunächst folgende Ansätze nach Anleitung pipettiert, dabei enthielt ein Ansatz folgendes:

Mastermix: PCR-Produkte – Beads (Streptavidin Sepharose High Performance) (80µl):

- 1,0µl Beads
- 40,0µl Binding Buffer
- 15,0µl PCR-Produkt
- 24,0µl Wasser

Primer-Mix:

- 2,5µl Primer
- 22,5µl Annealing Buffer

FOX L2	Name	Sequenz
Primer	A3285 FOX L-2-S4	5'-cgc tgg acc cgg cct g-3'

Tabelle 7: Sequenzierungs-Primer

Der Mastermix mit enthaltenem PCR-Produkt wurde in die PCR-Platte pipettiert und 10min auf dem Monoshaker inkubiert. Hierbei wird die DNA aus der PCR an die Sepharose-Beads gekoppelt. Währenddessen wurden Enzym und Substrat aufgetaut und die Nukleotide aus dem Kühlschrank geholt. Die Waschstation wurde befüllt und mit Aquadest gespült. Die Primer-Platte wurde platziert und mit 25µl Primer pro Well befüllt. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde der Mastermix mittels „Vakuum Prep Tools“ (Saugkopf) aufgesaugt und nach durchlaufen der Waschstraße danach dem Primer-Mix hinzugefügt. Die Platte wurde 2 Minuten bei 80°C inkubiert und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt.

Währenddessen wurde die Cartridge (Kartusche) mit Enzym, Substrat und den Nukleotiden gemäß den von der Software angegebenen Volumina befüllt und in den Pyrosequenzer eingesetzt. Auch die Wellplatte wurde eingesetzt. Die Analyse wurde gestartet.

2.4.5 Auswertung Pyrosequenzierung

Während eines Sequenzierungslaufes wurden, die sich ergebenden Daten auf einem USB-Stick gespeichert. Diese wurden mittels der zum System gehörenden Software (PyroMark Q24 Analysis Software) in Pyrogramme umgewandelt. Anhand der Signalpeaks konnte nun für jeden Fall ausgewertet werden, ob es sich um eine Punktmutation oder um den Wildtyp des sequenzierten DNA- Abschnittes handelt.

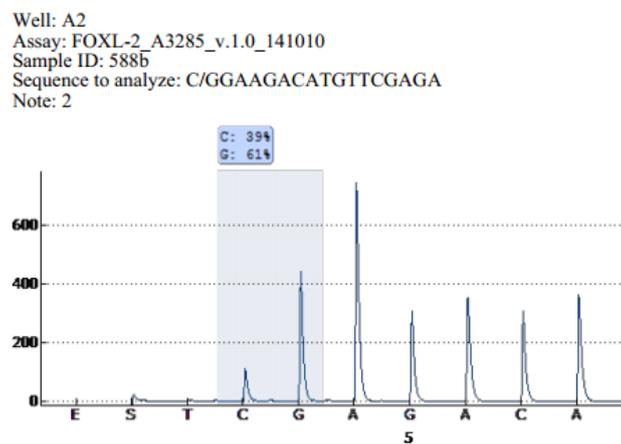


Abbildung 20: 402C>G Punktmutation

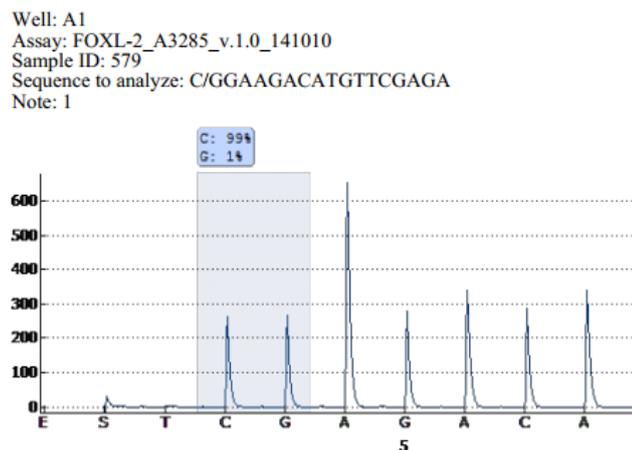


Abbildung 21: Wildtyp

2.4.6 NanoString nCounter® PanCancer Pathways Panel

Mit dem nCounter® PanCancer Pathways Panel kann man 770 Gene und 13 verschiedene Signalwege, die bei der Entstehung von Krebs von Bedeutung sind, untersuchen. Folgende Signalwege werden untersucht: Wnt, Hedgehog, Apoptose, Zellzyklus, RAS, PI3K, STAT, MAPK, Notch, TGF- β , Chromatin Modification, Transcriptional Regulation, DNA-Damage Control [72]. Die Analyse erfolgt automatisiert und mittels einer neuartigen Technologie, die auf einem farbkodierten Barcode beruht. Der Farbcode beinhaltet 6 Positionen, von denen jede eine von 4 Farben (rot, gelb, grün, blau) sein kann. Jeder Barcode gehört zu einer einzigen RNA-Sonde, welche wiederum einem Gen zugeordnet ist. Für diese Methode ist keine Amplifikation notwendig und es genügen 100ng RNA. Für die Analyse verwendet NanoString zwei 50Basen Sonden pro mRNA, die in einer Lösung mit dieser hybridisieren. Die „Reporter“-Sonde, welche den Farbcode am 5'-Ende trägt und die „Capture“-Sonde, welche am 3'-Ende Biotin trägt um den fertigen Sondenkomplex in der Cartridge zu fixieren und somit die digitale Auswertung zu erleichtern. In der nCounter Prep Station werden anschließend die überschüssigen Sonden entfernt und die Zielkomplexe in der Cartridge fixiert. Die Farbcodes zeigen zur Oberfläche. Im nCounter DataAnalyzer werden die verschiedenen Farbcodes gezählt und sortiert [69, 76].

2.4.6.1 Patientenkollektiv

Die NanoString-Analyse erfolgte an 12 zufällig ausgewählten Tumoren des Gesamtkollektivs. Es wurden hierfür fünf Fälle AGCTs ohne Mutation, fünf Fälle AGCTs mit FOXL2 Mutation und zwei Fälle JGCTs ausgewählt.

Tumortyp	Fälle
Adulter Granulosazelltumor ohne Mutationen	1011
	562
	579
	GCT4
	GCT7
Adulter Granulosazelltumor mit FOXL2 Mutationen	563
	1005
	594
	598
	1007
Juveniler Granuloserzelltumor	1004
	592

Tabelle 8: Patientenkollektiv NanoString

2.4.6.2 RNA Isolation

Um diese Analyse durchzuführen, wurde zunächst die RNA der ausgewählten Fälle aus den FFPE- Schnitten isoliert. Zunächst wurde die RNA aus den jeweiligen Leerschnitten à 10µm durch folgende Schritte isoliert. Für die Entparaffinierung wurden die Leerschnitte 2x2min in D-Limonen und 1x2min in Ethanol inkubiert und 5min luftgetrocknet. Anschließend wurde das Tumorareal (s.o.) mit einem wasserfesten Stift auf die entparaffinierten Schnitte übertragen.

Pro Objektträger wurde ein Master Mix in einem 2ml Tube mit je 100µl Tissue- Lysis-Buffer, 16µl 10%SDS und 120µl Proteinase K vorbereitet.

Vor dem Auskratzen des Tumorgewebes, wurde der jeweilige Leerschnitt kurz in Glycerin 3% getaucht und das überschüssige Glycerin abgetupft. Das abgekratzte Tumorgewebe wurde nun in das mit dem Master Mix vorbereitete Tube überführt, anschließend in einem Vortexmischer geschüttelt und über die Nacht (12-24h) bei 55°C im Thermomixer verdaut. Am nächsten Tag wurden nochmals 20µl Proteinase K hinzugegeben und der Mix bei 55°C 60min inkubiert, um das restliche Gewebe zu lysieren.

Bei einer Temperatur von 80°C für 15min wurde die Proteinase K inaktiviert.

Es wurde ein Paraffin Binding Buffer (PBB)- Mix (325µl PBB und 325µl Ethanol 100%) und eine DNase Arbeitslösung (90µl DNase Incubation Buffer (DIB) und 10µl DNase I) hergestellt. Der PBB- Mix wurde mittels Pipette gemischt und in der Tischzentrifuge zentrifugiert.

Um die im Lysat enthaltene RNA zu isolieren, wurde dieses nun von allen Proben nun je in ein Glasfasersäulchen überführt und 30sec bei 6000g und 2min bei 16000g zentrifugiert. Nach beiden Schritten wurde die Säule in ein neues Collection Tube gestellt, um den Durchfluss zu entsorgen. Durch diesen Schritt wird die RNA an die Membran der Säulchen gebunden. Zur Entfernung der DNA wurden 100µl DNase Arbeitslösung hinzugegeben und 15min bei Raumtemperatur inkubiert.

Als nächstes folgte das Waschen der Membran durch Zugabe von 500µl Wash-Buffer I, Zentrifugierung (30sec bei 6000g) und Entsorgung des Durchflusses. Der gleiche Schritt erfolgte zweimal mit 500µl Wash- Buffer II. Alle Proben wurden 2min bei 16000g zentrifugiert, der Durchfluss entsorgt und alle Säulen nun in ein 1,5ml Tube gestellt.

Der letzte Schritt diente der Elution der RNA von der Membran. Hierfür wurden 30µl *Elution Buffer* zu den Proben gegeben, 1min bei Raumtemperatur inkubiert und 1min bei 6000g zentrifugiert. Die Säulchen wurden entfernt und die Proben erneut 1min bei 16000g zentrifugiert um die residualen Glasfasern zu entfernen. Der Überstand wurde nun abpipettiert und in ein neues 1,5ml Tube überführt.

Von der fertigen Probe wurde dann die RNA-Konzentration mittels Extinktion ermittelt, die gemessen bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm, einen Quotienten um 2,00 ergeben sollte. Die ermittelte RNA- Konzentration wurde so verdünnt, dass sich eine Konzentration von 20ng/µl ergab.

2.4.6.3 Durchführung der NanoString-Analyse

Für die NanoString-Analyse sind 3 Schritte notwendig:

1. Hybridisierung: In einem 12Tube RNA-Stripe werden pro Tube pipettiert:

- 10µl Reporter Code Set
- 10µl Hybridisation Buffer
- 5µl RNA (20ng/µl)
- 5µl Capture Probe Set

Der Mix wird gemischt und bei 65°C im Thermocycler für 12h (max.30°) hybridisiert.

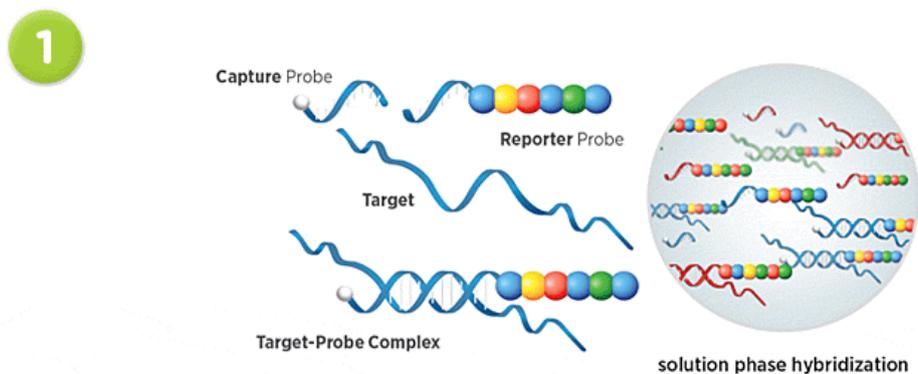


Abbildung 22: NanoString: Hybridisierung [69]

2. Reinigung und Immobilisierung: In der nCounter Prep Station werden überschüssige Sonden entfernt und die Sonden-/Ziel-Komplexe aufgereiht und in der nCounter Cartridge immobilisiert.

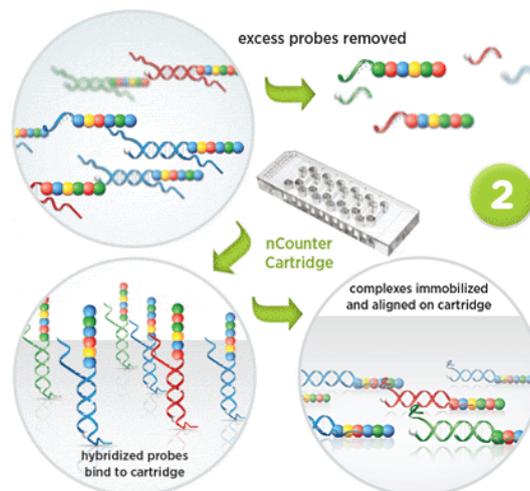


Abbildung 23: NanoString: Reinigung und Immobilisierung [69]

3. Zählung:

Im nCounter Digital Analyzer werden die verschiedenen Barcodes den Genen zugeordnet und gezählt.

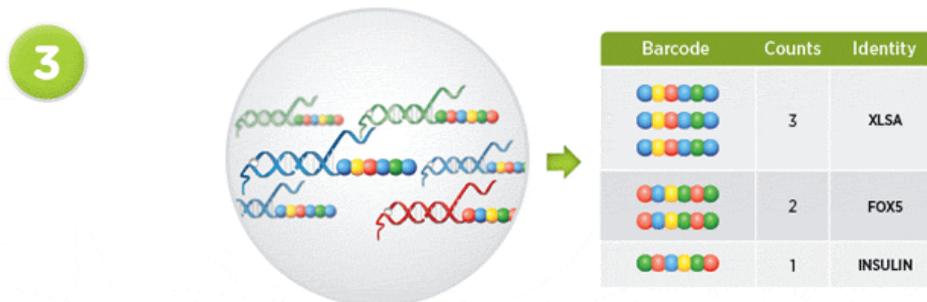


Abbildung 24: NanoString: Zählung [69]

2.4.6.3 Auswertung

Die Zählung der verschiedenen Gene erfolgte automatisch am nCounter® DataAnalyzer. Die Auswertung der nCounter® Rohdaten erfolgte dann mittels der nSolver® Analyse-Software. Dazu wurden zunächst die Rohdaten importiert und der Hintergrund abgezogen. Außerdem wurde mittels der Housekeeping Gene eine Normalisierung durchgeführt. Abschließend wurde noch der t-Test angewandt. Bei allen Proben wurden die verschiedenen exprimierten Gene gezählt. Und jeweils mutierte adulte mit juvenilen Granulosazelltumoren (Gruppe 1), mutierte adulte mit nicht mutierten adulten Granulosazelltumoren (Gruppe 2) und nicht mutierte adulte mit juvenilen Granulosazelltumoren (Gruppe 3) verglichen. Dabei wurden nur Gene betrachtet, die eine Signifikanz von $p < 0,05$ hatten. Es wurde analysiert, welche Gene in allen drei Vergleichen vorkamen, welche Gene eine besonders hohe Fold Change hatten und welchem Signalweg diese Gene angehören.

Beim Vergleich adulter Granulosazelltumoren mit Mutation im FOXL2 Gen mit juvenilen Granulosazelltumoren war die Fold Change positiv, wenn die Genexpression im Gewebe der im FOXL2 Gen mutierten adulten Granulosazelltumoren größer war und negativ, wenn sie in diesen vermindert exprimiert war. Beim Vergleich adulter Granulosazelltumoren mit Mutation mit adulten Granulosazelltumoren ohne Mutation war die Fold Change positiv, wenn das jeweilige Gen im Gewebe der im FOXL2 Gen mutierten adulten Granulosazelltumoren vermehrt exprimiert war und negativ, wenn es in diesen weniger exprimiert war. Beim Vergleich der im FOXL2 Gen nicht mutierten adulten Granulosazelltumoren mit juvenilen Granulosazelltumoren war die Fold Change positiv, wenn die Genexpression im Gewebe der adulten GCTs ohne Mutation größer war und negativ, wenn sie vermindert war. Zur Auswertung wurden mit den erhobenen Daten verschiedenen Vergleiche durchgeführt. Zunächst wurde verglichen wie viele Gene in den verschiedenen Gegenüberstellungen übereingestimmt haben. Außerdem wurde analysiert welche Gene in allen drei Vergleichen vorkamen. Anschließend wurden Gene mit einer hohen Fold Change, kleiner -5 oder größer 5, sowie mit einer kleinen Fold Change, größer -1,5 oder kleiner 1,5, rausgesucht.

Gruppe	Vergleichsgruppe
1	Mutierte adulte GCTs vs. juvenile GCTs
2	Mutierte adulte GCTs vs. nicht mutierte adulte GCTs
3	Nicht mutierte adulte GCTs vs. juvenile GCTs

Tabelle 9: Vergleichsgruppen NanoString

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Auswertbarkeit der IHC

Bei zwei Fällen erfolgte die Auswertung der IHC an Schnitten des Originalblocks, da von diesen Fällen für den TMA-Block fälschlicherweise Gewebestücken an einem Areal ohne Tumorgewebe entnommen wurden.

59 Fälle wurden anhand der TMA's ausgewertet wurden und 2 anhand von Präparatschnitten. Hiervon waren in der ER-Färbung 100% (61/61), in der PR-Färbung 100% (61/61), in der Inhibin-Färbung 100% (61/61) in der Ki-67-Färbung 100% (61/61) und in der FOXL2-Färbung 100% (61/61) der Fälle auswertbar. In wenigen Fällen konnte jedoch nur eine Stanze des jeweiligen Stanzpaars ausgewertet werden. In der Progesteron- und FOXL2-Färbung handelte es sich um 5,1% (3/59) Fällen, in der Östrogen- und in der Ki-67-Färbung um 1,7% (1/59) Fällen und in der Inhibin-Färbung um 3,4% (2/59) Fällen.

3.1.2 Ergebnisse der Immunhistochemie

Östrogen

	Häufigkeit		Gesamt	
	adult	juvenil	N	%
0- negativ	40	1	41	67,2
1- schwach positiv	9	2	11	18
2- mäßig positiv	4	0	4	6,6
3- stark positiv	4	1	5	8,2
Gesamt	57	4	61	100

Tabelle 10: IHC Östrogen

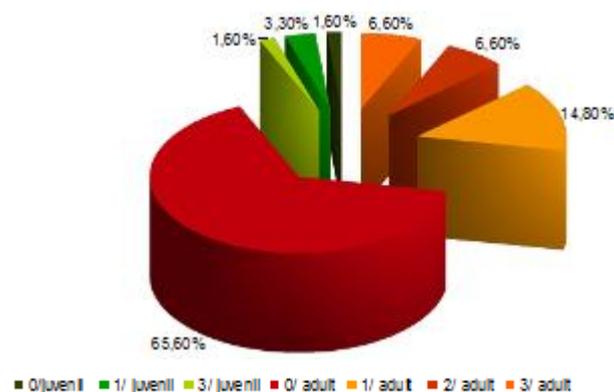


Abbildung 25: IHC Östrogen

Insgesamt waren 67,2% (41/61) der Fälle Östrogen negativ. 18,0% (11/61) waren schwach, 6,6% (4/61) mäßig und 8,2% (5/61) stark positiv. Bei den AGCTs zeigten sich 70,2% (40/57) der Fälle Östrogen negativ, 15,8% (9/57) schwach positiv, je 7% (4/57) mäßig bzw. stark positiv. Bei den JGCTs waren 25% (1/4) der Fälle Östrogen negativ, 50% (2/4) schwach positiv und 25% (1/4) stark positiv.

Progesteron

	Häufigkeit		Gesamt	
	adult	juvenil	N	%
0- negativ	8	1	9	14,8
1- schwach positiv	12	0	12	19,7
2- mäßig positiv	17	2	19	31,1
3- stark positiv	20	1	21	34,4
Gesamt	57	4	61	100

Tabelle 11: IHC Progesteron

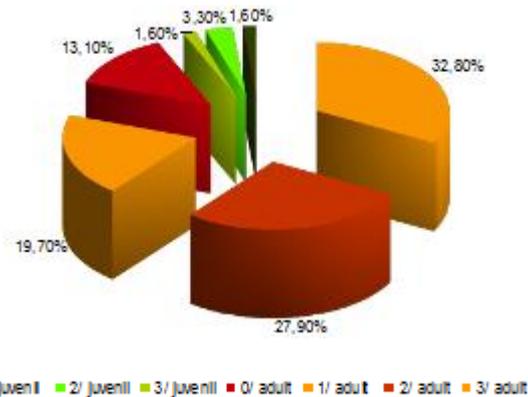


Abbildung 26: IHC Progesteron

Insgesamt waren 14,8% (9/61) der Fälle Progesteron negativ. 19,7% (12/61) waren schwach, 31,1% (19/61) mäßig und 34,4% (21/61) stark positiv. Bei den AGCTs zeigten sich 14,0% (8/57) der Fälle Progesteron negativ, 21,1% (12/57) schwach positiv, 29,8% (17/57) mäßig positiv und 35,1% (20/57) stark positiv. Bei den JGCTs waren 25% (1/4) der Fälle Progesteron negativ, 50% (2/4) mäßig positiv und 25% (1/4) stark positiv.

