

Aus dem Pathologischen Institut
Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Frederick Klauschen



**Vier Jahrgänge Ovarialkarzinom an der LMU München:
Auf der Suche nach pathogenetischen Faktoren sowie
prognostischen Biomarkern**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniel Sebastian Fromberger

aus Altötting

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität zu München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Doris Mayr

Mitberichterstatter/-innen: PD Dr. med. Fabian Trillsch
PD Dr. med. Julia Jüdstock

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Elisa Schmoeckel

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2022

Mama, Papa, Mathias

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie des Ovarialkarzinoms	1
1.2	Risiken und protektive Faktoren.....	1
1.3	Symptome	2
1.4	Diagnostik	2
1.5	Screening und Prävention	2
1.6	Histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms	3
1.6.1	Low-grade seröses Karzinom.....	4
1.6.2	High-grade seröses Karzinom	5
1.6.3	Muzinöses Karzinom	5
1.6.4	Endometrioides Karzinom	5
1.6.5	Klarzelliges Karzinom.....	6
1.6.6	Maligner-Brenner-Tumor	6
1.6.7	Ehemals seromuzinöses Karzinom	7
1.6.8	Undifferenziertes und dedifferenziertes Karzinom	7
1.6.9	Karzinom/Maligner-Müller-Mischtumor.....	8
1.7	Einteilung der Tumorstadien nach TNM- und FIGO-Klassifikation	8
1.8	Tumorgrading	10
1.9	Therapie.....	10
1.9.1	Chirurgische Therapie	11
1.9.2	First-line-Chemotherapie	12
1.9.3	Chemotherapie bei Rezidiv	12
1.9.4	Strahlentherapie	13
1.10	Biomarker.....	13
1.10.1	Östrogenrezeptor	14
1.10.2	Progesteronrezeptor	14
1.10.3	Wilms-Tumorprotein	15
1.10.4	ARID1A	15
1.10.5	BRCA1 und BRCA2	15
1.10.6	EP3	16
1.10.7	Her2.....	16
1.10.8	Lef1.....	16
1.10.9	β -Catenin.....	17
1.10.10	p53	17
1.10.11	p16	18
1.11	Zielsetzung der Arbeit.....	18

2	Material und Methoden	19
2.1	Patientinnenkollektiv	19
2.2	Material	22
2.2.1	Histologisches Material	22
2.2.2	Geräte	22
2.2.3	Verbrauchsmaterial.....	24
2.2.4	Chemikalien.....	24
2.2.5	Antikörper und Detektionssysteme.....	26
2.2.6	FISH Sonde	27
2.2.7	Tissue Micro Array.....	27
2.3	Immunhistochemie	28
2.3.1	Allgemein	28
2.3.2	Färbeprozess	29
2.4	Fluoreszenz in situ Hybridisierung	31
2.4.1	Allgemein	31
2.4.2	Färbeprozess	31
2.5	Auswertung	33
2.5.1	Immunhistochemie	33
2.5.1.1	PR und ER	33
2.5.1.2	WT1 und ARID1A	33
2.5.1.3	BRCA1 und BRCA2	34
2.5.1.4	EP3.....	34
2.5.1.5	Her2.....	34
2.5.1.6	Lef1.....	34
2.5.1.7	β -Catenin	35
2.5.1.8	p53.....	35
2.5.1.9	p16.....	35
2.5.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung.....	35
2.6	Statistik.....	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Deskriptive Statistik	38
3.1.1	Östrogenrezeptor α	38
3.1.2	Progesteronrezeptor	39
3.1.3	WT1.....	40
3.1.4	ARID1A	40
3.1.5	BRCA1.....	41
3.1.6	BRCA2.....	42
3.1.7	EP3	42
3.1.8	Her2	43
3.1.9	Lef1	45

3.1.10	β-Catenin	46
3.1.11	p53	48
3.1.12	p16	49
3.2	Überlebensanalyse	49
3.2.1	Alter bei Diagnose	50
3.2.2	FIGO-Stadium	50
3.2.3	Grading.....	51
3.2.4	Histologischer Subtyp.....	53
3.2.5	Östrogenrezeptor	54
3.2.6	Progesteronrezeptor	55
3.2.7	WT1.....	55
3.2.8	ARID1A	56
3.2.9	BRCA1.....	57
3.2.10	BRCA2.....	57
3.2.11	EP3	58
3.2.12	Her2.....	59
3.2.13	Lef1.....	59
3.2.14	β-Catenin.....	60
3.2.15	p53	60
3.2.16	p16	61
3.3	Kombinierte Überlebensanalyse	61
3.3.1	Östrogen- und Progesteronrezeptor	61
3.3.2	Her2, Östrogen- und Progesteronrezeptor	62
3.3.3	p53 und EP3 Co-Expression.....	63
3.3.4	p53 und p16 Co-Alteration.....	64
4	Diskussion.....	66
4.1	Allgemein	66
4.2	Patientinnenkollektiv	67
4.3	TMA.....	68
4.4	Immunhistochemie	69
4.5	Klinische Aspekte als Prognosefaktoren	70
4.5.1	Alter bei Diagnose	70
4.5.2	FIGO-Stadium	70
4.5.3	Differenzierungsgrad und histologischer Subtyp.....	71
4.6	Biomarker und deren prognostische Bedeutung.....	72
4.6.1	ER	72
4.6.2	PR	74
4.6.3	WT1.....	75
4.6.4	ARID1A	77

4.6.5	BRCA1 und BRCA2	79
4.6.6	EP3	82
4.6.7	Her2	84
4.6.8	Lef1 und β -Catenin	86
4.6.9	p53	90
4.6.10	p16	93
4.7	Biomarkerkombinationen als prognostischer Faktor	95
4.7.1	p53 und EP3 Co-Expression	95
4.7.2	p53 und p16 Co-Alteration bei Typ-I-Karzinomen	95
4.7.3	ER, PR und Her2 bei Typ-II-Karzinomen	96
5	Zusammenfassung	98
6	Bibliographie	102
7	Abkürzungsverzeichnis	117
8	Abbildungsverzeichnis	120
9	Tabellenverzeichnis	122
10	Danksagung	123
11	Lebenslauf	124

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms

Eine von 71 Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom. Diese Erkrankung bildet somit einen Anteil von 3,2% aller weiblichen malignen Neubildungen. Nach dem Mammakarzinom ist das Ovarialkarzinom mit 5,3% die zweithäufigste Ursache aller Krebssterbefälle bei Frauen. In den meisten Fällen tritt das Ovarialkarzinom in höherem Alter auf; das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 70 Jahren. Aktuell beträgt das mittlere 5-Jahres-Überleben 41% (Robert Koch-Institut 2017).

1.2 Risiken und protektive Faktoren

Hinsichtlich der Risikofaktoren lässt sich die hormonelle von der genetischen Prädisposition abgrenzen. Weiterhin beeinflussen auch äußere Faktoren sowie prophylaktische chirurgische Eingriffe das Auftreten des Ovarialkarzinoms. Insbesondere das familiäre Brust- und Eierstockkrebsyndrom (hereditary breast ovarian cancer syndrome, HBOC) und das familiäre nichtpolypöse Kolonkarzinomsyndrom (hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome, HNPCC oder Lynch-Syndrom) sind im Hinblick auf das Ovarialkarzinom von Bedeutung. In bis zu einem Fünftel der Fälle liegt dem Karzinom eine derartige Keimbahnmutation zugrunde. Beim HBOC, welches durch eine Mutation der Gene BRCA1 oder BRCA2 entsteht, wird das Lebenszeitrisko für ein Ovarialkarzinom mit 25 bis 50% beschrieben (Walsh T et al. 2011) (Alsop K et al. 2012) (Antoniou 2005). Man geht davon aus, dass diese Keimbahnmutation 10-13% aller Ovarialkarzinome verursacht. Weitere 2-3 % sind HNPCC-assoziiert.