Inhibin

	Häufigkeit		Gesamt	
	adult	juvenil	N	%
0- negativ	14	3	17	27,9
1- schwach positiv	22	0	22	36,1
2- mäßig positiv	15	1	16	26,2
3- stark positiv	6	0	6	9,8
Gesamt	57	4	61	100

Tabelle 12: IHC Inhibin

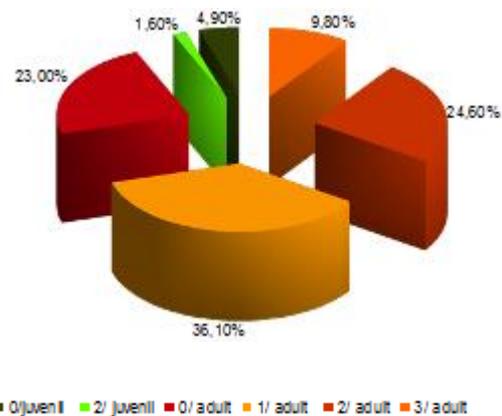


Abbildung 27: IHC Inhibin

27,9% (17/61) der Fälle waren Inhibin negativ. 36,1% (22/61) exprimierten Inhibin schwach, 26,2% (16/61) mäßig und 9,8% (6/61) stark. Bei den AGCTs waren 24,6% (14/57) der Fälle Inhibin negativ, 38,6% (22/57) schwach positiv, 26,3% (15/57) mäßig positiv und 10,5% (6/57) stark positiv. Bei den JGCTs waren 75% (3/4) der Fälle Inhibin negativ und 25% (1/4) mäßig positiv.

Ki-67

	Häufigkeit		Gesamt	
	adult	juvenil	N	%
0- <5%	19	0	19	31,1
1- 5-10%	32	3	35	57,4
2- 11-20%	6	0	6	9,8
3- >20%	0	1	1	1,6
Gesamt	57	4	61	100

Tabelle 13: IHC Ki-67

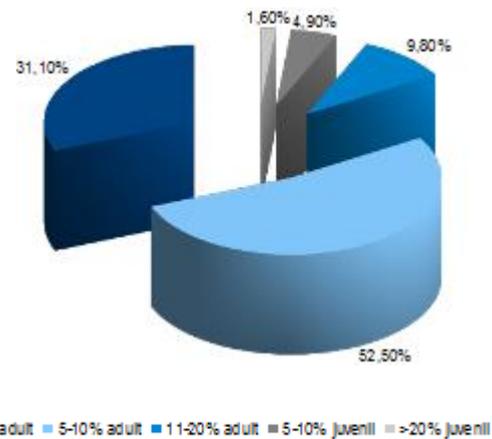


Abbildung 28: IHC Ki-67

Insgesamt war bei 31,1% (19/61) der Fälle die Ki-67-Expression <5%, bei 57,4% (35/61) war Ki-67 in 5-10% der Zellkerne exprimiert, 9,8% (6/61) hatten eine Expression zwischen 11-20% und nur 1,6% (1/61) hatten eine Expression von über 20%, hierbei handelte es sich um einen juvenilen GCT. Bei den AGCTs war bei 33,3% (19/57) der Fälle die Ki-67-Expression <5%, bei 56,1% (32/57) war Ki-67 in 5-10% der Zellkerne exprimiert und 10,5% (6/57) hatten eine Expression zwischen 11-20%. Bei den JGCTs waren alle Fälle Ki-67 positiv, 75% (3/4) hatten eine Expression zwischen 5-10% und 25% (1/4) hatten eine Expression über 20%.

FOXL-2

	Häufigkeit		Gesamt	
	adult	juvenil	N	%
0- negativ	13	1	14	23
1- schwach positiv	9	2	11	18
2- mäßig positiv	27	1	28	45,9
3- stark positiv	8	0	8	13,1
Gesamt	57	4	61	100

Tabelle 14: IHC FOXL2

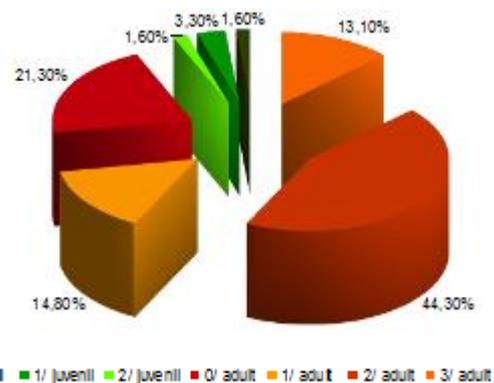


Abbildung 29: IHC FOXL2

23% (14/61) der Fälle exprimierten kein FOXL2, 18% (11/61) waren schwach positiv, 45,9% (28/61) mäßig positiv und 13,1% (8/61) stark positiv gefärbt. Bei den AGCTs waren 22,8% (13/57) der Fälle FOXL2 negativ, 15,8% (9/57) schwach positiv, 47,4% (27/57) mäßig positiv und 14,0% (8/57) stark positiv. Bei den JGCTs waren 25% (1/4) der Fälle FOXL2 negativ und 50% (2/4) schwach positiv und 25% (1/4) mäßig positiv.

3.2 Pyrosequenzierung

3.2.1 Auswertbarkeit der FOXL2- Mutationsanalyse (Pyrosequenzierung)

Von den vorliegenden 61 Gewebeproben konnten alle (100%) analysiert werden. Auch die Pyrogramme aller Proben (100%) konnten ausgewertet werden.

3.2.2 Ergebnisse der Pyrosequenzierung

In der Pyrosequenzierung wiesen insgesamt 82,0% (50/61) der Tumoren eine Punktmutation 402C>G (C134W) des FOXL 2 Gens auf. 18 % (11/61) der Tumoren waren nicht mutiert. Alle juvenilen Tumore waren nicht mutiert. Wenn man nur die adulten GCTs betrachtet, waren 87,7% (50/57) mutiert.

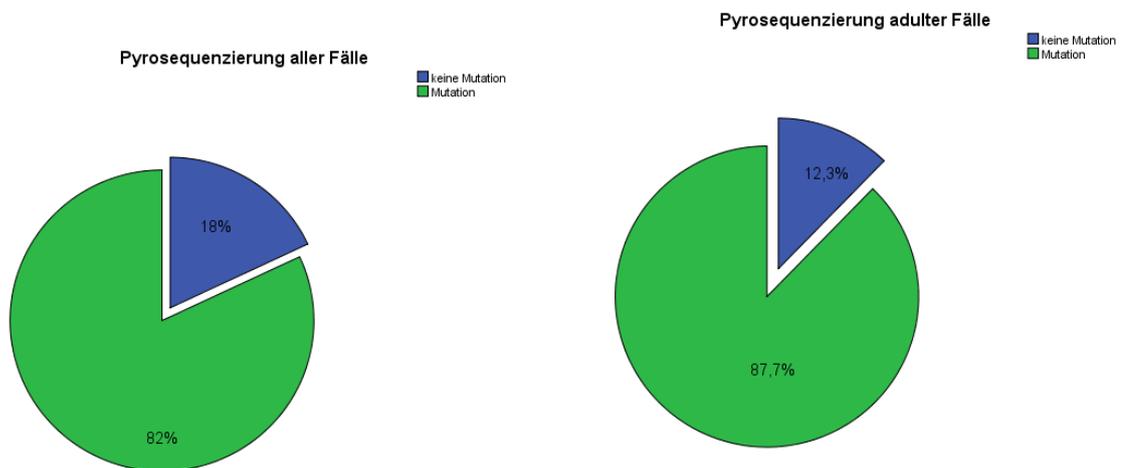


Abbildung 31: Ergebnis Pyrosequenzierung aller Fälle

Abbildung 30: Ergebnis Pyrosequenzierung AGCTs

Vergleicht man innerhalb der adulten Granulosazelltumoren die Primärtumoren mit den Rezidivtumoren, wobei pro Patientin nur ein Rezidiv gewertet wurde, kommt man zu folgenden Ergebnissen: 81,8% (27/33) der Patientinnen mit einem primären adulten Granulosazelltumor weisen eine Mutation im FOXL2 Gen auf. Patientinnen mit einem Rezidivtumor des adulten GCT hatten zu 93,3% (14/15) eine FOXL2 Mutation. Bei den untersuchten Rezidivtumoren waren die zugehörigen Primärtumoren nicht in unserer Datenbank erfasst.

Tumorart	Ergebnis Pyrosequenzierung	Häufigkeit		Prozent
				%
Primärtumor	Keine Mutation	6		18,12
	Mutation	27		81,8
	Gesamt	33		100
Rezidivtumor	Keine Mutation	1		6,7
	Mutation	14		93,3
	Gesamt	15		100

Tabelle 15: Auswertung Pyrosequenzierung

3.3 Korrelation der Mutationsanalyse mit der FOXL2- Immunhistochemie

Insgesamt waren 80% (40/50) der Fälle, die eine Mutation aufwiesen, auch in der Immunhistochemie positiv. Die Hälfte der Fälle, 50% (25/50) war dabei mäßig stark positiv. Auch die Fälle, die keine Mutation aufwiesen, waren zu 63,6% (7/11) in der Immunhistochemie positiv. Hier waren die meisten Fälle, jeweils 27,2% (3/11), schwach oder mäßig positiv. Die Korrelation war nicht signifikant ($p=0,163$).

IHC FOXL2	Mutationsanalyse				Gesamt
	Keine Mutation		Mutation		
	N	%	N	%	N
0	4	36,4	10	20	14
1	3	27,3	8	16	11
2	3	27,3	25	50	28
3	1	9	7	14	8
Gesamt	11	100	50	100	61

Tabelle 16: Vergleich IHC FOXL2 und Mutationsanalyse

Von den adulten Granulosazelltumoren waren 77,2% (44/57) in der IHC positiv. Auch hier waren die meisten Fälle mäßig positiv 47,3% (27/57). Bei den juvenilen GCTs waren 75% positiv gefärbt. Hier war kein Fall stark positiv gefärbt.

	Häufigkeit		Gesamt
	adult	juvenil	N
0- negativ	13	1	14
1- schwach positiv	9	2	11
2- mäßig positiv	27	1	28
3- stark positiv	8	0	9
Gesamt	57	4	61

Tabelle 17: FOXL2 IHC und Tumortyp

3.4 Korrelationen mit dem Tumorstadium

3.4.1 Korrelation zwischen der Mutationsanalyse und dem Tumorstadium

Bei 74,5% (38/51) Patientinnen, 94,7% (36/38) mit AGTs und 5,3% (2/38) mit JGCTs war das Tumorstadium erfasst. Davon befanden sich alle Fälle ohne Mutation im Tumorstadium 1. Die meisten, 75% (6/8) waren dabei im Tumorstadium 1a.

Die meisten Fälle mit Mutation waren im Tumorstadium 1, 76,7% (23/30). 53,3% (16/30) waren hier im Tumorstadium 1a. 6,7% (2/30) waren im Stadium 2 und 16,7% (5/30) im Stadium 3. Die Korrelation zwischen dem Tumorstadium und dem Mutationsstatus war nicht signifikant ($p=0,203$).

Tumorstadium	Keine Mutation	Mutation	Gesamt
1a	6	16	22
1b	0	1	1
1c	2	6	8
2a	0	1	1
2b	0	1	1
3a	0	2	2
3b	0	1	1
3c	0	2	2
Gesamt	8	30	38

Tabelle 18: Tumorstadium und Mutationsanalyse

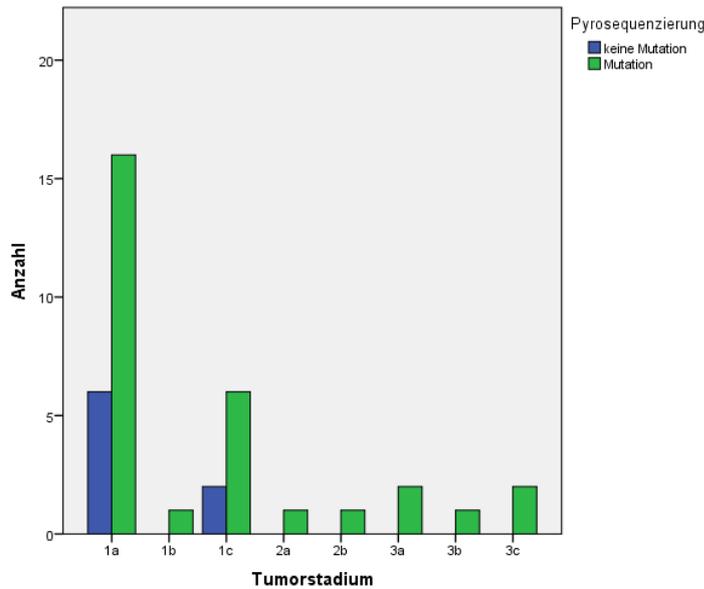


Abbildung 32: Tumorstadium und Mutationsanalyse

3.4.2 Korrelation zwischen Tumortyp und Tumorstadiums

Patientinnen, die einen Tumor vom juvenilen Typ hatten bei Diagnosestellung zu 100% (2/2) einen Tumor im Stadium 1a. Bei den juvenilen GCTs konnte nur von zwei von insgesamt vier Fällen die Korrelation zwischen Tumortyp und Tumorstadium untersucht werden, da nur bei zwei Fällen das Tumorstadium bekannt war.

Bei den Patientinnen mit einem Tumor vom adulten Typ waren 80,6% (29/36) im Tumorstadium 1, davon die meisten, 55,6% (20/36) im Tumorstadium 1a. 5,6% (2/36) waren im Tumorstadium 2 und 13,9% (5/36) im Tumorstadium 3. Es gibt keine signifikante Korrelation zwischen Tumortyp und Tumorstadium ($p=0,247$).

Tumorstadium	Adulter Typ	Juveniler Typ	Gesamt
1a	20	2	22
1b	1	0	1
1c	8	0	8
2a	1	0	1
2b	1	0	1
3a	2	0	2
3b	1	0	1
3c	2	0	2
Gesamt	36	2	38

Tabelle 19: Tumorstadium und Tumortyp

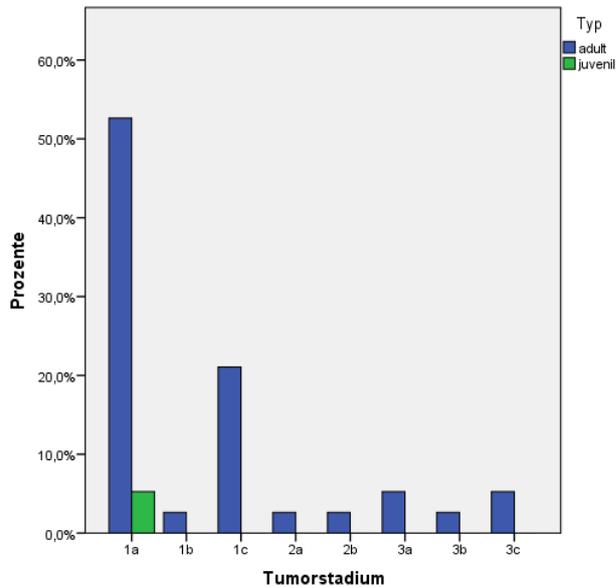


Abbildung 33: Tumorstadium und Tumortyp

3.4.3 Korrelation zwischen der Östrogen α -Expression und dem Tumorstadium

Im Tumorstadium 1a waren 63,6% (13/22) der Fälle Östrogen negativ, 18,2% (4/22) waren schwach positiv, 9,0% (2/22) mäßig positiv und 9,0% (2/22) stark positiv. Im Tumorstadium 1b waren 100% (1/1) Östrogen negativ. 87,5% (7/8) der Fälle im Tumorstadium 1c waren Östrogen negativ und 12,5% (1/8) waren schwach positiv.

Sowohl im Tumorstadium 2a als auch im Tumorstadium 2b waren je 100% (1/1) Östrogen negativ. 50% (1/2) der Fälle im Tumorstadium 3a waren Östrogen negativ und 50% (1/2) waren schwach positiv. Im Tumorstadium 3b exprimierten 100% (1/1) Östrogen schwach positiv und im Tumorstadium 3c exprimierten 100% (2/2) kein Östrogen. Zwischen der Östrogen α -Expression und dem Tumorstadium besteht keine Korrelation ($p=0,143$).

Tumorstadium	Negativ	Schwach positiv	Mäßig positiv	Stark positiv	Gesamt
1a	14	4	2	2	22
1b	1	0	0	0	1
1c	7	1	0	0	8
2a	1	0	0	0	1
2b	1	0	0	0	1
3a	1	1	0	0	2
3b	0	1	0	0	1
3c	2	0	0	0	2
Gesamt	27	7	2	2	38

Tabelle 20: Tumorstadium und ER α -Expression

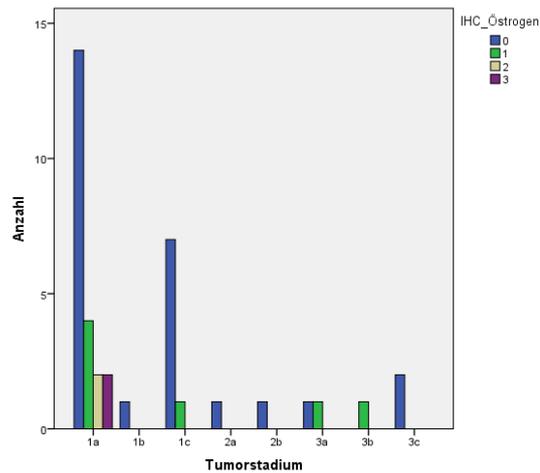


Abbildung 34: Tumorstadium und ERα-Expression

3.4.4 Korrelation zwischen der Progesteronexpression und dem Tumorstadium

Im Tumorstadium 1 waren 80,6% (25/31) der Fälle Progesteron positiv. Im Tumorstadium 1a waren 18,2% (4/22) der Fälle Progesteron negativ, 9,0% (2/22) waren schwach positiv, 45,5% (10/22) mäßig positiv und 27,3% (6/22) stark positiv. Im Tumorstadium 1b exprimierten 100% (1/1) Progesteron schwach. 25% (2/8) der Fälle im Tumorstadium 1c waren Progesteron negativ, je 12,5% (1/8) waren schwach positiv bzw. mäßig positiv und 50% (4/8) exprimierten Progesteron stark.

In den Tumorstadien 2 und 3 wurde immer Progesteron exprimiert.

Im Tumorstadium 2a war die Expression zu 100% (1/1) schwach positiv und im Stadium 2b zu 100% (1/1) mäßig positiv. 50% (1/2) der Fälle im Tumorstadium 3a und auch im Stadium 3c waren mäßig positiv und 50% (1/2) waren stark positiv. Im Tumorstadium 3b war Progesteron zu 100% (1/1) mäßig positiv. Zwischen der Progesteronexpression und dem Tumorstadium besteht keine Korrelation ($p=0,514$).

Tumorstadium	Negativ	Schwach positiv	Mäßig positiv	Stark positiv	Gesamt
1a	4	2	10	6	22
1b	0	1	0	0	1
1c	2	1	1	4	8
2a	0	1	0	0	1
2b	0	0	1	0	1
3a	0	0	1	1	2
3b	0	0	1	0	1
3c	0	0	1	1	2
Gesamt	6	5	15	12	38

Tabelle 21: Tumorstadium und Progesteronexpression

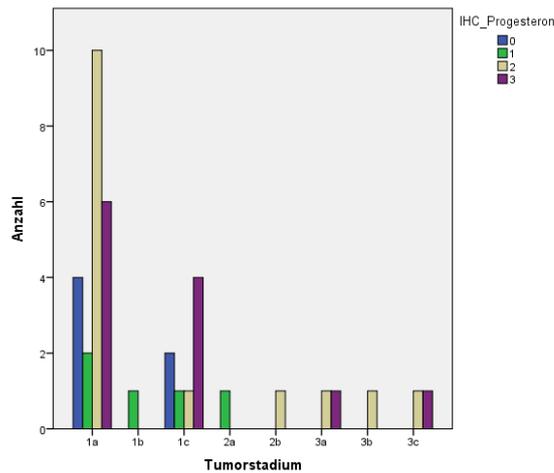


Abbildung 35: Tumorstadium und Progesteronexpression

3.4.5 Korrelation zwischen der Inhibinexpression und dem Tumorstadium

Eine starke Inhibinexpression kam nur im Tumorstadium 1 vor.

Im Tumorstadium 1a waren 18,2% (4/22) der Fälle Inhibin negativ, 40,9% (9/22) waren schwach positiv, 31,8% (7/22) mäßig positiv und 9,1% (2/22) stark positiv. Im Tumorstadium 1b exprimierten 100% (1/1) Inhibin mäßig. 12,5% (1/8) der Fälle im Tumorstadium 1c waren Inhibin negativ, 37,5% (3/8) waren schwach positiv und je 25% (2/8) mäßig positiv bzw. stark positiv.

Im Tumorstadium 3 gab es keine starke Inhibinexpression. Im Stadium 3a 50% (1/2) der Fälle Inhibin negativ und 50% (1/2) exprimierten Inhibin schwach. Im Tumorstadium 3b war Inhibin zu 100% (1/1) negativ. Im Tumorstadium 3c waren je 50% (1/2) der Fälle negativ bzw. mäßig positiv. Zwischen der Inhibinexpression und dem Tumorstadium besteht keine Korrelation ($p=0,368$).

Tumorstadium	Negativ	Schwach positiv	Mäßig positiv	Stark positiv	Gesamt
1a	4	9	7	2	22
1b	0	0	1	0	1
1c	1	3	2	2	8
2a	0	1	0	0	1
2b	0	1	0	0	1
3a	1	1	0	0	2
3b	1	0	0	0	1
3c	1	0	1	0	2
Gesamt	8	15	11	4	38

Tabelle 22: Tumorstadium und Inhibin-Expression

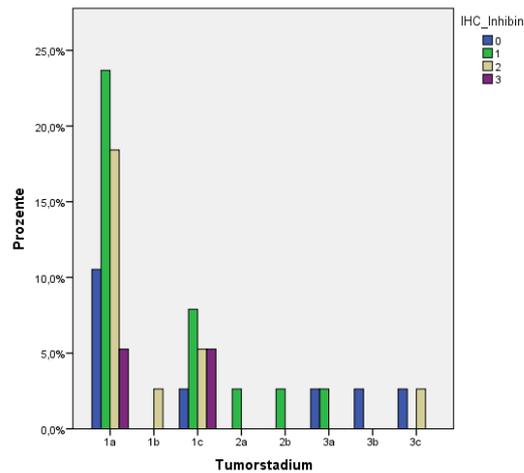


Abbildung 36: Tumorstadium und Inhibin-Expression

3.4.6 Korrelation zwischen der Ki-67-Expression und dem Tumorstadium

Im Tumorstadium 1a war in 45,5% (10/22) der Fälle Ki-67 <5% und 54,5% (12/22) zwischen 5-10% exprimiert. Im Tumorstadium 1b war Ki-67 zu 100% (1/1) zwischen 5-10% exprimiert. 25% (2/8) der Fälle im Tumorstadium 1c exprimierten Ki-67 <5%, 62,5% (5/8) zwischen 5-10% und 12,5% (1/8) zwischen 10-20%.

Im Tumorstadium 2a war Ki-67 zu 100% (1/1) <5% exprimiert und im Stadium 2b zu 100% (1/1) zwischen 5-10%. Im Tumorstadium 3a zeigten 100% (2/2) eine Expression zwischen 5-10% und im Stadium 3b 100% (1/1) eine Expression zwischen 10-20%. Im Stadium 3c war in 50% (1/2) der Fälle die Expression <5% und in 50% (1/2) zwischen 5-10%. Zwischen der Ki-67-Expression und dem Tumorstadium besteht keine Korrelation ($p=0,126$).

Tumorstadium	<5%	5-10%	10-20%	Gesamt
1a	10	12	0	22
1b	0	1	0	1
1c	2	5	1	8
2a	1	0	0	1
2b	0	1	0	1
3a	0	2	0	2
3b	0	0	1	1
3c	1	1	0	2
Gesamt	14	22	2	38

Tabelle 23: Tumorstadium und Ki-67 Expression

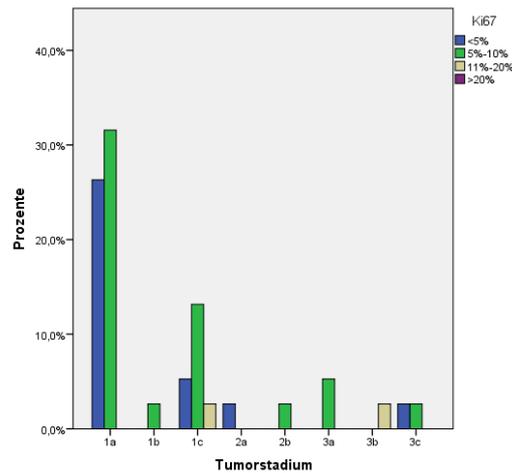


Abbildung 37: Tumorstadium und Ki-67-Expression

3.4.7 Korrelation zwischen der FOXL2-Expression und dem Tumorstadium

Im Tumorstadium 1a zeigten 22,7% (5/22) der Fälle keine FOXL2-Expression, 22,7% (5/22) waren schwach positiv, 41,0% (9/22) waren mäßig positiv und 13,6% (3/22) waren stark positiv. Im Stadium 1b war die Expression zu 100% (1/1) schwach positiv. 12,5% (1/8) der Fälle im Stadium 1c zeigten keine FOXL2-Expression, 12,5% (1/8) eine schwache Expression und 75% (6/8) eine mäßige Expression. Im Stadium 2a war die Expression zu 100% (1/1) negativ und im Stadium 2b zu 100% (1/1) schwach positiv. Je 50% (1/2) der Fälle im Stadium 3a und 3c waren FOXL2 negativ bzw. mäßig positiv. Im Stadium 3c war die FOXL2-Expression zu 100% (1/1) stark positiv. Zwischen der FOXL2-Expression und dem Tumorstadium besteht keine Korrelation ($p=0,961$).

Tumorstadium	Negativ	Schwach positiv	Mäßig positiv	Stark positiv	Gesamt
1a	5	5	9	3	22
1b	0	1	0	0	1
1c	1	1	6	0	8
2a	1	0	0	0	1
2b	0	1	0	0	1
3a	1	0	1	0	2
3b	0	0	0	1	1
3c	1	0	1	0	2
Gesamt	9	8	17	4	38

Tabelle 24: Tumorstadium und FOXL2-Expression

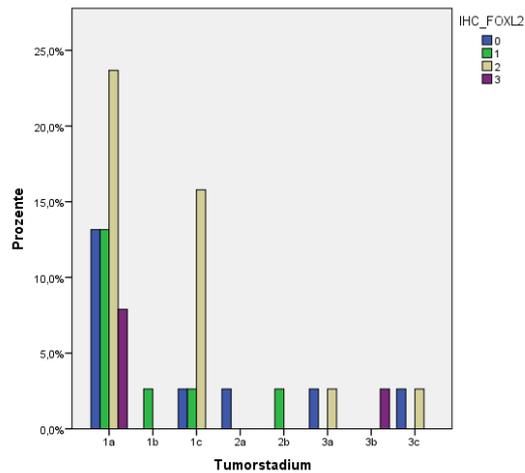


Abbildung 38: Tumorstadium und FOXL2-Expression

3.5 Überleben

10 Fälle wurden im Überleben nicht berücksichtigt, da es sich um Rezidive, von schon in der Statistik geführten Patientinnen, handelt. In 88,2% (45/51) der Fälle war der Überlebensstatus bekannt, in 11,8% (6/51) fehlte der Status. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren 44,4% (20/45) verstorben, 55,6% (25/45) lebten noch.

Das Follow-up wurde über einen Zeitraum von 0- 417 Monate erhoben.

Status	Anzahl der Fälle		
	Adulter Typ N	Juveniler Typ N	Gesamt
lebt	23	2	25
verstorben	19	1	20
Follow-up fehlt	5	1	6
Gesamt	47	4	51

Tabelle 25: Follow-up

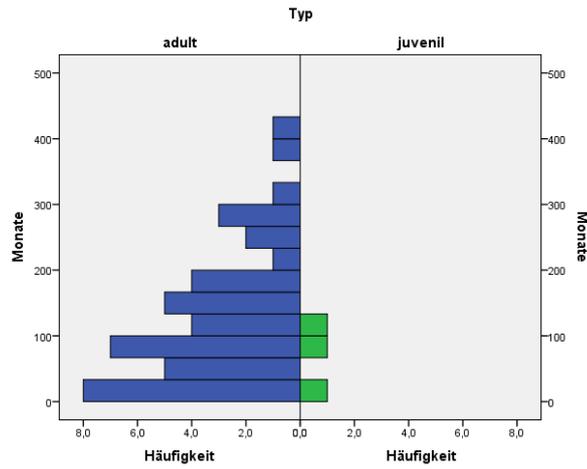


Abbildung 39: Follow-up

3.6 Korrelation zwischen der Immunhistochemie und dem Überleben

3.6.1. Östrogen α und Überleben

Die Östrogen α -Expression ergab in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier im Log-Rank-Test keine Signifikanz ($p=0,112$).

Östrogen α Expression	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	%
0	30	13	17	56,6
1	9	3	6	66,7
2	3	1	2	66,7
3	3	3	0	0
Gesamt	45	20	25	55,6

Tabelle 26: Östrogen α und Überleben

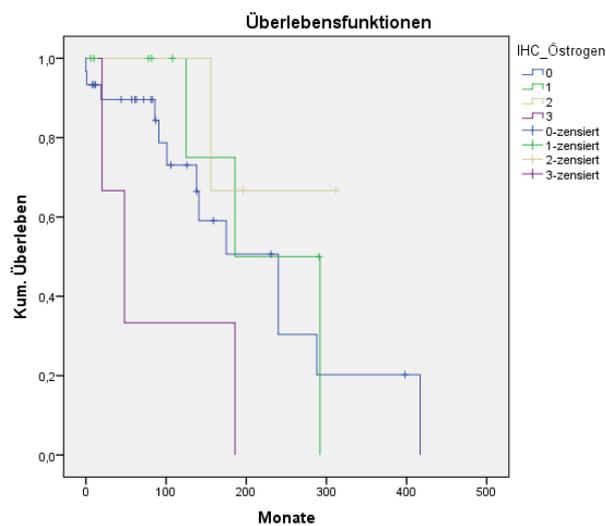


Abbildung 40: Östrogen α und Überleben

Bei 43,3 % (13/30) der Patientinnen ohne Östrogen α -Expression, 30% (3/10) mit geringer Expression, 33,3% (1/3) mit mäßiger Expression und 100% (3/3) mit starker Expression kam es zum Tod. Im Mittel überlebten Patientinnen mit mäßiger Expression am längsten. Die kürzeste Überlebenszeit zeigten im Mittel Patientinnen mit starker Östrogen α -Expression.

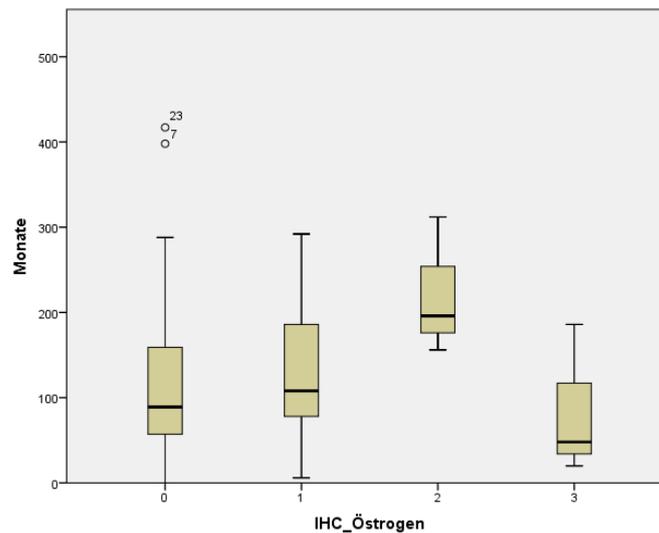


Abbildung 41: Östrogen α und Überleben

3.6.2 Progesteron und das Überleben

Die Progesteronexpression ergab in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier im Log-Rank-Test keine Signifikanz ($p=0,342$).

Progesteron Expression	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	%
0	7	2	5	71,4
1	7	4	3	42,9
2	17	6	11	64,7
3	14	8	6	42,9
Gesamt	45		25	55,6

Tabelle 27: Progesteron und Überleben

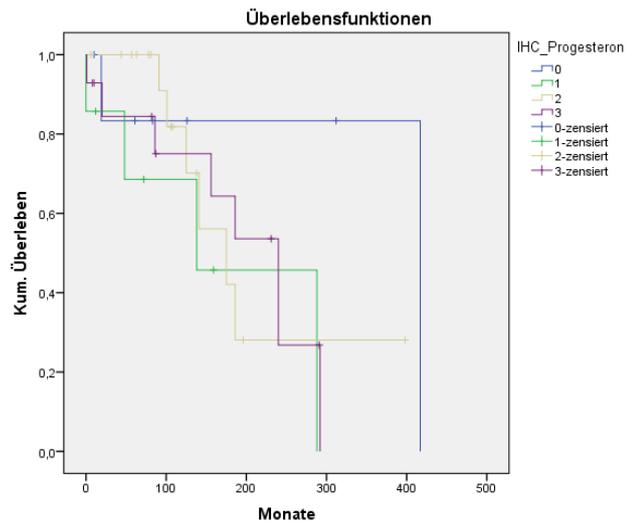


Abbildung 42: Progesteron und Überleben

Bei 28,6% (2/7) der Patientinnen ohne Progesteronexpression, 57,1% (4/7) mit geringer Expression, 35,3% (6/17) mit mäßiger Expression und 57,1% (8/14) mit starker Expression kam es zum Tod. Am längsten überlebten im Mittel Patientinnen mit starker Expression. Die kürzeste Überlebenszeit zeigten im Mittel Patientinnen mit geringer Progesteron Expression.

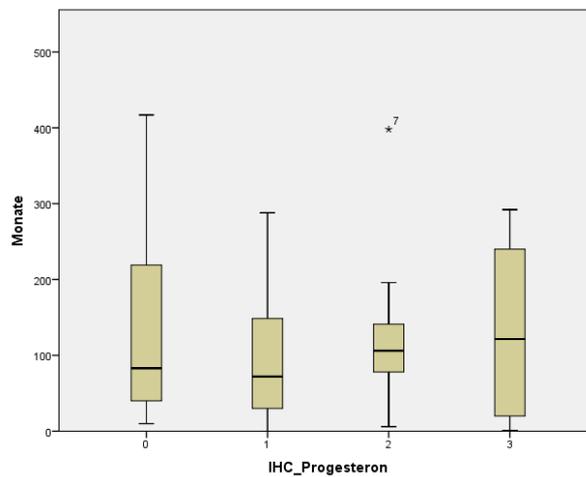


Abbildung 43: Progesteron und Überleben

3.6.3 Inhibin und Überleben

Die Inhibinexpression ergab in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier im Log-Rank-Test keine Signifikanz ($p=0,626$).

Inhibin Expression	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	%
0	14	10	4	28,6
1	16	5	11	68,8
2	9	2	7	77,8
3	6	3	3	50
Gesamt	45	20	25	55,6

Tabelle 28: Inhibin und Überleben

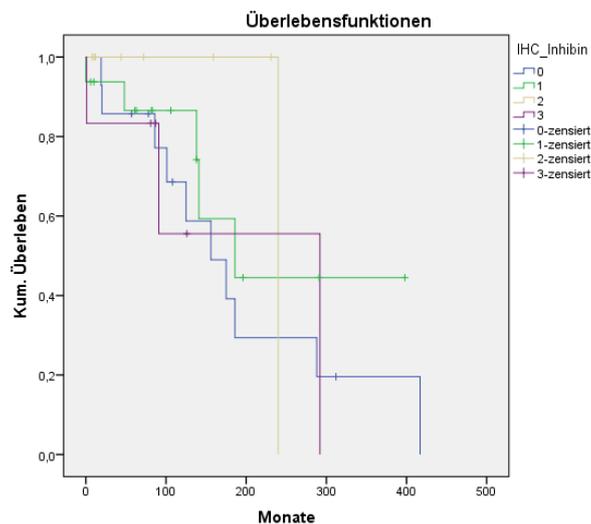


Abbildung 44: Inhibin und Überleben

Bei 71,4% (10/14) der Patientinnen ohne Inhibinexpression, 31,2% (5/16) mit geringer Expression, 22,2% (2/9) mit mäßiger Expression und 50,0% (3/6) mit starker Expression kam es zum Tod. Patientinnen ohne Expression wiesen im Mittel das längste Überleben auf. Die kürzeste Überlebenszeit zeigten im Mittel Patientinnen mit starker Inhibinexpression.

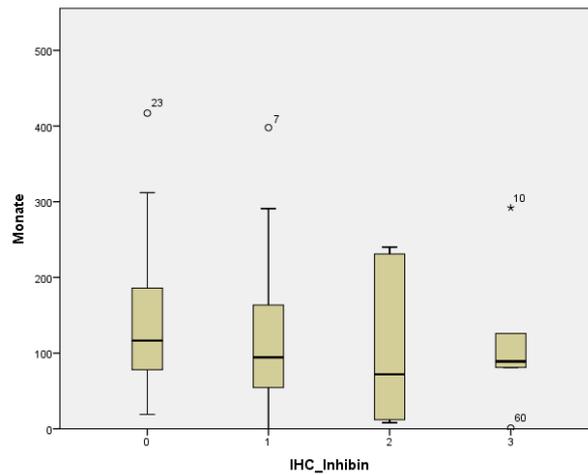


Abbildung 45: Inhibin und Überleben

3.6.4 Ki-67 und Überleben

Die Ki-67-Expression in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier im Log-Rank-Test war signifikant ($p=0,000$).

Ki-67 Expression	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	%
0	15	7	8	53,3
1	26	9	17	65,4
2	3	3	0	0
3	1	1	0	0
Gesamt	45	20	25	55,6

Tabelle 29: Ki-67 und Überleben

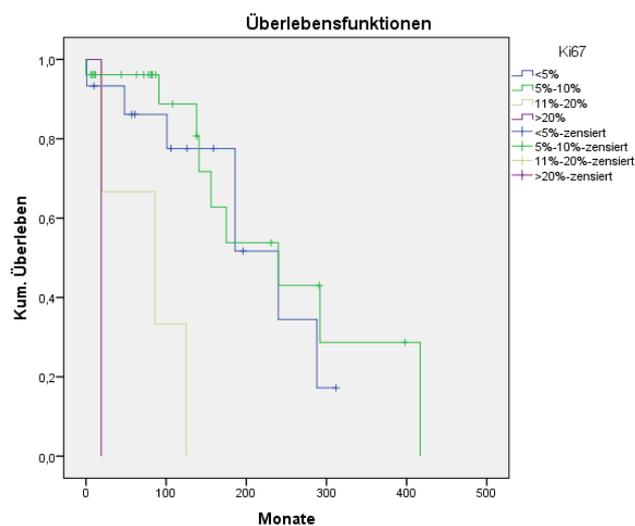


Abbildung 46: Ki-67 und Überleben

Bei 46,7% (7/15) der Patientinnen mit einer Ki-67-Expression unter 5%, 34,6% (9/26) mit einer Expression zwischen 5-10%, 100,0% (3/3) mit einer Expression zwischen 10-20% und 100,0% (1/1) mit einer Expression über 20% kam es zum Tod.

Patientinnen mit einer Expression unter 5% zeigten im Mittel das längste Überleben. Eine sehr kurze Überlebenszeit zeigte die Patientin mit einer Expression über 20% (19 Monate).

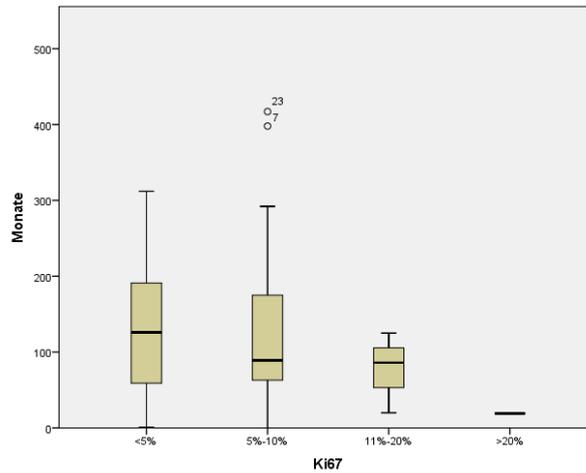


Abbildung 47: Ki-67 und Überleben

3.6.5 FOXL2 und Überleben

Die FOXL2-Expression ergab in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier im Log-Rank-Test keine Signifikanz ($p=0,344$).

FOXL2 Expression	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	%
0	11	8	3	27,3
1	10	3	7	70
2	21	8	13	61,9
3	3	1	3	66,7
Gesamt	45	20	25	55,6

Tabelle 30: FOXL2 und Überleben

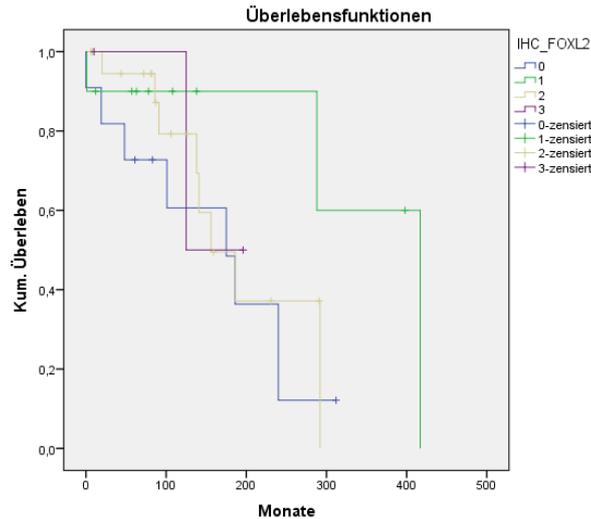


Abbildung 48: FOXL2 und Überleben

Bei 72,7% (8/11) der Patientinnen ohne FOXL2-Expression, 34,6% (9/26) mit geringer Expression, 38,1% (8/21) mit mäßiger Expression und 23,3% (1/3) mit starker Expression kam es zum Tod. Patientinnen mit starker FOXL2-Expression zeigten im Mittel das längste Überleben. Die kürzeste Überlebenszeit zeigten im Mittel Patientinnen mit mäßiger Expression.

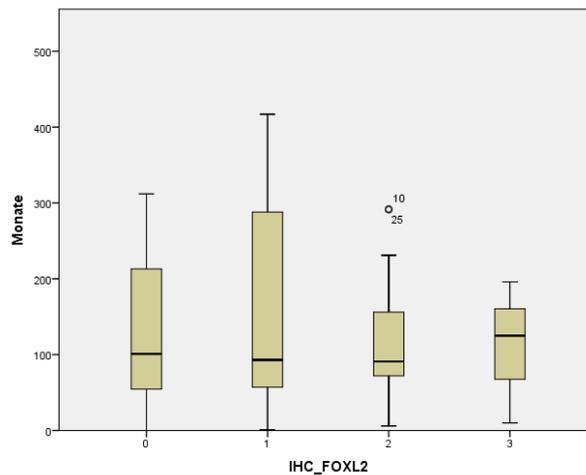


Abbildung 49: FOXL2 und Überleben

3.7 Korrelation zwischen der Mutationsanalyse und dem Überleben

Die Mutationsanalyse ergab in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier im Log-Rank Test keine Signifikanz ($p=0,293$).

Pyrosequenzierung	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	%
Keine Mutation	9	3	6	66,7
Mutation	36	17	19	52,8
Gesamt	45	20	25	55,6

Tabelle 31: Mutationsanalyse und Überleben

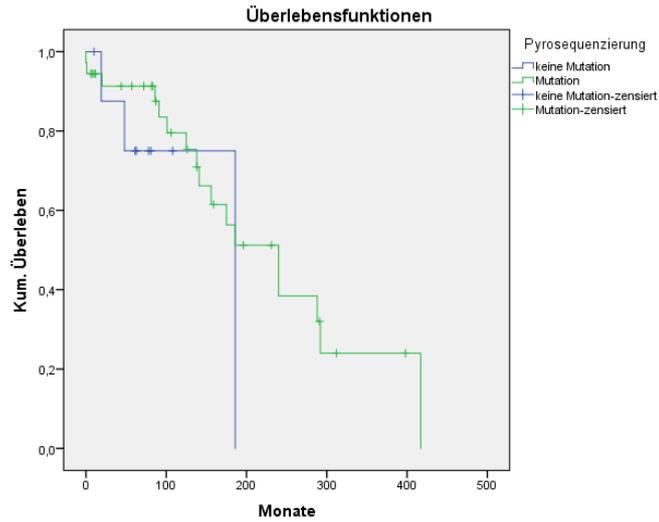


Abbildung 50: Mutationsanalyse und Überleben

33,3% (3/9) der Patientinnen ohne FOXL2-Mutation und 47,2% (17/36) der Patientinnen mit FOXL2-Mutation verstarben. Patientinnen mit FOXL2-Mutation zeigten im Mittel ein längeres Überleben.

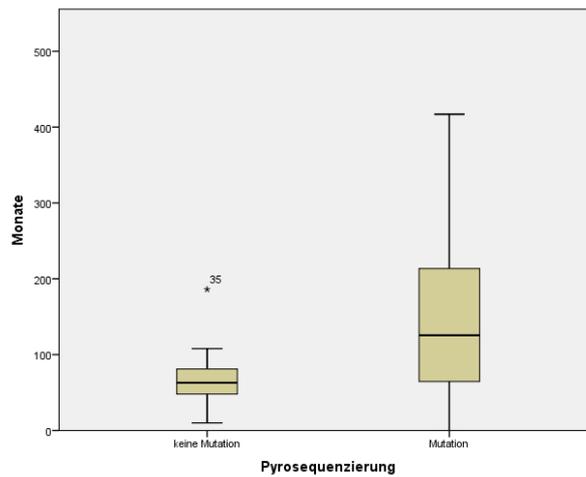


Abbildung 51: Mutationsanalyse und Überleben

3.8 Nanostring

Bei der Auswertung der Nanostring wurden jeweils mutierte adulte mit juvenilen Granulosazelltumoren (Gruppe 1), mutierte adulte mit nicht mutierten adulten Granulosazelltumoren (Gruppe 2) und nicht mutierte adulte mit juvenilen Granulosazelltumoren (Gruppe 3) verglichen. Es wurden die, in den jeweiligen Gruppen durch die Tumoren exprimierte Gene gezählt, welche eine Signifikanz $p < 0,05$ hatten. In Gruppe 1 waren 71 gleiche Gene exprimiert. In Gruppe 2 stimmten 50 Gene überein. Und in Gruppe 3 waren 55 Gene kongruent.

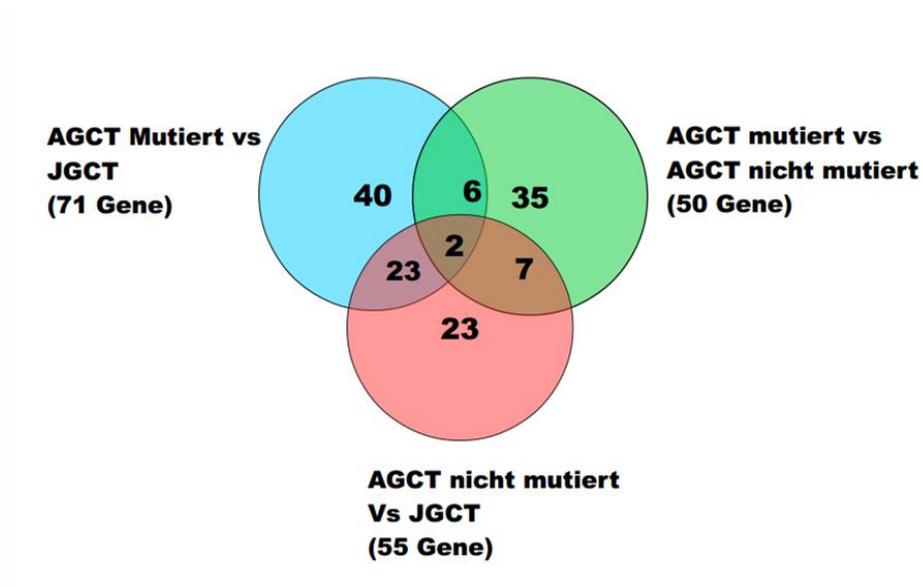


Abbildung 52: NanoString: Anzahl exprimierter Gene

3.8.1 Gleiche Gene

Es gab 2 Gene, die in allen 3 Vergleichsgruppen signifikant exprimiert waren, PLA2G4A und PIK3R3.

Bei PIK3R3 waren die Counts bei den juvenilen Granuloszelltumoren am höchsten und bei den adulten GCTs mit FOXL2-Mutation am niedrigsten.

Bei PLA2G4A waren die Counts bei den juvenilen GCTs am niedrigsten und bei adulten GCTs ohne Mutation von FOXL2 am höchsten.

Gen	Counts mutierte adulte GCTs	Counts juvenile GCTs	Fold change	P	Signalwege
PIK3R3	48,65	298,85	-6,14	0,0009	JAK-STAT, PI3K, RAS, Cell Cycle, Apoptosis
PLA2G4A	24,72	8,24	3	0,0161	MAPK, RAS

Tabelle 32: Vergleichsgruppe 1

Gen	Counts mutierte adulte GCTs	Counts nicht mutierte adulte GCTs	Fold change	P	Signalwege
PIK3R3	45,88	97,18	-2,12	0,0439	JAK-STAT, PI3K, RAS, Cell Cycle, Apoptosis
PLA2G4A	23,31	61,31	-2,36	0,0184	MAPK, RAS

Tabelle 33: Vergleichsgruppe 2

Gen	Counts nicht mutierte adulte GCTs	Counts juvenile GCTs	Fold change	P	Signalwege
PIK3R3	103,06	298,85	-2,9	0,0076	JAK-STAT, PI3K, RAS, Cell Cycle, Apoptosis
PLA2G4A	65,02	8,24	7,89	0,0015	MAPK, RAS

Tabelle 34: Vergleichsgruppe 3

3.8.2 Fold change

Im Folgenden werden die Gene aufgeführt, die eine mehr als 5fach erhöhte bzw. verminderte Expression aufweisen:

Gen	Counts mutierte adulte GCTs	Counts juvenile GCTs	Fold change	P	Signalwege
HIST1H3G	93,78	936,55	-9,99	0,0001	Transcriptional Regulation
HIST1H3B	65,55	880,08	-13,43	0,0033	Transcriptional Regulation
CCNB1	122,28	753,22	-6,16	0,0057	Cell Cycle, Apoptosis
PIK3R3	48,65	298,85	-6,14	0,0009	JAK-STAT, PI3K, RAS, Cell Cycle, Apoptosis
CDC7	44,41	276,25	-6,22	0,0001	Cell Cycle, Apoptosis
PTTG2	31,37	189,54	-6,04	0,0001	Cell Cycle, Apoptosis
PKMYT1	24,84	126,36	-5,09	0,0005	Cell Cycle, Apoptosis

Tabelle 35: Gruppe 1

In Vergleichsgruppe 1 waren sieben Gene mehr als 5fach vermindert exprimiert, alle in den mutierten adulten Granulosazelltumoren. Davon waren zwei Gene aus dem Signalweg *Transcriptional Regulation* und fünf Gene aus den Signalwegen *Cell Cycle* und *Apoptosis*.

Gen	Counts mutierte adulte GCTs	Counts nicht mutierte adulte GCTs	Fold change	P	Signalwege
ID1	52,77	292,39	-5,54	0,0261	TGF- β
COL4A5	11,55	216,65	-18,76	0,0109	PI3K
PPARG	1197,38	162,58	7,36	0,0169	Transcriptional Regulation
IFNA	136,58	12,47	10,95	0,0111	JAK-STAT, PI3K

Tabelle 36: Gruppe 2

In der Vergleichsgruppe 2 waren zwei Gene der adulten mutierten Granulosazelltumoren mehr als 5fach vermehrt exprimiert und zwei Gene mehr als 5fach weniger exprimiert gegenüber den nicht mutierten adulten Granulosazelltumoren. Zwei Gene waren aus dem Signalweg *PI3K*.

Gen	Counts nicht mutierte adulte GCTs	Counts juvenile GCTs	Fold change	P	Signalwege
HIST1H3H	259,32	1401,68	-5,41	0,0006	Transcriptional Regulation
HIST1H3G	93,99	936,55	-9,96	0,0031	Transcriptional Regulation
HIST1H3B	90,02	880,08	-9,78	0,0074	Transcriptional Regulation
CCNB1	108,96	753,22	-6,91	0,0008	Cell Cycle, Apoptosis
SETBP1	302,52	49,01	6,17	0,0402	Driver Gene
NKD1	148,33	20,04	7,4	0,0215	Wnt
PLA2G4A	65,02	8,24	7,89	0,0015	MAPK, RAS
GRIA3	152,03	7,9	19,23	0,0038	Transcriptional Regulation

Tabelle 37: Gruppe 3

In der Vergleichsgruppe 3 waren vier Gene in den nicht mutierten adulten Granulosazelltumoren mehr als 5fach vermindert exprimiert und vier Gene mehr als 5fach vermehrt exprimiert. Drei Gene der weniger exprimierten Gene waren vom Signalweg *Transcriptional Regulation*.

Im Folgenden werden die Gene aufgeführt, die weniger als 1,5 fach vermehrt oder vermindert exprimiert sind:

Gen	Counts mutierte adulte GCTs	Counts juvenile GCTs	Fold change	P	Signalwege
ZKSCAN5	34,67	51,49	-1,49	0,0291	(Housekeeping gene) Transcriptional Regulation
SKP2	154,02	224,82	-1,46	0,0268	Cell Cycle, Apoptosis
PRKAR2A	178,48	234,84	-1,32	0,0267	Cell Cycle, Apoptosis
IKBKB	124,03	162,86	-1,31	0,003	MAPK, PI3K, RAS, Cell Cycle, Apoptosis
PTPN11	237,93	304,6	-1,28	0,0419	Driver Gene, JAK-STAT, RAS
SKP1	2283,17	1847,34	1,24	0,042	Wnt, TGF- β , Cell Cycle, Apoptosis
VPS33B	135,46	101,38	1,34	0,0283	Housekeeping gene
XPA	213,3	146,45	1,46	0,0382	DNA Repair

Tabelle 38: Vergleichsgruppe 1

In der Vergleichsgruppe 1 waren fünf Gene der adulten mutierten Granulosazelltumoren weniger als 1,5fach vermindert exprimiert und drei Gene weniger als 1,5fach vermehrt exprimiert gegenüber den juvenilen Granulosazelltumoren. Drei der vermindert exprimierten Gene sind dem Signalweg *Cell Cycle* und *Apoptosis* zuzuordnen.

Gen	Counts mutierte adulte GCTs	Counts nicht mutierte adulte GCTs	Fold change	P	Signalwege
MAPK1	189,21	277,43	-1,47	0,0497	TGF-β, MAPK, PI3K, RAS
PTPN11	224,35	319,57	-1,42	0,026	Driver Gene, JAK-STAT, RAS
DAXX	183,74	244,66	-1,22	0,0435	Driver Gene, MAPK
RAD50	166,25	135,75	1,22	0,0127	DNA Repair
CBL	155,51	114,66	1,36	0,0256	Driver Gene, JAK-STAT
NBN	411,02	291,52	1,41	0,0198	DNA Repair
KDM6A	375,17	257,34	1,46	0,0112	Driver Gene, Transcriptional Regulation

Tabelle 39: Vergleichsgruppe 2

In der Vergleichsgruppe 2 waren drei Gene der adulten mutierten GCTs weniger als 1,5fach vermindert exprimiert und vier Gene weniger als 1,5fach vermehrt exprimiert gegenüber den adulten nicht mutierten GCTs. Vier der Gene gehören zu den *Driver Genes*.

Gen	Counts nicht mutierte adulte GCTs	Counts juvenile GCTs	Fold change	P	Signalwege
SRSF2	451,3	630,27	-1,4	0,0074	Driver Gene
RRAS2	104,51	136,35	-1,3	0,0253	MAPK, RAS
MED12	216,77	169,31	1,28	0,0131	Driver Gene
XPA	214,3	146,45	1,46	0,0168	DNA Repair
MTMR14	174,23	117,26	1,49	0,0394	Housekeeping Gene

Tabelle 40: Vergleichsgruppe 3

In Vergleichsgruppe 3 waren zwei Gene der adulten nicht mutierten GCTs weniger als 1,5fach vermindert exprimiert und drei Gene weniger als 1,5fach vermehrt exprimiert gegenüber den juvenilen GCTs.

4. Diskussion

Granulosazelltumoren des Ovars wurden erstmals 1859 von Rokitansky beschrieben [11]. Es handelt sich um seltene Malignome, die rund 3-5% aller Ovarialtumoren ausmachen [27]. Man kann die Granulosazelltumoren in zwei Untergruppen einteilen, adulte Granulosazelltumoren und juvenile Granulosazelltumoren [77]. Adulte Granulosazelltumoren, machen 95% aller Granulosazelltumoren aus und treten meist perimenopausal oder in der frühen Postmenopause auf [27, 77, 78]. In dem hier untersuchten Kollektiv lag das mittlere Erkrankungsalter bei 54,5 Jahren. Die meisten Patientinnen, 25,5% erkrankten in der fünften Lebensdekade, wie auch in einer Studie von Sekkate et al [78]. Granulosazelltumoren werden als niedrig maligne betrachtet [79, 80], da sie häufig in frühen Tumorstadien entdeckt werden [20, 81]. Auch eine Metastasierung tritt eher selten auf [81, 82]. Die Rezidivrate liegt bei 10-30% und im Durchschnitt liegt die Zeit des ersten Rezidivs bei 4-7 Jahren [27, 83]. 31 der 38, 81,6%, Tumoren, von denen die Tumorstadieneinteilung vorlag, befanden sich im Tumorstadium I. Auch in anderen Studien überwiegt die Erkrankung im Tumorstadium I [78, 84]. Adulte Granulosazelltumoren weisen zu 97% eine Punktmutation, 402C → G (C134W), im FOXL2-Gen auf. Diese Mutation wurde 2009 erstmals von *Shah et al* beschrieben [41]. In späteren Studien wurde eine Mutationsrate von 93-97% [12, 59, 85] beschrieben. Auch in einer Studie von *Buza et al* wurde 2017 bei einem Datensatz von 51 Fällen eine Mutationsrate von 88,6% bei adulten Granulosazelltumoren beschrieben [86]. In der von uns durchgeführten Pyrosequenzierung waren 87,7% (50/57) aller adulten Granulosazelltumoren im FOXL2-Gen mutiert. Bei der differenzierten Betrachtung von primären AGCT und Rezidivtumoren des AGCT, zeigten in der hier durchgeführten Mutationsanalyse 81,8% (27/33) der Primärtumoren und 93,3% (14/15) der Rezidivtumoren eine FOXL2- Mutation. Auch in einer Studie von *Zannoni et al* wurde Gewebe von 37 primären adulten Granulosazelltumoren und von fünf Metastasen eines AGCT mittels Pyrosequenzierung untersucht. 89,2% der primären AGCT und 80% der Metastasen zeigten hier eine Mutation im FOXL2 Gen [77]. Die Variation der Ausprägung der FOXL2 Mutation kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen die Auswahl der Patienten. Aber auch die Verwendung unterschiedlicher Methoden für die Sequenzanalyse. *Shah et al* führte eine direkte Sequenzierung durch und wiesen eine Mutationsrate von 97% bei AGCT nach [41]. *D'Angelo et al* hingegen führten eine Real-Time PCR durch und hatte damit eine Mutationsrate von 70% [87]. In der immunhistochemischen Untersuchung war bei 80% der Tumoren, bei denen in der Pyrosequenzierung eine FOXL2-Mutation nachgewiesen wurde, auch eine nukleäre Positivität für FOXL2. Davon waren 50% der Fälle mäßig positiv gefärbt. Jedoch wiesen auch 63,3% der Fälle ohne Mutationsnachweis eine positive Färbereaktion im Zellkern auf. Eine Korrelation zwischen der Mutationsanalyse und der Immunhistochemie konnte nicht nachgewiesen werden ($p=0,163$). Auch in einer Studie von *D'Angelo et al* waren 75% der Fälle in der Immunhistochemie positiv. Hier zeigten Fälle mit Mutationsnachweis eine stärkere Immunreaktion [55]. *Jamieson et al* beschrieben einen Fall ohne Mutationsnachweis, der >40% positiver Zellkerne zeigte [59]. Bei drei Fällen mit positiver Färbereaktion handelte es sich um juvenile GCTs. Sowohl *D'Angelo et al* als auch *Kalfa et al* beschrieben den Nachweis einer Immunreaktion für das FOXL2 Protein in juvenilen GCTs. Bei *D'Angelo et al* wurden bei 14/19 Fällen FOXL2 exprimiert und *Kalfa et al* untersuchten ausschließlich juvenile GCTs. *Kalfa et al* stellten fest, dass Patienten mit juvenilen Granulosazelltumoren, die vermindert oder kein FOXL2 exprimierten, eher einen aggressiven Krankheitsverlauf hatten [50, 87]. Diverse Studien, die eine FOXL2-Expression in der Immunhistochemie untersuchten, werteten die nukleäre Expression aus [50, 59, 87]. Lediglich *Jamieson et al* beschrieben die diffuse zytoplasmatische Färbung eines Granulosazelltumors mit FOXL2-Mutation [59].

Die meisten Fälle der AGCTs sind bei Diagnosestellung im Tumorstadium I [17, 88]. Im Vergleich zu epithelialen Tumoren, werden GCTs zu 81% in frühen Stadien festgestellt, (71% in Stadium I, 10% in Stadium II) [13, 20]. Auch in unserer Studie zeigte sich in 81,6% eine Erkrankung im Tumorstadium I, davon waren 58% im Stadium Ia. Alle Fälle dieser Studie, bei der kein Mutationsnachweis des FOXL2-Gens vorlag, befanden sich im Tumorstadium I. Davon wiederum waren 75% im Stadium Ia. Bei zwei der Fälle handelte es sich um juvenile Granulosazelltumoren. Auch die meisten Fälle, 76,7%, die einen Mutationsnachweis hatten, waren im Tumorstadium I und davon wiederum weitaus mehr als die Hälfte im Stadium Ia. Im Tumorstadium II waren 6,7% der Fälle und 16,7% im Stadium III. In einer Studie von *D'Angelo et al* wurde bei Patientinnen mit Mutationsnachweis ein kürzeres krankheitsfreies Intervall beobachtet, wohingegen das Überleben nicht durch den Mutationsstatus beeinflusst wurde [87]. Auch *Zannoni et al* beobachteten die Expression der Mutation von FOXL2 in Primärtumoren und Metastasen. Sie beschrieben, dass es möglich sei, dass durch das mutierte Allel eine erhöhte Expression von FOXL2 vorkommt, welche wiederum einen Einfluss auf Rezidivkrankungen hat [77]. Der FOXL2-Wildtyp spielt eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Proliferation von Granulosazellen und bei der Förderung der Apoptose [18, 52]. Durch eine Mutation wird demzufolge über verschiedene Signalwege die Apoptose gehemmt und das Zellwachstum gefördert. [18, 65]. In einer Studie von *Cheng et al* wurde festgestellt, dass in KGN-Zellen (=human granulosa-like tumor cell line) GnRH-Rezeptoren exprimiert werden und dass durch Zugabe von GnRH es zur Apoptose kommt. Bei Überexpression des FOXL2-Wildtyps kommt es zur Vermehrung von GnRH-Rezeptoren und die GnRH-induzierte Apoptose wird verbessert. Beim mutierten Typ konnte kein Einfluss auf die durch GnRH/GnRHR induzierte Apoptose festgestellt werden [58]. Auch *Kim et al* beschrieb eine Hemmung der Apoptose bei einer FOXL2-Mutation [64]. Durch Hemmung der Apoptose kommt zu Schäden der DNA, was mit einer Hyperproliferation assoziiert wird. Außerdem wurde eine unterdrückte Apoptose in high-grade Tumoren festgestellt [89]. In unserer Studie hatten Patientinnen mit Tumoren im Stadium II oder III ausschließlich GCTs mit FOXL2-Mutation. Das heißt Patientinnen, die den Nachweis einer Mutation zeigten, zeigten auch eine Erkrankung in höheren Tumorstadien. Man kann also davon ausgehen, dass bei Patientinnen mit Granulosazelltumoren mit Mutation im FOXL2-Gen, durch eine Hemmung der Apoptose es zu schwereren Krankheitsverläufen kommt. Auch in unserer Studie zeigt sich dieser Trend. Patientinnen mit Tumorrezidiv zeigten zu 93,3% eine Mutation, Patientinnen mit Primärtumor hingegen nur zu 81,8%. In einer Studie von *Yanagida et al*, in der Primärtumoren und Rezidivtumoren untersucht wurden, wurde jeweils die Mutation nachgewiesen [83]. In unserer Studie verstarben Patientinnen mit Nachweis einer Mutation (47,2%) häufiger. Bei Patientinnen ohne Mutation kam es in 33,3% der Fälle zum Tod. Eine Korrelation zwischen der Mutationsanalyse und dem Überleben zeigte sich jedoch nicht ($p=0,293$). *Kraus et al* konnten in eine Studie nachweisen, dass homozygote FOXL2-Mutationen eher bei Patientinnen mit Rezidivtumoren als mit Primärtumoren vorlagen. Außerdem zeigte sich bei Tumoren mit homozygoten FOXL2-Mutationen frühere Rezidive [62]. Wir werteten in der Immunhistochemie nicht nur die Expression von FOXL2 aus, sondern auch die Expression diverser anderer Proteine wie Östrogen α , Progesteron, Inhibin und Ki-67 und deren Korrelation mit dem Tumorstadium sowie dem Überleben. Granulosazelltumoren sind häufig hormonell aktiv und produzieren Östrogen [8, 34]. Durch die Sekretion von Östrogen, werden viele Patientinnen klinisch auffällig. Es kommt u.a. vermehrt zu vaginalen Blutungen oder bei jungen Patientinnen zur Pseudopubertas praecox [34, 90]. Es gibt zwei verschiedene Östrogenrezeptoren im Ovar, ER α und ER β , wobei ER β der vorherrschende ist [17]. ER α kommen im Ovar in den Thekazellen, im Stroma, am Oberflächenepithel und im Corpus luteum von prämenopausalen Frauen vor. In Granulosazellen findet man ER β . Man stellte fest, dass Frauen, die seit mehr als fünf Jahren postmenopausal waren, eine Zunahme an ER α hatten [91]. Normalerweise findet man ER α

und PR auf der Oberfläche von epithelialen Tumoren des Ovars, am ehesten bei serösen oder endometrioiden Ovarialkarzinomen. Aber auch bei Keimstrang-Stroma-Tumoren, v.a. bei Granulosazelltumoren und bei Sertoli-Leydigzell-Tumoren, konnten diese Hormonrezeptoren nachgewiesen werden. Diverse Studien ergaben verschiedene Ergebnisse zum Hormonrezeptorstatus, sodass man davon ausging, diese Hormonrezeptoren hätten keine biologische Bedeutsamkeit für u.a. adulte GCTs [92]. *Farinola et al* führten daher eine Studie zur Expression beider Rezeptoren bei AGCTs und Sertoli-Leydigzell-Tumoren durch. Sie konnten bei 66% der Fälle eine Expression von ER α feststellen. Zu einer Reaktion bei >50% der Zellen kam in 20% der Fälle. Hingegen waren 98% der Fälle PR positiv, wovon wiederum 68% eine Reaktion bei mehr als 50% der Zellen hatten[92]. In unserer Studie zeigten 32,8% der GCTs einen positiven ER α Nachweis, davon hatten 14,8% einen Remmele-Score über 6, also eine mäßige bis starke Ausprägung der Rezeptorexpression. Im Tumorstadium Ia waren ausschließlich Fälle mit einer mäßigen bis starken Färbereaktion. Allerdings verstarben 3/3 Patientinnen mit starker ER α - Expression und hatten auch im Mittel die kürzeste Überlebenszeit. In einer Studie von *Ciuci et al* wurde nur bei 30% der ausschließlich AGCTs eine Expression von ER alpha beobachtet [93]. Auch *Hutton et al* beobachteten eine niedrige Expression (20%) von ER alpha bei AGCTs, auch konnte er keinen Zusammenhang zwischen der Expression von ER α und PR und dem Outcome der Patientinnen feststellen [33]. Trotz der Bedeutung für die Entwicklung und die Funktion des Ovars, ist die Rolle von Östrogen und Östrogenrezeptoren bei Granulosazellen nicht vollständig verstanden [34]. Bei Granulosazelltumoren werden ER β stark exprimiert, während ER α nur mäßig ausgebildet sind. ER β wurde als antiproliferativ bei verschiedenen Krebsarten erkannt [17]. *Jamieson et al* vermuteten einen Einfluss auf die Tumorgenese via ER α [17]. *Kim et al* hingegen beschrieben einen positiven Effekt durch vermehrte ER α , denn in einem Modell mit Knock-out-Mäusen, zeigten Mäuse ohne ER α eine verstärkte Entwicklung von GCT und kürzeres Überleben [94]. Sie vermuteten eine vermehrte Bildung von Tumoren, im Falle einer Mutation im ER α bzw. beim Verlust von ER α und ER β . *Fan et al* stellten fest, dass es bei ER β -Knock-out-Mäusen zu vermehrter Tumorbildung kommt, bei ER α -Knock-out-Mäusen hingegen nicht, daher vermuteten sie, dass eine Tumorgenese von der Anwesenheit von ER α abhängig ist. Außerdem stellten sie fest, das ER β -Mäuse vermehrt ER α und Ki-67 exprimierten. Sie schlussfolgerten daher, dass eine Änderung des Verhältnisses ER α /ER β zu gunsten von ER α zu einer spontanen Tumorgenese im Ovar führen kann [95]. In Bezug auf epitheliale Ovarialkarzinome und Mammakarzinome wurde bereits ein auf das Überleben positiver Effekt durch Ausprägung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren beobachtet [96]. Ebenso wurde in mehreren Studien beschrieben, dass die Überexpression von PR als günstiger Prognosefaktor bei epithelialen Ovarialkarzinomen gilt [96, 97]. *Friberg et al* stellten fest, dass die Aktivierung von PR bei Granulosazellen eine proapoptotische Wirkung haben [98]. Dies könnte auch bei GCTs eine Rolle spielen. Im Gegensatz dazu stellten *Puechl et al* erst 2019 fest, dass eine verstärkte immunhistochemische Expression von Progesteron sowohl das rezidivfreie Intervall als auch die Gesamtüberlebenszeit verkürzt [99]. Bezüglich der Expression von Östrogen wurde kein Zusammenhang erkannt. Wie auch *Farinola et al* hatten sie in 98% der Fälle PR positive GCTs. In unserer Studie konnten bei 85,2% der Fälle PR immunhistochemisch nachgewiesen werden. In 65,5% der Fälle war der Remmele Score über 6. Alle Fälle ohne Nachweis von PR waren im Tumorstadium Ia und Patientinnen ohne PR Nachweis zeigten das längste Überleben. 56% der Patientinnen mit einer mäßigen bis starken immunhistochemischen Reaktion verstarben. Obwohl in unserer Studie auch ein Trend für einen Einfluss von PR auf ein schlechtes Überleben ($p=0,342$) und ein höheres Tumorstadium ($r=0,154$; $p=0,514$) bestand, zeigte sich keine Signifikanz. Inhibin wird von Granulosazellen des Ovars produziert und spielt eine wichtige Rolle während der Lutealphase und der späten Follikelphase des Ovars. Es hemmt die FSH Produktion der Hypophyse und ist zeitgleich ein Wachstumsfaktor für die Granulosazellen selbst [17, 34]. Normalweise sinkt in

der Menopause der Inhibin Spiegel bei Frauen, bei Patientinnen mit Granulosazelltumoren jedoch bleibt der Spiegel hoch bzw. steigt. Deshalb wurde Inhibin auch bereits als ein Marker zur Diagnose von GCTs erkannt [20, 100]. Bei epithelialen Ovarialkarzinomen wurde beobachtet, dass besonders fortgeschrittene Tumore wenig Inhibin A exprimieren [101]. Eine Sekretion von Inhibin ist also zwar typisch, aber nicht spezifisch für GCTs [20]. Ein Nachweis von Inhibin in der Immunhistochemie findet man in fast allen Keimstrang-Stromatumoren, lediglich die Fibrothekome bilden eine Ausnahme [102]. Nicht alle Granulosazelltumoren zeigen in der Immunhistochemie eine Expression von Inhibin [34, 102] [103]. Es wurde in Studien eine Expression von Inhibin zwischen 73,9% [104] und 88,5% [103]. Somit kann Inhibin als wichtiger Marker in der Diagnostik von GCTs dienen. Auch in unserer Studie zeigten sich 71,3% der Fälle als Inhibin positiv. *Nosov et al* beschrieben, dass Patientinnen, die jung erkranken und eine höhere Inhibin- sowie Ki-67-Expression haben, ein höheres Rezidivrisiko aufweisen [105]. Ki-67 ist ein Protein, welches in allen aktiven Phasen der Zellteilung exprimiert wird und besonders während der Mitose sichtbar wird. Es wird mit der Zellproliferation in Verbindung gebracht. Der Anteil Ki-67 positiver Zellen korreliert häufig mit dem klinischen Krankheitsverlauf. Besonders in der Brustkrebsdiagnostik ist Ki-67 bereits als ein prognostischer Faktor etabliert, der das krankheitsfreie Intervall mitbestimmt [49, 106]. Bezüglich der Granulosazelltumoren wurde eine höhere Expression von Ki-67 bei Rezidivtumoren beschrieben [107, 108]. Außerdem wurde auch eine erhöhte Expression bei juvenilen GCTs beobachtet [107]. Auch in unserer Studie exprimierten alle juvenile GCTs vermehrt Ki-67. Drei von vier Fällen (75%) hatten eine Expression zwischen 5 und 10%, in einem Fall war sogar eine Expression von über 20%. In diesem Fall handelte es sich um einen Rezidivtumor im Erkrankungsalter von 23 Jahren, an dem die Patientin nach nur 19 Monaten verstarb. 65% der Patientinnen aus unserer Studie mit einer Ki-67 Expression von über 5% verstarben. Auch *King et al* beschrieben ein negatives Auswirken bei erhöhter Expression von Ki-67 auf das Überleben [109]. Im Umkehrschluss dazu beobachteten *Volkova et al* ein deutlich längeres rückfallfreies Intervall, bei einer niedrigen Ki-67-Expression [110]. *Costa et al* hingegen stellten nur einen schwachen Zusammenhang zum krankheitsfreien Intervall [107] fest. Verschiedene Studien beschreiben einen Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und der Expression von Ki-67, es wurde beobachtet, dass Fälle mit höherer Ki-67-Expression auch höhere Tumorstadien aufweisen [34, 111]. In einer Studie von *Sonoyama et al* wurde bei einem besonders aggressivem GCT ein Ki-67 Index von 40% nachgewiesen [112]. In unserer Studie waren 57,8% der Fälle im Tumorstadium Ia, alle exprimierten <10% Ki-67. 39,5% der Fälle waren im Stadium Ic oder schlechter, davon wiederum exprimierten 73,3% mehr als 5% Ki-67. Insgesamt gab es zwei Fälle, einer im Tumorstadium Ic und einer im Stadium IIIb, die mehr als 10% Ki-67 exprimierten. In einer weiteren Untersuchung mittels NanoString, war das Ziel herauszufinden, ob es weitere Gene gibt, die einen Einfluss auf die Entstehung von Granulosazelltumoren haben. Bei der Genanalyse mittels NanoString erfolgten die Untersuchungen nur an einem sehr kleinen Kollektiv. Außerdem wurde kein Gewebe eines gesunden Ovars untersucht, das heißt, man weiß zwar das die unterschiedlichen Tumore zueinander Gene verschieden stark exprimieren, jedoch nicht, ob es sich im Vergleich zum gesunden Ovar um eine Über- oder Unterexpression handelt. Bei der NanoString-Analyse konnten wir zwei Gene ausfindig machen, die in allen drei Tumorentitäten signifikant exprimiert waren: PIK3R3 und PLA2G4A. PIK3R3 gehört zu den Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), Enzyme, die eine wichtige Rolle bei verschiedenen intrazellulären Signalwegen spielen. Sie sind wichtig für den Zellstoffwechsel, Proliferation, Differenzierung und Migration. Es gibt drei verschiedene Klassen und diverse Isoformen. PIK3R3 gehört zur Klasse IA. Die Kinasen der Klasse IA regulieren Wachstum und Stoffwechselvorgänge. Es ist bekannt, dass eine Verstärkung der PI3K Signalwege zu Krebserkrankungen führt [113].

Der Zusammenhang zwischen dysreguliertem PI3K und der Entstehung von Karzinomen ist gut dokumentiert [114]. Unter anderem wurde sowohl beim Prostatakarzinom [115] als auch beim Mammakarzinom [116] der Einfluss von PI3K auf die Kanzerogenese belegt. Unter anderem weiß man, dass in soliden Tumoren, mitunter auch in epithelialen Ovarialkarzinomen der PI3K/AKT Signalweg durch eine Mutation oder eine erhöhte Anzahl von Proteinen von PI3K Untereinheiten, PIK3CA und PIK3R, aktiviert wird [17]. PIK3R3 spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und beim Überleben verschiedener Tumoren [117]. PIK3R3 kodiert die p55 γ Untereinheit von PI3K [118]. Es wurde herausgefunden, dass es einen Zusammenhang zwischen der p55PIK Untereinheit mit dem Retinoblastom-Protein (Rb), einem wichtigen Regulator des Zellzyklus, gibt [119]. Eine Erhöhung von PIK3R3 und damit einhergehender Tumorzellmigration wurde bereits beim hepatozellulärem Karzinom, malignen Melanom, Triple-negativen Mammakarzinom, kolorektalen Karzinom und bei Metastasen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms festgestellt [117]. Beim Kolorektalen Karzinom wurde auch festgestellt, dass Patienten mit einer höheren PIK3R3 Expression ein besseres krankheitsfreies Überleben hatten [120]. *Zhang et al* stellten bei Ovarialkarzinomen eine Erhöhung von 6 von 12 PI3K Untereinheiten fest, v.a. PIK3R3 war signifikant erhöht [121]. Sie vermuteten daher, dass der PI3K Signalweg durch Überexpression von PIK3R3 bei Ovarialkarzinomen an Funktion zunimmt [121]. Schon vorher war bekannt, dass PI3K Einfluss auf das Tumorüberleben und die Antiapoptose hat. Daher schalteten *Zhang et al* die PIK3R3 mRNA in Ovarialkarzinomen aus und bemerkten eine Steigerung der Apoptose [121]. Eine Überexpression oder Mutation von PIK3CA und PIK3R konnte in Granulosazelltumoren bisher jedoch nicht festgestellt werden [17, 122]. PIK3R3 ist also an der Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges beteiligt [17]. Der PIK3/ Akt Signalweg ist der in den meisten Karzinomarten aktivste Signalweg. Er kann Einfluss haben auf das Überleben, Angiogenese, Chemoresistenz und die Entstehung von Metastasen [123]. Es ist bekannt, dass eine Aktivierung des AKT-Signalweges durch PI3K mit der Tumorgenese in Verbindung steht. Dies geschieht mittels Hemmung der Apoptose durch Hemmung weiterer Proteine, welche normalerweise die Zellproliferation hemmen und die Apoptose initiieren [52]. *Li et al* vermuteten, dass unkontrollierte PI3K Aktivität in Oozyten zur Umwandlung von Granulosazellen zu GCT-Zellen, durch gestörte Zellkommunikation, führt [52]. Auch *Kim et al* beschrieben, dass nicht mutierte Zellen durch gestörte Zellkommunikation maligne werden können. So zum Beispiel bei GCTs, bei denen es durch exogene Faktoren zu einer unterbrochenen Zellkommunikation während der Follikulogenese kommt [124].

Das zweite Gen, welches in allen Gruppen signifikant vorkam, war PLA2G4A. Es kodiert cPLA2 α , eine Untereinheit der cytosolischen Phospholipase A2, durch diese Phospholipase wird Arachnoidonsäure, ein Bestandteil der Zellmembran, freigesetzt [125]. Derivate der Arachnoidonsäure, die Eicosanoide, werden weiter verstoffwechselt zu u.a. Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxan [126], diese spielen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, -differenzierung, -motilität, Apoptose und bei der Angiogenese [125]. Durch Fehlregulation, der am Eicosanoid- Stoffwechsel beteiligten Komponenten kann es zu Entstehung und Progress verschiedener Krebsarten kommen [125]. V.a. Prostaglandin PGE2 fördert das Tumorwachstum, dies wurde bisher u.a. bei Mammakarzinom, Lungenkarzinom und Kolonkarzinomen festgestellt [126]. Auf verschiedenen Signalwegen wird über Prostaglandine und Leukotriene das Zellwachstum, Migration und Invasion der Tumorzellen reguliert. So aktiviert z.B. PGE2 im kolorektalen Karzinom den PI3K/Akt Signalweg, wodurch u.a. Zellmigration und -invasion gefördert wird. In Zelllinien vom Pankreaskarzinom konnte eine Zellproliferation durch Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges durch LTB $_4$ beobachtet werden [126]. *Bai et al* stellten fest, dass Patienten mit AML bei einer verstärkten PLA2G4A Expression ein kürzeres Gesamtüberleben hatten, als Patienten mit einer niedrigeren Expression [116]. *Zhang et al* hingegen stellten fest, dass eine niedrigere

PLA2G4A Expression mit einer ungünstigen Überlebensprognose bei Patienten mit Magenkarzinomen einhergeht [127]. *Patel et al* zeigten in ihrer Studie, dass *cPLA2 α* in allen Prostatakarzinomen vorkam, jedoch bei androgenresistenten Tumoren vermehrt. Auch konnten sie belegen, dass es durch Hemmung der *cPLA2 α* zu verringertem Zellwachstum kommt [128]. Auch *Kim et al* stellten an einer Studie mit basal-like Mammakarzinomen, einem aggressiven und häufig Triple-negativen Subtyp des Mammakarzinoms fest, dass es durch Gabe von AVX235, ein Hemmer der *cPLA2 α* , zu einer verminderten Vaskularisation und Perfusion des Tumors kam und dadurch auch zu einem vermindertem Wachstum [129]. In mehreren Studien wurde beschrieben, dass sowohl PIK3R3 als auch *PLA2G4* einen Einfluss auf das Wachstum diverser Karzinome hat. Da bei allen drei Tumorentitäten des GCT beide Gene signifikant exprimiert waren, kann es sein, dass diese auch eine Ursache für die Entstehung und das Wachstum von Granulosazelltumoren sind.

Weiterhin fiel auf, dass juvenile GCTs im Vergleich zu adulten Granulosazelltumoren vermehrt HIST1H3G und HIST1H3B exprimierten. Lediglich bei den AGCTs mit FOXL2-Mutation kam noch HIST1H3H hinzu. Alle drei Gene kodieren Untereinheiten des Histon H3. Es gibt fünf Histon-Klassen. HIST1, liegt beim Menschen auf dem Chromosom 6 (6p21-p22) und umfasst 55 Gene. Darunter gibt es 12 H3 Genen, welche drei H3 Proteine kodieren [130]. Die durch verschiedene Gene kodierten Proteine sind sich sehr ähnlich, jedoch nicht identisch. Gene der replikationsabhängigen Histone können spezifische Funktionen haben und die Chromatinregulation verändern [131]. Histone sind Proteine des Zellkerns, welche für die Nukleosomenstruktur des Chromosomenstranges verantwortlich sind. Je zwei Kopien der Histone H3, H4, H2A und H2B bilden ein Oktamer, um welches ca. 146bp DNA gewickelt sind. Das Linker-Histon H1 verbindet die DNA zwischen den Nukleosomen und dient so einer kompakteren Chromatinanordnung [132]. Somit sorgen die Histone für die Verpackung und Anordnung des Genoms. Die Nukleosomenstruktur ist wichtig für Genexpression und viele andere DNA-abhängige Vorgänge wie Transkription, Replikation, Rekombination und Reparatur. Veränderungen der Nukleosomenstruktur können die Transkription oder die Bindung von Regulationsfaktoren beeinflussen. Es gibt drei Mechanismen, die die Nukleosomenstruktur und chromatinabhängige Zellprozesse verändern können: Histon-Modifikation, Chromatin-Remodelling und Histonvarianten. Histon-Modifikation bezieht sich auf posttranslationale Veränderungen, wie z.B. Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung. Dadurch ändert sich die Chromatinstruktur und somit auch u.a. die Nukleosomeninteraktion und die Bindung von Effektormolekülen. Chromatin-Remodelling meint dynamische DNA-Veränderungen durch verschiedene Enzyme sowie durch Transkription, Replikation, Apoptose und Reparatur. Histonvarianten nennt man nicht allelische Histone die unabhängig von der Replikation sind und während des gesamten Zellzyklus präsent sind. Sie unterscheiden sich zu den kanonischen Histonen nur in wenigen Aminosäuren. Normalerweise haben Histone keine Introns, Histonvarianten können jedoch Introns haben [131]. Varianten sind wichtig für die Regulation der Chromatinstruktur und somit auch für Zellvorgänge, Chromosomentrennung und Genexpression. Für die Einbindung ins Nukleosom benötigen Histonvarianten andere Proteine, die Chaperone. Wenn Histon Varianten dereguliert sind, können sie zu Karzinomen führen [133]. H3 Varianten wurden bereits als wichtig in der Karzinomentstehung erkannt, da sie in verschiedenen Tumoren fehlreguliert oder verändert waren [134]. Sie können das Genom verändern und dadurch Karzinome bilden oder zum Erkrankungsprogress führen. Es ist bereits bekannt, dass die Anzahl der Isoformen der Histone bei verschiedenen Karzinomen verändert ist. Bei Mammakarzinomen konnte beispielsweise der Zusammenhang zwischen der Hist1H2BK Expression und Metastasierung belegt werden. Bei einer hohen Expression kam es zu vermehrter Metastasierung mit VEGF165 überexprimierenden Zellen, bei niedriger Expression hingegen zu weniger Metastasierung mit VEGF189 exprimierenden Zellen [131]. *Singh et al* fassten Zusammen in welchen Karzinomen es zur Auf- oder Abregulation H3

Isoformen kommt, u.a. kommen H3 Isoformen in Brustkrebs überexprimiert und in Endometriumkarzinomen vermindert exprimiert vor. Auch *Shah et al* zeigten, dass von den H2 Isoformen in verschiedenen Geweben wie Kolon, Zervix oder Leber die Isoformen unterschiedlich stark exprimiert waren und schlussfolgerten daher, dass die unterschiedliche Expression der Isoformen zur Bestimmung verschiedener Zelltypen beiträgt. Neben einer Überexpression von H2 Isoformen bei Brustkrebs wurde auch von einer Überexpression dieser bei AIDS und multipler Sklerose berichtet [135]. Im Falle von juvenilen GCT handelt es sich hierbei um HIST1H3G und HIST1H3B.

Ein weiteres Gen, welches im Vergleich bei juvenilen zu adulten Granulosazelltumoren deutlich vermehrt exprimiert (sechsfach) war, war CCNB1. Dieses Gen codiert Cyclin B1, welches ein Schlüssel-molekül im Zellzyklus beim Übergang G2-M-Phase ist und somit bedeutend für den Beginn der Mitose. Es spielt eine zentrale Rolle in der Tumorgenese und eine Überexpression konnte bei mehreren Tumoren u.a. Mammakarzinom [136], Kolonkarzinom [137], Lungenkarzinom [138] und Prostatakarzinom [139] festgestellt werden [138, 140]. Normalerweise ist die Expression niedrig und steigt nur an beim Übergang G2-M-Phase. Eine Deregulation kann daher zu einer Steigerung des Zellzyklus und somit zu einer malignen Transformation führen [140]. *Ye et al* verglichen in einer Metaanalyse verschiedene Studien bezüglich des Outcomes bei Cyclin B Expression bei verschiedenen Tumoren und stellten fest, dass eine erhöhte Expression bei Lungen- und Ösophaguskarzinomen mit einer schlechteren 3- und 5-Jahresüberlebensrate einhergeht, es beim kolorektalen Karzinom hingegen zu einer verbesserten 5-Jahresüberlebensrate kommt [140]. Diese Studie beschrieb die Überexpression des Proteins, Cyclin B1, es gibt auch Studien zur Expression des CCNB1 Gens. CCNB1 ist beteiligt an der Zellzykluskontrolle, eine Fehlfunktion führt zur Tumorgenese. Eine Überexpression von CCNB1 beobachteten *Liu et al* bei Patienten mit Adenokarzinom der Lunge im Zusammenhang mit einem schlechteren Überleben [141]. *Zhang et al* zeigten an Pankreaskarzinomzellen, dass es bei Ausschaltung von CCNB1 zu einer Erhöhung von p53 kommt und somit zu einer Steigerung der Apoptose [142]. *Li et al*, die Untersuchungen an Hypophysenadenomen machten, stellten einen Zusammenhang zwischen der Expression von CCNB1 und dem Invasionsgrad fest. Außerdem konnten sie beobachten, dass durch Ausschalten des Gens die Zellen in der G2/M Phase verharren und die Apoptose induziert wird [143]. Auch in Ovarialkarzinomen wurde die Expression von Cyclin B1 untersucht. *Zheng et al* untersuchten 58 epitheliale Ovarialkarzinome, 18 Ovarialtumoren niedrig maligner Potenz und 6 normale Ovarien immunhistochemisch. Sie stellten eine deutlich erhöhte Expression bei Ovarialtumoren niedrig maligner Potenz fest [144]. In einer anderen Studie von *Wei et al* wurde der Zusammenhang zwischen einer starken CCNB1 Expression und einer verkürzten Überlebenszeit bei Ovarialkarzinomen hergestellt [145]. Es gibt mehrere Studien, die zeigen, dass die Expression von Cyclin B1 bei Mammakarzinomen als prognostischer Faktor dient. Patienten mit hoher Expression haben eine kürzere Überlebenszeit und kürzere krankheitsfreie Intervalle. Außerdem besteht ein Zusammenhang mit Tumorgroße, Lymphknotenmetastasen und histologischem Grad [146, 147]. Beim kolorektalen Karzinom hingegen wurde beobachtet, dass zwar bei frühen Stadien die Zellproliferation durch eine hohe Cyclin B1 Expression gefördert wird, jedoch bei invasiven und metastasierten Karzinomen die Cyclin B1 Expression sinkt [148]. Zusammenfassend kann man sagen, dass viele Tumoren vermehrt Cyclin B1 exprimieren, eine erhöhte Expression meist mit einem schlechteren Überleben einhergeht und Cyclin B1 daher bei vielen Tumoren als prognostischer Faktor dient. Um den Einfluss einer vermehrten Cyclin B1 bzw. CCNB1 Expression auf juvenile Granulosazelltumoren herauszufinden, sollte man jedoch Untersuchungen an einem größeren Kollektiv durchführen.

Im weiteren Vergleich der signifikant exprimierten Gene bei adulten Granulosazelltumoren mit FOXL2-Mutation und ohne FOXL2-Mutation, fiel vor allem eine 20fach erhöhte Expression von COL4A5 bei adulten Granulosazelltumoren mit FOXL2-Mutation auf.

COL4A5 ist ein Gen, das vor allem dafür bekannt ist, dass es bei Mutationen zum Alport-Syndrom führt. Es kodiert das Alpha-5-Typ-IV-Kollagen, welches dem Aufbau der Basalmembran verschiedener Strukturen wie Glomerula, Cochlea oder Kornea dient. Das Alport-Syndrom wird zu 85% X-chromosomal durch eine Mutation des COL4A5 Gen vererbt. Die betroffenen Patienten leiden unter Nierenfunktionsstörung, Hörverlust und Sehstörungen [149]. Jedoch konnte auch in Karzinomen eine Zunahme der Typ IV Kollagene festgestellt werden [150, 151]. Es gibt 6 verschiedene alpha-Ketten der Typ IV Kollagene, $\alpha 1(IV)$ bis $\alpha 6(IV)$. Sie werden durch die jeweiligen Gene kodiert. COL4A5 und COL4A6 liegen beide auf dem X-Chromosom [151]. Je drei alpha Ketten bilden ein Trimer und bilden ein Bestandteil der Basalmembran, welche epitheliale und endotheliale Zellen von den darunter liegenden mesenchymalen Zellen trennt [150]. Kollagen IV ist wichtig für die Zellinteraktion und somit auch für verschiedene Prozesse wie Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Überleben. Kollagen IV ist ein wichtiges Bindeglied für verschiedenen Zelltypen, so auch für Tumorzellen [151]. Der Einfluss auf die Tumorgenese konnte in verschiedenen Studien belegt werden. Man konnte feststellen, dass von COL4A5 Signale ausgehen, die für die Entstehung von Lebermetastasen bei verschiedenen Karzinomen verantwortlich sind [152]. Ebenso konnte man nachweisen, dass bei Adenokarzinomen der Mamma Faktoren sezerniert werden, welche die Kollagensynthese fördern [153]. Außerdem spielt Kollagen IV bei der Angiogenese von Tumorzellen eine wichtige Rolle [154]. Xiao *et al* wiesen in einer Studie $\alpha 5(IV)$ -Knockout-Mäusen mit Lungenkarzinom den Einfluss auf die Tumorangiogenese nach. Mäuse, bei denen das Gen ausgeschaltet war, zeigten eine verminderte Neoangiogenese. Außerdem stellten sie fest, dass in den Knockout-Mäusen die Tumorigression verzögert war und zogen den Rückschluss, dass $\alpha 5(IV)$ wichtig ist für das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen [150]. Beim diffusen Magenkarzinom wurde die Expression von COL4A5 als ein Risikofaktor im Zusammenhang mit peritonealen Metastasen erkannt [155]. In kolorektalen Karzinomen hingegen war die Expression von COL4A5/COL4A6 runter reguliert [156]. Auch in Prostatakarzinomen wurde ein Verlust von $\alpha 5(IV)$ und $\alpha 6(IV)$ in der Basalmembran beobachtet. Man vermutete, dass durch den Verlust der Kollagene verbesserte Adhäsionseigenschaften der Karzinomzellen zur Basalmembran entstehen [157]. Bei verschiedenen Tumoren kann also entweder eine Überexpression oder aber eine Unterexpression des COL4A5 beobachtet werden. Dies hängt wahrscheinlich auch damit zusammen, um welche Art von Gewebe es sich handelt, da in den Basalmembranen der verschiedenen Gewebe verschiedene Kollagene vorherrschen. Beispielsweise sind in der Basalmembran der Nieren, der Lunge, des Hodens und der Augen sind vor allem $\alpha 3(IV)$, $\alpha 4(IV)$, und $\alpha 5(IV)$ Ketten zu finden. Während $\alpha 5(IV)$ und $\alpha 6(IV)$ vor allem in der Haut, glatter Muskulatur und Nieren zu finden sind [151]. Auch weiß man nicht, ob bei unserer Untersuchung bei den Tumoren mit FOXL2 Mutation das COL4A5 überexprimiert oder bei den Tumoren ohne Mutation das Gen vermindert exprimiert ist. Dafür müsste man weitergehende Untersuchungen durchführen.

Weiterhin war auffällig, dass adulte GCTs ohne FOXL2-Mutation das Gen GRIA3 gegenüber juvenilen GCTs 19fach exprimierten. GRIA3 liegt auf dem X-Chromosom, Xq25-q26 [158] und kodiert GluA3, eine Untereinheit der ionotropen Glutamaterezeptoren (iGluR) des AMPA-Typs [159]. Glutamaterezeptoren unterscheiden sich in ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Die ionotropen Rezeptoren lassen sich nochmals unterteilen in NMDA-(N-methyl-D-aspartate), AMPA- (a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) und Kainat-Rezeptoren. Es gibt vier verschiedene Glutamaterezeptoren des AMPA-Typs [160]. Glutamaterezeptoren kommen vor allem im ZNS und PNS vor, jedoch auch in diversen anderen Geweben [161]. So konnte auch in einem Teratom des Ovars GluA1 und GluA2/3 immunhistochemisch nachgewiesen werden [162]. Vier Untereinheiten der Glutamaterezeptoren bilden einen Ionenkanal [158], homo- oder heterotetramere der Untereinheiten GluA1-GluA4 [163]. Ionotrope Glutamaterezeptoren sind spannungsgesteuerte

Ionenkanäle. Wenn Glutamat bindet, kann es zum $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ Einstrom/ den Na^+ Ausstrom kommen und die Zelle depolarisiert. Es gibt auch metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR), die u.a. durch die Phosphoinositid-3-Kinase aktiviert werden. Über diese Rezeptoren bindet Glutamat, ein exzitatorischer Neurotransmitter, der vor allem im ZNS und PNS eine wichtige Rolle spielt [160]. Eine Veränderung der Signalübertragung mittels Glutamat ist vor allem bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen bekannt, wie Autismus, Schizophrenie, Depressionen und bipolare Störungen. Glutamat dient jedoch auch als Energiequelle für sich schnell teilende Zellen, wie Karzinomzellen oder Lymphozyten [160]. Sowohl iGluRs als auch mGluRs wurden bereits mit Malignomen in Verbindung gebracht. Beispielsweise wurde eine Überexpression von mGluR1 in Prostatakarzinomen festgestellt [160]. Ursachen für Malignomentstehung können Unterschiede in der Expression oder somatische Mutationen in iGluRs sein. So konnte zum Beispiel bei Prostatakarzinomen eine Überexpression von Glutamatrezeptoren festgestellt werden, während beim malignen Melanom eine Mutation auffiel. Patienten mit einem erhöhten Gleason-Score ($\text{GS}>8$) bei Prostatakarzinom zeigten sogar erhöhte Serum-Glutamaspiegel. Auch beim Mammakarzinom, beim malignen Melanom und beim Nierenzellkarzinom konnte festgestellt werden, dass eine Mutation von mGluR1 Wachstum und Progress der Malignoms fördert [160]. Der Einfluss der Glutamatrezeptoren ist auch für die Therapie von Karzinomen bedeutsam. Es konnte nachgewiesen, dass Riluzol, ein Medikament, welches normalerweise bei amyotropher Lateralsklerose verwendet wird, auch bei Zellen des Triple-negativen Mammakarzinoms das Zellwachstum hemmt [164]. *Luksch et al* hingegen zeigten, dass das Stilllegen des GluA4 die Zellproliferation und -mobilität förderte [163]. Bei Gliomen konnte durch Reduktion der GluA1 die Zellproliferation gehemmt werden [165]. *Priya et al* zeigten an Zellkulturen, dass es durch den Einfluss von Chemikalien zur Zelltransformation kommt. Außerdem untersuchten sie die zellulären und molekularbiologischen Mechanismen bei neoplastischen Zellveränderungen und konnten u.a. eine Überexpression von GRIA3 nachweisen [166]. Beim Pankreaskarzinom wurde GRIA3 als ein wichtiger Faktor bei der Tumorprogression ausgemacht [167]. An verschiedenen Zelllinien des Pankreaskarzinoms wurde die Wirkung des Gens untersucht. Ein Knockout führte zur Verringerung der S-Phase in den Zellen und zur gesteigerten G1-Phase und somit zur Hemmung des Zellzyklus. Während eine Überexpression von GRIA3 zu einer deutlichen Zellvermehrung führte. *Ripka et al* schlussfolgerten das die Proliferation der Tumorzellen durch GRIA3 durch eine verbesserte S-Phase verursacht wurde [167]. Außerdem stellten sie fest, dass eine GRIA3-Überexpression die Zellmigration fördert und die Zellen vor Apoptose schützt. Eine weitere Erkenntnis war, dass Glutamat die Zellviabilität verbesserte, während ein AMPAR-Antagonist diese hemmte. Die verschiedenen Glutamatrezeptoren haben demzufolge verschiedene Einflüsse auf Zellen. Bei GRIA3 handelt es sich vor allem um proliferative Einflüsse. Eine Überexpression von GRIA3 in AGCTs ohne FOXL2-Mutation könnte daher eine Ursache für Tumorentstehung und -wachstum sein.

5. Zusammenfassung

Granulosazelltumoren sind seltene Neoplasien des Ovars. Sie gehören zu der Gruppe der Keim-Strang-Stromatumoren und machen insgesamt nur 1-2% aller Ovarialneoplasien aus. Häufig werden sie auffällig durch ihre hormonelle Aktivität, die sie vom Ovarialkarzinom unterscheidet. Es gibt zwei Typen: Die adulten Granulosazelltumoren, die zu 95% mit einer Punktmutation des FOXL2 Gens C134W einhergehen und die juvenilen Granulosazelltumoren. Nachweise von Punktmutationen des FOXL2 Gens erfolgen auf Basis molekularbiologischer Untersuchungen. Die meisten Patientinnen erkranken in der 5. Lebensdekade. Eine Ausnahme bilden hier die juvenilen Granulosazelltumoren, Betroffene erkranken meist vor dem 20. Lebensjahr. Bislang wurden AGCTs und JGCTs vor allem anhand histopathologischer Merkmale unterschieden. Da der Großteil der Tumoren in frühen Tumorstadien entdeckt wird und die Rezidivrate geringer ist als bei Ovarialkarzinomen, gelten sie als potentiell maligne. Derzeit gibt es keine Faktoren, weder die Histologie, die Immunhistochemie [108] noch die FOXL2-Mutation, die anzeigen, ob es sich um einen eher benignen oder eher malignen Tumor handelt. Auch gibt es bislang nur wenige Prognosefaktoren, wie z.B. das Tumorstadium bei Erkrankung. Der wichtigste Teil der Therapie von Granulosazelltumoren ist derzeit die primäre Operation, da systemische Therapien aufgrund der meist niedrigen Proliferation der Tumoren nur bedingt wirken. Eine Identifizierung von Genen, die an der Krankheitsentstehung und eventuell -verlauf beteiligt sind, könnte für die Prognose und Therapie von entscheidender Bedeutung sein. Ziel der Arbeit war es daher zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen der Mutationsanalyse des FOXL2 Gens von Granulosazelltumoren mittels Pyrosequenzierung und der Expression in der Immunhistochemie besteht und ob die FOXL2- Mutation einen Einfluss auf die Prognose hat. Ein weiteres Ziel war es herauszufinden, ob man JGCTs und AGCTs durch die Immunhistochemie besser unterscheiden kann. Des Weiteren galt es herauszufinden, ob die immunhistochemische Expression anderer Proteine Einfluss auf die Prognose hat. Außerdem stellte sich die Frage, ob es weitere Gene gibt, die relevant sind für die Entstehung und den Krankheitsverlauf von GCTs. Um die vorliegenden Fragen zu beantworten, untersuchten wir Material von 61 Fällen, wobei es sich in 10 Fällen um Rezidivtumoren handelte. Somit führten wir unsere Untersuchungen an Materialien von 51 Patientinnen mit Granulosazelltumoren von den Jahren 1987 bis 2014 durch, die dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München vorlagen. Es handelte sich um 57 AGCTs und 4 JGCTs, an denen immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt wurden.

Die Untersuchungen ergaben, dass es keine Übereinstimmung in der immunhistochemischen FOXL2-Expression und dem Nachweis der FOXL2-Mutation gab, das heißt die immunhistochemische Untersuchung kann eine molekularbiologische Untersuchung nicht ersetzen. Außerdem galt es zu klären, ob eine FOXL2-Mutation Einfluss auf das Tumorstadium und somit auf das Überleben hat. Obwohl weder zwischen dem Mutationsstatus und dem Tumorstadium noch zwischen dem Mutationsstatus und dem Überleben eine signifikante Korrelation besteht, fällt auf, dass alle Fälle ohne Mutationsnachweis im Stadium I diagnostiziert wurden. Davon wiederum 75% im Stadium Ia. Bei allen Patientinnen, die in höheren Tumorstadien erkrankt waren, haben wir eine Mutation nachgewiesen. Es ist bereits bekannt, dass der FOXL2-Wildtyp eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Proliferation von Granulosazellen und bei der Förderung der Apoptose spielt [18, 52]. Auch konnte schon in früheren Studien belegt werden, dass eine FOXL2-Mutation ein ungünstiger Faktor ist [77, 83, 87], da die Patientin häufiger Rezidive haben und versterben. Eine Mutation des FOXL2 Gens kann also als prognostisch ungünstiger Faktor gesehen werden.

Auch zeigte sich bei unserer Studie der Trend, dass eine vermehrte Progesteronexpression in der Immunhistochemie ein negativer Prognosefaktor ist. Die vermehrte Progesteronexpression als negativen Prognosefaktor bei AGCTs beschrieben *Puechl et al* in einer Studie von 2019 [99]. Obwohl in unserer Studie der Großteil der Fälle (85,2%) Progesteron exprimierten, waren Fälle ohne Expression ausschließlich im Tumorstadium Ia zu finden und sie zeigten das längste Überleben. Patienten mit einer stärkeren Expression hingegen verstarben zu 56%. Wir konnten ebenfalls nachweisen, dass eine vermehrte Expression von Ki-67 als prognostischer Marker dienen kann. Frühere Studien beschrieben, dass Rezidivtumore eine erhöhte Ki-67-Expression aufweisen und, dass durch eine höhere Ki-67 Expression, das krankheitsfreie Intervall sowie das Überleben verkürzt wird [109, 110]. 65% der Patientinnen aus unserer Studie mit einer Ki-67-Expression von über 5% verstarben. Die Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier im Log-Rank-Test war hier signifikant ($p=0,000$). Das kürzeste Überleben (19 Monate) zeigte die einzige Patientin mit einer Ki-67-Expression über 20%. Einen weiteren Einfluss hat Ki-67 auf das Tumorstadium von Granulosazelltumoren, hohe Ki-67-Expressionen gehen mit einem höheren Tumorstadium einher [34, 111, 112]. Wir konnten in unserer Studie keine Korrelation zwischen Tumorstadium und Ki-67 Expression nachweisen. In einer breitgefächerten Genanalyse, bei der die Expression verschiedener Gene bei AGCTs ohne FOXL2-Mutation, AGCTs mit FOXL2-Mutation und JGCTs verglichen wurden, konnten wir feststellen, dass zwei Gene, PLA2G4A und PIK3R3, in allen drei Tumorentitäten signifikant exprimiert waren. PIK3R3 kodiert eines der Enzyme der Phosphoinositid-3-Kinasen. Bei verschiedenen Krebsarten konnte bereits ein Einfluss von PI3K auf die Kanzerogenese belegt werden [17, 113-117]. PIK3R3 ist an der Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges beteiligt. Dieser ist von Bedeutung für das Überleben von Tumorzellen, die Angiogenese, die Chemotherapieresistenz und die Entstehung von Metastasen [123]. Auch PLA2G4 konnte bei anderen Karzinomarten als ein Auslöser der Zellvermehrung und somit Tumorentstehung identifiziert werden. Die geschieht u.a. auch hier durch die Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges [125-128]. Somit konnten wir zwei potentiell kanzerogene Gene ausfindig machen, die bei Granulosazelltumoren vermehrt exprimiert sind. Weiterhin konnten wir feststellen, dass juvenile Granulosazelltumoren vermehrt Histon kodierende Gene exprimieren, HIST1H3G und HIST1H3B. Histone sind am Aufbau der Nukleosomenstruktur beteiligt und somit wichtig für Genexpression und viele andere DNA-abhängige Vorgänge wie Transkription, Replikation, Rekombination und Reparatur. Veränderungen der Nukleosomenstruktur können also die Transkription oder die Bindung von Regulationsfaktoren beeinflussen [109]. Bei anderen Krebsarten konnte die Veränderung der Anzahl der Histon Isoformen als eine Ursache der Tumorentstehung festgestellt werden, u.a. beim Mammakarzinom oder bei Endometriumkarzinom [131, 135]. Neben den Histonkodierenden Genen zeigte sich auch CCNB1 bei JGCTs vermehrt exprimiert. Dieses Gen kodiert Cyclin B1, welches bereits bei Mamma-, Kolon-, Lungen- und Prostatakarzinomen in erhöhter Expression festgestellt werden konnte. Eine erhöhte Expression ging bei Betroffenen häufig mit verkürzten krankheitsfreien Intervallen und einer verkürzten Lebenszeit einher [144-148]. Da diese Gene ausschließlich bei juvenilen GCTs vermehrt exprimiert waren, könnte dies vor allem für die Diagnostik und Unterscheidung juveniler und adulter GCTs von Bedeutung sein. CCNB1 bzw. Cyclin B1 könnte auch als prognostischer Marker bei juvenilen GCTs dienen. Zwei weitere Gene waren durch ihre vielfach erhöhte Expression gegenüber einer anderen Tumorentität auffällig: COL4A5 (20fach erhöht) und GRIA3 (19fach erhöht). Es handelt sich hierbei ebenfalls um Gene die bereits im Zusammenhang mit anderen Tumoren als prokanzerogen erkannt wurden. COL4A5 vor allem durch seine Wirkung auf die Angiogenese [151, 152, 154] und GRIA3 durch Förderung der Zellproliferation [166, 167]. Abschließend kann man sagen, dass eine FOXL2-Mutation sowie eine starke Progesteronexpression in der Immunhistochemie bei AGCTs und eine starke Ki-67-Expression bei AGCTs und JGCTs als prognostisch ungünstige Marker gelten können. Der

PI3K/AKT Signalweg, hierbei vor allem PIK3R3 und PLA2G4A, spielt eine Rolle bei der Tumorgenese von Granulosazelltumoren, dies könnte eventuell für Therapien von Bedeutung sein. Des Weiteren sollte man in weitergehenden Studien prüfen, ob HIST1H3G und HIST1H3B zur Diagnostik juveniler GCTs in Betracht kommen und ob CCNB1 ein möglicher Prognosefaktor bei juvenilen GCTs ist.

6. Anhang zu Kapitel 2 Methoden und Material

6.1 Verbrauchsmaterialien

Safe Seal-Tips professional 1250µl	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, D)
Safe Seal-Tips professional 10µl	
Skalpellklingen steril Fig.28	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Safe Seal Tube 1,5ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
Safe Seal micro tube 2ml	
Multiply®-µ Strip Pro 8er Kette	
One Touch Barrier Sterile Pipettenspitzen 1-20µl	Sorenson Bioscience, Inc (Murray, USA)
One Touch Barrier Sterile Pipettenspitzen 1-330µl	

6.2 Chemikalien

3285 FOXL-2-S4 5'-cgctggaccggcctg-3'	biomers.net GmbH (Um, Deutschland)
A3284 FOXL-2-R6~Bio 5'-gttgcccttctcgaacatg-3'	
A3283 FOXL-2-F2 5'-aacctcagcctcaacgagtg-3'	
SeaKem LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, D)
Glycerin ROTIPURAN® ≥86 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Streptavidin Sepharose High Performance, Beads	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Aqua Bidest	H.Kerndl GmbH (Weißfeld, D)
nCounter® PanCancer Pathways Panel	NanoString Technologies (Seattle, USA)
Human Genomic DNA:Male	Promega (Madison, USA)
QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	Quiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
<ul style="list-style-type: none">• Proteinase K Solution• ATE Buffer• ATL Buffer• Buffer AL• Buffer AW2 Wash Buffer 2• Buffer AW 1 Wash Buffer 1• QIAamp MinElute Column	
PyroMark®Gold Q24 Reagents (5x24)	
<ul style="list-style-type: none">• PyroMark® dTTP• PyroMark® dGTP• PyroMark® dCTP• PyroMark® dATPαS• PyroMark® Substrate Mixture• PyroMark® Enzyme Mixture	
PyroMark® Binding Buffer	

PyroMark® Annealing Buffer
PyroMark® Deaturation Solution
Wash Buffer, 10x
Nuclease-Free Water

High Pure FFPE RNA Isolation Kit

Roche (Basel, Schweiz)

Gene Ruler Low Range Ladder
6xDNA Loading Dye
MgCl₂ 25mM L
dNTP Mix
Buffer Hot Start L
Maxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase 5U/μl

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

6.3 Geräte

Multi-Image II FC Light Cabinet

Alpha Innotech (San Leandro, USA)

Colibri Microvolume Spectrophotometer

Berthold Technologies GmbH & Co.KG
(Bad Wildbad, Deutschland)

Thermoshaker TS 100

Biosan (Riga, Lettland)

Waschstation

Biotage (Uppsala, Schweden)

ThermoMixer® comfort
VAPO.Protect Mastercycler® pro
Centrifuge 5415R
Pipetten

Eppendorf GmbH (Hamburg, D)

LHG Heizplatte Präzitherm

Harry Gestigkeit GmbH (Düsseldorf, D)

Mikrotom

Jung AG (Heidelberg, Deutschland)

digitales Netzwerk-Mikroskop Leica DMD108
Optisches Mikroskop Leica DM2500

Leica (Wetzlar, Deutschland)

Mikrowelle

Miele (Gütersloh, Deutschland)

Prep Station
nCounter Digital Analyzer
QIACube Quiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Pyromark Q24 Sequenzierer
PyroMark Q24 Cartridge

NanoString Technologies (Seattle, USA)

Ventana Benchmark® XT
Roche LightCycler®

Roche (Basel, Schweiz)

Veriti Thermal Cycler
Variomag Monoshake

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Dry Vakuum Pump/Kompressor 2511

Welch Vacuum (Mt. Prospect, USA)

Zeiss Lichtmikroskop

Zeiss (Oberkochen, Deutschland)

6.4 Software

Gerätesoftware:

Gel-Fotos: AlphaEaseFC (FluorChem FC2)

nSolver™ Analysis Software

Leica Microscope Imaging Software

QIACube, PCR-Cycler: Pyromark Q24

Allgemeine Software:

Endnote, Open office, SPSS

7. Literaturverzeichnis

1. Kirchner, T., Müller- Hermelink, H.K. And Roessner, A. , *Kurzlehrbuch Pathologie*. 12. ed. 2014, Munich.
2. Robert- Koch- Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, *Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom)*. (cited 03/06/2020); Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Eierstockkrebs/eierstockkrebs_node.html.
3. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
4. Krebsgesellschaft, D. *Eierstockskrebs*. 2020 03/06/2020; Available from: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/eierstockkrebs.html>.
5. AWMF. *S3-Leitlinie- Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren*. 2019 01/2019; Version 3.0- Januar 2019:[Available from: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Ovarialkarzinom/Version_3_2018/_LL_Ovarialkarzinom_Langversion_3.0.pdf.
6. Prof. Dr. med., D.h.c.Kaufmann, M., Prof. Dr. med., Dr. h. c. Serban D. Costa, Prof. Dr. med. Anton Scharl *Die Gynäkologie*. Vol. 3. 2013: Springer.
7. Klöppel, G., et al., *Pathologie*. Mamma, weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen. 2013.
8. Prof. Dr. med. Edgar Petru, P.D.m.W.J., Prof. Dr. med. Daniel Fink, Prof. Dr. med. Ossi Köchli *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. Vol. 4. 2014: Springer Verlag.
9. Kurman, R.J., et al., *WHO Classification of Tumors of Female Reproductive Organs*. 4 ed. Vol. 6. 2014, Lyon.
10. Mutter, G.L. and J. Prat, *Pathology of the female reproductive tract*. 3. ed. 2014.
11. Rokitansky, C.V., *Über Abnormalitäten des Corpus luteum*. Wien Med Ztg, 1859. **1**: p. 253-254.
12. Benayoun, B.A., et al., *Functional exploration of the adult ovarian granulosa cell tumor-associated somatic FOXL2 mutation p.Cys134Trp (c.402C>G)*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8789.
13. Zhang, M., et al., *Prognostic factors responsible for survival in sex cord stromal tumors of the ovary--an analysis of 376 women*. Gynecol Oncol, 2007. **104**(2): p. 396-400.
14. Krebsregisterdaten, R.-K.-I.Z.f. *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 2016; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c00_97_krebs_gesamt.pdf?__blob=publicationFile.
15. Hans-Joachim Schmoll, K.H., Kurt Possinge, *Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie*. 4 ed. Vol. 1. 2006, Berlin, Heidelberg: Spriger Verlag.
16. Bryk, S., et al., *Incidence and occupational variation of ovarian granulosa cell tumours in Finland, Iceland, Norway and Sweden during 1953-2012: a longitudinal cohort study*. Bjog, 2017. **124**(1): p. 143-149.
17. Jamieson, S. and P.J. Fuller, *Molecular pathogenesis of granulosa cell tumors of the ovary*. Endocr Rev, 2012. **33**(1): p. 109-44.

18. Farkkila, A., et al., *Pathogenesis and treatment of adult-type granulosa cell tumor of the ovary*. Ann Med, 2017. **49**(5): p. 435-447.
19. Schöller, D.P.R. *Pschyrembel online- Granulosazellen*. 2016 04/2016; Available from: <https://www.pschyrembel.de/granulosazellen/K0948/doc/>.
20. Kottarathil, V.D., et al., *Recent advances in granulosa cell tumor ovary: a review*. Indian J Surg Oncol, 2013. **4**(1): p. 37-47.
21. Liu, Z., et al., *FOXO1/3 and PTEN Depletion in Granulosa Cells Promotes Ovarian Granulosa Cell Tumor Development*. Molecular endocrinology (Baltimore, Md.), 2015. **29**(7): p. 1006-1024.
22. Schmalefeld, B., Prof. Dr., *Manual. Maligne Ovarialtumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 10. ed. 2014, Munich.
23. Vyas, M.N., L. Manjeera, and S. Rai, *Delayed menopause due to ovarian granulosa cell tumour*. J Clin Diagn Res, 2013. **7**(10): p. 2306-7.
24. Kumar, S., et al., *Ovarian stromal tumor with minor sex cord elements with coexistent endometrial carcinoma*. Indian J Med Paediatr Oncol, 2013. **34**(1): p. 44-6.
25. Ranganath, R., et al., *Clinical and pathologic prognostic factors in adult granulosa cell tumors of the ovary*. Int J Gynecol Cancer, 2008. **18**(5): p. 929-33.
26. Hashemipour, M., et al., *Granulosa cell tumor in a six-year-old girl presented as precocious puberty*. J Res Med Sci, 2010. **15**(4): p. 240-2.
27. Lee, I.H., et al., *Clinicopathologic characteristics of granulosa cell tumors of the ovary: a multicenter retrospective study*. J Gynecol Oncol, 2011. **22**(3): p. 188-95.
28. Kim, S.H. and S.H. Kim, *Granulosa cell tumor of the ovary: common findings and unusual appearances on CT and MR*. J Comput Assist Tomogr, 2002. **26**(5): p. 756-61.
29. Professor Dr. med. Ursus-Nikolaus Riede, P.D.m.M.W., Professor Dr. Dr. h.c. Nikolaus Freudenberg *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie* 2009: Springer Verlag
30. Riede, U.-N. and H.-E. Schaefer, *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. 3. ed. 1993.
31. R., B., et al., *Pathologie. Weibliches Genitale- Mamma- Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen- Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen- Tumoren des Kindesalters- Endokrine Organe*. 2. ed. Vol. 4. 1997, Wiesbaden.
32. Zheng, W., B.Z. Senturk, and V. Parkash, *Inhibin immunohistochemical staining: a practical approach for the surgical pathologist in the diagnoses of ovarian sex cord-stromal tumors*. Adv Anat Pathol, 2003. **10**(1): p. 27-38.
33. Hutton, S.M., et al., *Immunohistochemical expression and prognostic significance of oestrogen receptor-alpha, oestrogen receptor-beta, and progesterone receptor in stage I adult-type granulosa cell tumour of the ovary*. Pathology, 2012. **44**(7): p. 611-6.
34. Balan, R.A., et al., *Immunohistochemical significance of ER alpha, inhibin A, calretinin, and Ki67 expression in granulosa cell ovarian tumors*. Rom J Morphol Embryol, 2017. **58**(3): p. 753-760.
35. Lim, D. and E. Oliva, *Ovarian sex cord-stromal tumours: an update in recent molecular advances*. Pathology, 2018. **50**(2): p. 178-189.
36. Bai, S., et al., *SALL4 and SF-1 are sensitive and specific markers for distinguishing granulosa cell tumors from yolk sac tumors*. Int J Surg Pathol, 2013. **21**(2): p. 121-5.
37. Cathro, H.P. and M.H. Stoler, *The utility of calretinin, inhibin, and WT1 immunohistochemical staining in the differential diagnosis of ovarian tumors*. Hum Pathol, 2005. **36**(2): p. 195-201.

38. Choi, Y.L., H.S. Kim, and G. Ahn, *Immunoexpression of inhibin alpha subunit, inhibin/activin betaA subunit and CD99 in ovarian tumors*. Arch Pathol Lab Med, 2000. **124**(4): p. 563-9.
39. Sakr, S., et al., *Granulosa Cell Tumors: Novel Predictors of Recurrence in Early-stage Patients*. Int J Gynecol Pathol, 2017. **36**(3): p. 240-252.
40. McCluggage, W.G., M. McKenna, and H.A. McBride, *CD56 is a sensitive and diagnostically useful immunohistochemical marker of ovarian sex cord-stromal tumors*. Int J Gynecol Pathol, 2007. **26**(3): p. 322-7.
41. Shah, S.P., et al., *Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary*. N Engl J Med, 2009. **360**(26): p. 2719-29.
42. Seagle, B.L., et al., *Ovarian granulosa cell tumor: A National Cancer Database study*. Gynecol Oncol, 2017. **146**(2): p. 285-291.
43. du Bois, A., S. Kümmel, and P. Harter. *Therapiestandarts 2019*. 2019 [cited 2019; Available from: https://kem-med.com/wp-content/uploads/2019/02/Therapiestandard_2019_komplett.pdf].
44. Taira, Y., et al., *Successful treatment of adult-type granulosa cell tumor of the ovary by palliative radiotherapy*. J Obstet Gynaecol Res, 2012. **38**(2): p. 461-5.
45. Brown, J., et al., *Efficacy and safety of bevacizumab in recurrent sex cord-stromal ovarian tumors: results of a phase 2 trial of the Gynecologic Oncology Group*. Cancer, 2014. **120**(3): p. 344-51.
46. Sehouli, J., et al., *Granulosa cell tumor of the ovary: 10 years follow-up data of 65 patients*. Anticancer Res, 2004. **24**(2c): p. 1223-9.
47. Nakai, H., et al., *Clinical Determinants Affecting Indications for Surgery and Chemotherapy in Recurrent Ovarian Granulosa Cell Tumor*. Healthcare (Basel), 2019. **7**(4).
48. Ayhan, A., et al., *Prognostic factors in adult granulosa cell tumors of the ovary: a retrospective analysis of 80 cases*. J Gynecol Oncol, 2009. **20**(3): p. 158-63.
49. Kinra, P. and A. Malik, *Ki 67: Are we counting it right?* Indian J Pathol Microbiol, 2020. **63**(1): p. 98-99.
50. Kalfa, N., et al., *Extinction of FOXL2 expression in aggressive ovarian granulosa cell tumors in children*. Fertil Steril, 2007. **87**(4): p. 896-901.
51. Science, W.I.o. 09/30/2015]; Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXL2>.
52. Li, J., et al., *The molecular mechanism of ovarian granulosa cell tumors*. J Ovarian Res, 2018. **11**(1): p. 13.
53. Cocquet, J., et al., *Evolution and expression of FOXL2*. J Med Genet, 2002. **39**(12): p. 916-21.
54. Pisarska, M.D., G. Barlow, and F.T. Kuo, *Minireview: roles of the forkhead transcription factor FOXL2 in granulosa cell biology and pathology*. Endocrinology, 2011. **152**(4): p. 1199-208.
55. Schmidt, D., et al., *The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance*. Development, 2004. **131**(4): p. 933-42.
56. Uhlenhaut, N.H. and M. Treier, *Forkhead transcription factors in ovarian function*. Reproduction, 2011. **142**(4): p. 489-95.
57. Bessiere, L., et al., *A Hot-spot of In-frame Duplications Activates the Oncoprotein AKT1 in Juvenile Granulosa Cell Tumors*. EBioMedicine, 2015. **2**(5): p. 421-31.
58. Cheng, J.C., C. Klausen, and P.C. Leung, *Overexpression of wild-type but not C134W mutant FOXL2 enhances GnRH-induced cell apoptosis by increasing GnRH receptor expression in human granulosa cell tumors*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e55099.

59. Jamieson, S., et al., *The FOXL2 C134W mutation is characteristic of adult granulosa cell tumors of the ovary*. *Mod Pathol*, 2010. **23**(11): p. 1477-85.
60. McTavish, K.J., et al., *Granulosa cell tumor mutant FOXL2C134W suppresses GDF-9 and activin A-induced follistatin transcription in primary granulosa cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. **372**(1-2): p. 57-64.
61. Kommoss, F. and H.A. Lehr, [*Sex cord-stromal tumors of the ovary : Current aspects with a focus on granulosa cell tumors, Sertoli-Leydig cell tumors, and gynandroblastomas*]. *Pathologe*, 2019. **40**(1): p. 61-72.
62. Kraus, F., et al., *FOXL2 homozygous genotype and chromosome instability are associated with recurrence in adult granulosa cell tumors of the ovary*. *Oncotarget*, 2020. **11**(4): p. 419-428.
63. Anttonen, M., et al., *FOXL2, GATA4, and SMAD3 co-operatively modulate gene expression, cell viability and apoptosis in ovarian granulosa cell tumor cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e85545.
64. Kim, J.H., et al., *Differential apoptotic activities of wild-type FOXL2 and the adult-type granulosa cell tumor-associated mutant FOXL2 (C134W)*. *Oncogene*, 2011. **30**(14): p. 1653-63.
65. Rosario, R., P.A. Cohen, and A.N. Shelling, *The role of FOXL2 in the pathogenesis of adult ovarian granulosa cell tumours*. *Gynecol Oncol*, 2014. **133**(2): p. 382-7.
66. Geiss, G.K., et al., *Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(3): p. 317-25.
67. Pharma-Zeitung.de. *Eine in The Journal of Clinical Oncology veröffentlichte Studie weist Vorteile von NanoStrings Prosigna™ Brustkrebsanalyse nach*. 2013; Available from: <http://www.pharma-zeitung.de/eine-in-the-journal-of-clinical-oncology-veroeffent.5805.php>.
68. Wang, H., et al., *NanoStringDiff: a novel statistical method for differential expression analysis based on NanoString nCounter data*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(20): p. e151.
69. NanoStringTechnologies. *Direct Digital Detection with nCounter® Technology*. 2020; Available from: <http://www.nanostring.com/applications/technology>.
70. Bellmunt, J., et al., *Somatic Copy Number Abnormalities and Mutations in PI3K/AKT/mTOR Pathway Have Prognostic Significance for Overall Survival in Platinum Treated Locally Advanced or Metastatic Urothelial Tumors*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0124711.
71. Cesano, A., *nCounter((R)) PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA)*. *J Immunother Cancer*, 2015. **3**: p. 42.
72. NanoStringTechnologies. *nCounter® PanCancer Pathways Panel*. 2020; Available from: <http://www.nanostring.com/products/pancancer>.
73. Veldman-Jones, M.H., et al., *Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical Samples*. *Cancer Res*, 2015. **75**(13): p. 2587-93.
74. Remmele, W. and H.E. Stegner, [*Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue*]. *Pathologe*, 1987. **8**(3): p. 138-40.
75. Qiagen. *Pyrosequencing Technology and Plattform overview*. [cited 2016 02/23/2016]; Available from: <https://www.qiagen.com/de/service-and-support/learning-hub/technologies-and-research-topics/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/>.

76. Technologies, N. *Gene Expression Assay User Manual*. 2016 [cited 2016 02/25/2016]; Available from:
http://www.nanostring.com/media/pdf/MAN_nCounter_Gene_Expression_Assay.pdf.
77. Zannoni, G.F., et al., *FOXL2 molecular status in adult granulosa cell tumors of the ovary: A study of primary and metastatic cases*. *Oncol Lett*, 2016. **12**(2): p. 1159-1163.
78. Sekkate, S., et al., *Ovarian granulosa cell tumors: a retrospective study of 27 cases and a review of the literature*. *World J Surg Oncol*, 2013. **11**: p. 142.
79. Bompas, E., et al., [*Granulosa cell tumour: review of the literature*]. *Bull Cancer*, 2000. **87**(10): p. 709-14.
80. Mayr, D., et al., *Characteristic pattern of genetic aberrations in ovarian granulosa cell tumors*. *Mod Pathol*, 2002. **15**(9): p. 951-7.
81. Dridi, M., et al., *Granulosa Cell Tumor of the Ovary: A Retrospective Study of 31 Cases and a Review of the Literature*. *Int J Surg Oncol*, 2018. **2018**: p. 4547892.
82. Yu, S., et al., *Metastasis of the liver with a granulosa cell tumor of the ovary: A case report*. *Oncol Lett*, 2015. **9**(2): p. 816-818.
83. Yanagida, S., et al., *Clinical and genetic analysis of recurrent adult-type granulosa cell tumor of the ovary: Persistent preservation of heterozygous c.402C>G FOXL2 mutation*. *PLoS One*, 2017. **12**(6): p. e0178989.
84. Rebstock, L.E., et al., [*Granulosa cell tumor of the ovary: retrospective study of 17 cases*]. *Gynecol Obstet Fertil*, 2014. **42**(5): p. 331-3.
85. Kim, T., et al., *FOXL2 mutation in granulosa-cell tumours of the ovary*. *Histopathology*, 2010. **56**(3): p. 408-10.
86. Buza, N., S. Wong, and P. Hui, *FOXL2 Mutation Analysis of Ovarian Sex Cord-Stromal Tumors: Genotype-Phenotype Correlation With Diagnostic Considerations*. *Int J Gynecol Pathol*, 2017.
87. D'Angelo, E., et al., *Prognostic significance of FOXL2 mutation and mRNA expression in adult and juvenile granulosa cell tumors of the ovary*. *Mod Pathol*, 2011. **24**(10): p. 1360-7.
88. Alexiadis, M., et al., *Transcriptomic analysis of stage 1 versus advanced adult granulosa cell tumors*. *Oncotarget*, 2016. **7**(12): p. 14207-19.
89. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
90. Koukourakis, G.V., et al., *Granulosa cell tumor of the ovary: tumor review*. *Integr Cancer Ther*, 2008. **7**(3): p. 204-15.
91. Burns, K.A. and K.S. Korach, *Estrogen receptors and human disease: an update*. *Arch Toxicol*, 2012. **86**(10): p. 1491-504.
92. Farinola, M.A., et al., *Estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression in ovarian adult granulosa cell tumors and Sertoli-Leydig cell tumors*. *Int J Gynecol Pathol*, 2007. **26**(4): p. 375-82.
93. Ciucci, A., et al., *Estrogen receptor beta: Potential target for therapy in adult granulosa cell tumors?* *Gynecol Oncol*, 2018. **150**(1): p. 158-165.
94. Kim, S.Y., *Insights into granulosa cell tumors using spontaneous or genetically engineered mouse models*. *Clin Exp Reprod Med*, 2016. **43**(1): p. 1-8.
95. Fan, X., et al., *Gonadotropin-positive pituitary tumors accompanied by ovarian tumors in aging female ERbeta^{-/-} mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(14): p. 6453-8.
96. Arias-Pulido, H., et al., *Estrogen and progesterone receptor status and outcome in epithelial ovarian cancers and low malignant potential tumors*. *Gynecol Oncol*, 2009. **114**(3): p. 480-5.

97. Lee, P., et al., *Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2005. **96**(3): p. 671-7.
98. Friberg, P.A., D.G. Larsson, and H. Billig, *Dominant role of nuclear progesterone receptor in the control of rat periovulatory granulosa cell apoptosis*. *Biol Reprod*, 2009. **80**(6): p. 1160-7.
99. Puechl, A.M., et al., *The association between progesterone receptor expression and survival in women with adult granulosa cell tumors*. *Gynecol Oncol*, 2019. **153**(1): p. 74-79.
100. Mom, C.H., et al., *Granulosa cell tumors of the ovary: the clinical value of serum inhibin A and B levels in a large single center cohort*. *Gynecol Oncol*, 2007. **105**(2): p. 365-72.
101. Ala-Fossi, S.L., et al., *Inhibin A, B and pro-alphaC in serum and peritoneal fluid in postmenopausal patients with ovarian tumors*. *Eur J Endocrinol*, 2000. **142**(4): p. 334-9.
102. Deavers, M.T., et al., *Ovarian sex cord-stromal tumors: an immunohistochemical study including a comparison of calretinin and inhibin*. *Mod Pathol*, 2003. **16**(6): p. 584-90.
103. Hildebrandt, R.H., R.V. Rouse, and T.A. Longacre, *Value of inhibin in the identification of granulosa cell tumors of the ovary*. *Hum Pathol*, 1997. **28**(12): p. 1387-95.
104. Yousefi, Z., et al., *Granulosa Cell – Stromal Tumors: An Immunohistochemical Study Including Comparison of Calretinin and Inhibin*. *Iranian Journal of Pathology*, 2009. **4**(4): p. 172-176.
105. Nosov, V., et al., *Predictors of recurrence of ovarian granulosa cell tumors*. *Int J Gynecol Cancer*, 2009. **19**(4): p. 628-33.
106. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
107. Costa, M.J., et al., *Transformation in recurrent ovarian granulosa cell tumors: Ki67 (MIB-1) and p53 immunohistochemistry demonstrates a possible molecular basis for the poor histopathologic prediction of clinical behavior*. *Hum Pathol*, 1996. **27**(3): p. 274-81.
108. Guleria, P., et al., *A clinicopathological study of granulosa cell tumors of the ovary: Can morphology predict prognosis?* *Indian J Pathol Microbiol*, 2020. **63**(1): p. 53-59.
109. King, L.A., et al., *Mitotic count, nuclear atypia, and immunohistochemical determination of Ki-67, c-myc, p21-ras, c-erbB2, and p53 expression in granulosa cell tumors of the ovary: mitotic count and Ki-67 are indicators of poor prognosis*. *Gynecol Oncol*, 1996. **61**(2): p. 227-32.
110. Volkova, A.V., et al., *[The role of Ki-67, mutant suppressor gene p53 and low mitotic levels in defining the prognosis for adult granulosa cell tumor of the ovary]*. *Vopr Onkol*, 2005. **51**(4): p. 455-9.
111. Rajagopal, L. and S. Ramesh, *Role of Ki 67 as a prognostic marker and the diagnostic value of immunohistochemistry in ovarian granulosa cell tumors*. 2016. **7**: p. B565-B574.
112. Sonoyama, A., et al., *Aggressive Granulosa Cell Tumor of the Ovary with Rapid Recurrence: a Case Report and Review of the Literature*. *Kobe J Med Sci*, 2015. **61**(4): p. E109-14.
113. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(8): p. 606-19.

114. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(8): p. 1263-84.
115. Lin, J., et al., *The phosphatidylinositol 3'-kinase pathway is a dominant growth factor-activated cell survival pathway in LNCaP human prostate carcinoma cells*. *Cancer Res*, 1999. **59**(12): p. 2891-7.
116. Fry, M.J., *Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play?* *Breast Cancer Res*, 2001. **3**(5): p. 304-12.
117. Chen, J., et al., *Identification of key candidate genes involved in melanoma metastasis*. *Mol Med Rep*, 2019. **20**(2): p. 903-914.
118. Zhou, J., et al., *Genetic and bioinformatic analyses of the expression and function of PI3K regulatory subunit PIK3R3 in an Asian patient gastric cancer library*. *BMC Med Genomics*, 2012. **5**: p. 34.
119. Hu, J., et al., *A peptide inhibitor derived from p55PIK phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit: a novel cancer therapy*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(12): p. 3719-28.
120. Ibrahim, S., et al., *PIK3R3 promotes chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer through PIK3R3/NF-kB/TP pathway*. *Cancer Biol Ther*, 2018. **19**(3): p. 222-229.
121. Zhang, L., et al., *Integrative genomic analysis of phosphatidylinositol 3'-kinase family identifies PIK3R3 as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(18 Pt 1): p. 5314-21.
122. Bittinger, S., M. Alexiadis, and P.J. Fuller, *Expression status and mutational analysis of the PTEN and PI3K subunit genes in ovarian granulosa cell tumors*. *Int J Gynecol Cancer*, 2009. **19**(3): p. 339-42.
123. Li, W., et al., *Transcriptome Analysis Reveals Key Genes and Pathways Associated with Metastasis in Breast Cancer*. *Onco Targets Ther*, 2020. **13**: p. 323-335.
124. Kim, S.Y., et al., *Constitutive Activation of PI3K in Oocyte Induces Ovarian Granulosa Cell Tumors*. *Cancer Res*, 2016. **76**(13): p. 3851-61.
125. Bazhan, D. and M.S. Khaniani, *Supplementation with omega fatty acids increases the mRNA expression level of PLA2G4A in patients with gastric cancer*. *J Gastrointest Oncol*, 2018. **9**(6): p. 1176-1183.
126. Wang, D. and R.N. Dubois, *Eicosanoids and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(3): p. 181-93.
127. Zhang, X., et al., *Reduced group IVA phospholipase A2 expression is associated with unfavorable outcome for patients with gastric cancer*. *Med Oncol*, 2013. **30**(1): p. 454.
128. Patel, M.I., et al., *Cytosolic phospholipase A2-alpha: a potential therapeutic target for prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(24): p. 8070-9.
129. Kim, E., et al., *Anti-vascular effects of the cytosolic phospholipase A2 inhibitor AVX235 in a patient-derived basal-like breast cancer model*. *BMC Cancer*, 2016. **16**: p. 191.
130. Marzluff, W.F., et al., *The human and mouse replication-dependent histone genes*. *Genomics*, 2002. **80**(5): p. 487-98.
131. Singh, R., et al., *Replication-dependent histone isoforms: a new source of complexity in chromatin structure and function*. *Nucleic Acids Res*, 2018. **46**(17): p. 8665-8678.
132. NCBI. *H3C8 H3 clustered histone 8 [Homo sapiens (human)]* 2020 09/02/2020 [cited 2020 02/26/2020]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8355>.
133. Vardabasso, C., et al., *Histone variants: emerging players in cancer biology*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(3): p. 379-404.
134. Mendiratta, S., A. Gatto, and G. Almouzni, *Histone supply: Multitiered regulation ensures chromatin dynamics throughout the cell cycle*. *J Cell Biol*, 2019. **218**(1): p. 39-54.

135. Shah, S., et al., *Histone H2A isoforms: Potential implications in epigenome plasticity and diseases in eukaryotes*. J Biosci, 2020. **45**.
136. Agarwal, R., et al., *Integrative analysis of cyclin protein levels identifies cyclin b1 as a classifier and predictor of outcomes in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(11): p. 3654-62.
137. Li, J.Q., et al., *Cyclin B1, unlike cyclin G1, increases significantly during colorectal carcinogenesis and during later metastasis to lymph nodes*. Int J Oncol, 2003. **22**(5): p. 1101-10.
138. Soria, J.C., et al., *Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication*. Cancer Res, 2000. **60**(15): p. 4000-4.
139. Mashal, R.D., et al., *Expression of cell cycle-regulated proteins in prostate cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(18): p. 4159-63.
140. Ye, C., et al., *Prognostic role of cyclin B1 in solid tumors: a meta-analysis*. Oncotarget, 2017. **8**(2): p. 2224-2232.
141. Liu, W., et al., *Identification of genes associated with cancer progression and prognosis in lung adenocarcinoma: Analyses based on microarray from Oncomine and The Cancer Genome Atlas databases*. Mol Genet Genomic Med, 2019. **7**(2): p. e00528.
142. Zhang, H., et al., *Effect of CCNB1 silencing on cell cycle, senescence, and apoptosis through the p53 signaling pathway in pancreatic cancer*. J Cell Physiol, 2018. **234**(1): p. 619-631.
143. Li, B., et al., *Regulating the CCNB1 gene can affect cell proliferation and apoptosis in pituitary adenomas and activate epithelial-to-mesenchymal transition*. Oncol Lett, 2019. **18**(5): p. 4651-4658.
144. Zheng, H., et al., *Nuclear cyclin B1 is overexpressed in low-malignant-potential ovarian tumors but not in epithelial ovarian cancer*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **201**(4): p. 367.e1-6.
145. Wei, S., et al., *Exploration of the sequential gene changes in epithelial ovarian cancer induced by carboplatin via microarray analysis*. Mol Med Rep, 2017. **16**(3): p. 3155-3160.
146. Nimeus-Malmstrom, E., et al., *Cyclin B1 is a prognostic proliferation marker with a high reproducibility in a population-based lymph node negative breast cancer cohort*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 961-7.
147. Suzuki, T., et al., *Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor*. Cancer Sci, 2007. **98**(5): p. 644-51.
148. Fang, Y., et al., *Cyclin b1 suppresses colorectal cancer invasion and metastasis by regulating e-cadherin*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126875.
149. Savige, J., et al., *Alport Syndrome in Women and Girls*. Clin J Am Soc Nephrol, 2016. **11**(9): p. 1713-20.
150. Xiao, Q., et al., *Minor Type IV Collagen alpha5 Chain Promotes Cancer Progression through Discoidin Domain Receptor-1*. PLoS Genet, 2015. **11**(5): p. e1005249.
151. Khoshnoodi, J., V. Pedchenko, and B.G. Hudson, *Mammalian collagen IV*. Microsc Res Tech, 2008. **71**(5): p. 357-70.
152. Burnier, J.V., et al., *Type IV collagen-initiated signals provide survival and growth cues required for liver metastasis*. Oncogene, 2011. **30**(35): p. 3766-83.
153. Noel, A., et al., *Enhancement of tumorigenicity of human breast adenocarcinoma cells in nude mice by matrigel and fibroblasts*. Br J Cancer, 1993. **68**(5): p. 909-15.
154. Sund, M., L. Xie, and R. Kalluri, *The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumor angiogenesis*. Apmsis, 2004. **112**(7-8): p. 450-62.

155. Bao, B., et al., *Identification of Subtype-Specific Three-Gene Signature for Prognostic Prediction in Diffuse Type Gastric Cancer*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 1243.
156. Ikeda, K., et al., *Loss of expression of type IV collagen alpha5 and alpha6 chains in colorectal cancer associated with the hypermethylation of their promoter region*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(3): p. 856-65.
157. Dehan, P., et al., *Loss of type IV collagen alpha 5 and alpha 6 chains in human invasive prostate carcinomas*. *Am J Pathol*, 1997. **151**(4): p. 1097-104.
158. Traynelis, S.F., et al., *Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function*. *Pharmacological reviews*, 2010. **62**(3): p. 405-496.
159. Davies, B., et al., *A point mutation in the ion conduction pore of AMPA receptor GRIA3 causes dramatically perturbed sleep patterns as well as intellectual disability*. *Human molecular genetics*, 2017. **26**(20): p. 3869-3882.
160. Willard, S.S. and S. Koochekpour, *Glutamate signaling in benign and malignant disorders: current status, future perspectives, and therapeutic implications*. *Int J Biol Sci*, 2013. **9**(7): p. 728-42.
161. Hinoi, E., et al., *Glutamate signaling in peripheral tissues*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(1): p. 1-13.
162. Tachibana, N., et al., *Expression of various glutamate receptors including N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) in an ovarian teratoma removed from a young woman with anti-NMDAR encephalitis*. *Intern Med*, 2010. **49**(19): p. 2167-73.
163. Luksch, H., et al., *Silencing of selected glutamate receptor subunits modulates cancer growth*. *Anticancer research*, 2011. **31**(10): p. 3181-3192.
164. Speyer, C., et al., *Metabotropic Glutamate Receptor-1: A potential therapeutic target for the treatment of breast cancer*. *Breast cancer research and treatment*, 2011. **132**: p. 565-73.
165. de Groot, J.F., et al., *Knockdown of GluR1 expression by RNA interference inhibits glioma proliferation*. *J Neurooncol*, 2008. **88**(2): p. 121-33.
166. Priya, S., et al., *Dysregulation of pathways involved in the processing of cancer and microenvironment information in MCA + TPA transformed C3H/10T1/2 cells*. In *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2013. **49**(4): p. 295-305.
167. Ripka, S., et al., *Glutamate receptor GRIA3--target of CUX1 and mediator of tumor progression in pancreatic cancer*. *Neoplasia*, 2010. **12**(8): p. 659-67.
168. Quiagen. *QIAcube Connect*. [cited 2016 03/18/2016]; Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/instruments-and-automation/nucleic-acid-purification/qiacube-connect/#orderinginformation>.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der bösartigen Neubildungen der Eierstöcke nach histologischem Typ in Deutschland (ohne Saarland) 2015-2016 [2].....	1
Abb. 2: Follikelentwicklung im Ovar im Verlauf des Zyklus [19].....	5
Abbildung 3: Gesamtüberleben.....	14
Abbildung 4: Häufigkeiten der verschiedenen Tumorstadien.....	15
Abbildung 5: TMA Block 1	
Abbildung 6: TMA Block 2	15
Abbildung 7: Übersicht TMA Block 1: ER alpha.....	16
Abbildung 8: Übersicht TMA Block 1: PR.....	16
Abbildung 9: Übersicht TMA Block 1: Inhibin.....	17
Abbildung 10: Übersicht TMA Block 1: Ki-67	17
Abbildung 11: Übersicht TMA Block 1: FOXL2	18
Abb. 12: keine Farbreaktion 40fache Vergrößerung	
Abb. 13: leichte Farbreaktion 40fache Vergrößerung.....	19
Abb. 14: mäßige Farbreaktion 40fache Vergrößerung	
Abb. 15: starke Farbreaktion 40fache Vergrößerung.....	19
Abbildung 16: DNA-Isolierung [168].....	20
Abbildung 17: PCR-Produkte	22
Abbildung 18: Einbau der dNTPs [75]	23
Abbildung 19: Luziferase katalysierte Reaktion [75]	23
Abbildung 20: 402C>G Punktmutation	24
Abbildung 21: Wildtyp.....	24
Abbildung 22: NanoString: Hybridisierung [69]	27
Abbildung 23: NanoString: Reinigung und Immobilisierung [69]	27
Abbildung 24: NanoString: Zählung [69]	28
Abbildung 25: IHC Östrogen	29
Abbildung 26: IHC Progesteron.....	30
Abbildung 27: IHC Inhibin	30
Abbildung 28: IHC Ki-67	31
Abbildung 29: IHC FOXL2	31
Abbildung 30: Ergebnis Pyrosequenzierung AGCTs.....	32
Abbildung 31: Ergebnis Pyrosequenzierung aller Fälle.....	32
Abbildung 32: Tumorstadium und Mutationsanalyse.....	35
Abbildung 33: Tumorstadium und Tumortyp	36
Abbildung 34: Tumorstadium und ER α -Expression.....	37
Abbildung 35: Tumorstadium und Progesteronexpression	38
Abbildung 36: Tumorstadium und Inhibin-Expression	39
Abbildung 37: Tumorstadium und Ki-67-Expression.....	40
Abbildung 38: Tumorstadium und FOXL2-Expression.....	41
Abbildung 39: Follow-up.....	42
Abbildung 40: Östrogen α und Überleben	42
Abbildung 41: Östrogen α und Überleben	43
Abbildung 42: Progesteron und Überleben	44
Abbildung 43: Progesteron und Überleben	44
Abbildung 44: Inhibin und Überleben	45
Abbildung 45: Inhibin und Überleben	46

Abbildung 46: Ki-67 und Überleben.....	46
Abbildung 47: Ki-67 und Überleben.....	47
Abbildung 48: FOXL2 und Überleben.....	48
Abbildung 49: FOXL2 und Überleben.....	48
Abbildung 50: Mutationsanalyse und Überleben.....	49
Abbildung 51: Mutationsanalyse und Überleben.....	49
Abbildung 52: NanoString: Anzahl exprimierter Gene	50

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hauptgruppen der Ovarialtumoren [6].....	2
Tabelle 2: Einteilung der Tumorstadien nach dem FIGO- und dem TNM-System [5]	4
Tabelle 3: Patientenkollektiv.....	14
Tabelle 4: Bewertung nach Score von Remmele und Stegner	18
Tabelle 5: Einteilung der Ki-67 IHC.....	19
Tabelle 6: Amplifikations-Primer	21
Tabelle 7: Sequenzierungs-Primer	23
Tabelle 8: Patientenkollektiv NanoString	25
Tabelle 9: Vergleichsgruppen NanoString	29
Tabelle 10: IHC Östrogen	29
Tabelle 11: IHC Progesteron.....	30
Tabelle 12: IHC Inhibin	30
Tabelle 13: IHC Ki-67.....	31
Tabelle 14: IHC FOXL2	31
Tabelle 15: Auswertung Pyrosequenzierung.....	33
Tabelle 16: Vergleich IHC FOXL2 und Mutationsanalyse.....	33
Tabelle 17: FOXL2 IHC und Tumortyp	34
Tabelle 18: Tumorstadium und Mutationsanalyse	34
Tabelle 19: Tumorstadium und Tumortyp	35
Tabelle 20: Tumorstadium und ER α -Expression.....	36
Tabelle 21: Tumorstadium und Progesteronexpression	37
Tabelle 22: Tumorstadium und Inhibin-Expression.....	38
Tabelle 23: Tumorstadium und Ki-67 Expression	39
Tabelle 24: Tumorstadium und FOXL2-Expression.....	40
Tabelle 25: Follow-up	41
Tabelle 26: Östrogen α und Überleben	42
Tabelle 27: Progesteron und Überleben	43
Tabelle 28: Inhibin und Überleben.....	45
Tabelle 29: Ki-67 und Überleben.....	46
Tabelle 30: FOXL2 und Überleben.....	47
Tabelle 31: Mutationsanalyse und Überleben	48
Tabelle 32: Vergleichsgruppe 1	50
Tabelle 33: Vergleichsgruppe 2	51
Tabelle 34: Vergleichsgruppe 3	51

Tabelle 35: Gruppe 1	51
Tabelle 36: Gruppe 2	52
Tabelle 37: Gruppe 3	52
Tabelle 38: Vergleichsgruppe 1	52
Tabelle 39: Vergleichsgruppe 2	53
Tabelle 40: Vergleichsgruppe 3	53

10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. T. Kirchner für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. D. Mayr für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und der Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation. Danke für die intensive, stets geduldige und freundliche Betreuung.

Bei Dr. med. H. Bartsch bedanke ich mich für die Beratung zu theoretischen Hintergründen zu einem Teil der molekularbiologischen Untersuchungen dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Mona Melz, Frau Andrea Sendelhofert und Frau Anja Heier für das Anfertigen der Schnitte und Färbungen sowie bei Herrn Daniel Hofmann für die Unterstützung bei praktischen Arbeiten im Labor bedanken. Auch allen anderen Mitarbeitern des pathologischen Instituts, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, jedoch namentlich nicht genannt wurden, gilt mein Dank.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner gesamten Familie ausdrücklich für den starken Rückhalt während des Studiums und in allen Lebenssituationen bedanken. Auch meinen guten Freunden gilt ein großer Dank für Ihre Unterstützung.