Lange bekannt ist, dass sowohl Schwangerschaften als auch die Einnahme oraler Kontrazeptiva das Risiko eines Ovarialkarzinoms senken; Multiparität sowie Schwangerschaften in fortgeschrittenem Alter bewirken eine zusätzliche Risikoreduktion (Hildreth NG et al. 1981). Die frühere Annahme, dass sich der protektive Effekt hierbei allein durch die Verhinderung ovulationsbedingter epithelialer Schäden der Ovarien begründet, wurde durch Studien, welche den Effekt von Gestagenen untersucht haben, relativiert. Die hormonelle Reaktion scheint diesen durch zelluläre Veränderungen zumindest zu verstärken (Rodriguez C et al. 2002). Stillen per se konnte ebenfalls als protektiver Faktor identifiziert werden, wobei sich der Zeitraum der Laktation als relevante Variable abzeichnet (Danforth KN et al. 2007). Nach Hysterektomie und Tubenligatur sinkt das Risiko für das Ovarialkarzinom signifikant. Für Nulliparität und Infertilität wurden erhöhte Inzidenzraten

beschrieben. Insgesamt gesehen besteht für die alleinige langfristige postmenopausale Substitution von Östrogen ebenfalls ein erhöhtes Risiko für ovarielle Karzinome (Rodriguez C et al. 2001). Weiterhin wurde bei einem erhöhten Body Mass Index (BMI) eine positive Korrelation konstatiert (Olsen CM et al. 2007). Der Zeitraum der hormonellen Aktivität, im Sinne einer frühen Menarche und späten Menopause, zeigte ebenfalls eine erhöhte Inzidenz ovarieller Neoplasien. Hinsichtlich Diät, sportlicher Aktivität und Nikotinkonsum zeigten sich bislang keine eindeutigen Zusammenhänge (Hunn J 2012) (Daniilidis A und Karagiannis V 2007). Zahlreiche weitere Faktoren werden weiterhin kontrovers diskutiert.

1.3 Symptome

Aufgrund der anatomischen Lage treten Symptome häufig erst in fortgeschrittenem Tumorstadium auf. Es wird jedoch beschrieben, dass über 90% aller Patientinnen mit Ovarialkarzinom vor Diagnosestellung symptomatisch waren. Die Symptome sind meist unspezifisch, am häufigsten wurden in retrospektiven Studien Völlegefühl, Blähungen, Zunahme der Miktionsfrequenz, abdominelle Schmerzen und Zunahme des Bauchumfanges genannt. Dies ist jeweils durch die Raumforderung des Tumors sowie die Bildung von Aszites zu erklären (Bankhead CR et al. 2005).

1.4 Diagnostik

Bei Verdacht auf eine ovarielle Raumforderung ist zunächst eine gynäkologische Spiegel- und Tastuntersuchung angezeigt. Aufgrund der allgemeinen Verfügbarkeit ist die erste und häufigste bildgebende Diagnostik der transvaginale Ultraschall. Zur Beurteilung von Differenzialdiagnosen und Bestimmung der dreidimensionalen Ausdehnung kommt die Schnittbildgebung mittels CT, MRT und PET/CT zum Einsatz. Hierbei wird im Vergleich in der Primärdiagnostik die Überlegenheit des PET/CT beschrieben (Nam EJ et al. 2010). Zur Detektion einer Peritonealkarzinose und Lymphknotenmetastasen ist die FDG-PET empfohlen. CT und MRT finden im fortgeschrittenen Stadium zur Abbildung von Organinfiltration Anwendung. Darüber hinaus sind auch indirekte klinische Hinweise auf Malignität, wie Aszites oder Pleuraerguss und deren Punktat, zu verwerten (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2016) (Yuan Y et al. 2012).

1.5 Screening und Prävention

Im Hinblick auf Screeningmaßnahmen wurden bislang hauptsächlich der transvaginale Ultraschall, die allgemeine gynäkologische Untersuchung und der Serumspiegel des

Tumormarkern CA 125 ausgewertet. Weder einzeln noch in Kombination konnte eine signifikante Reduktion der Mortalität am Ovarialkarzinom nachgewiesen werden, weshalb ein Screening mit diesen Mitteln, unabhängig vom individuellen Risiko, nach aktueller Leitlinie nicht empfohlen wird. Bei Risikopatientinnen ist nach Empfehlung eine prophylaktische chirurgische Intervention im Sinne einer bilateralen Salpingo-Oophorektomie zu diskutieren (Buys et al. 2011). Bei proaktiver chirurgischer Entfernung von im Ultraschall auffälligen Herden zeigte sich tendenziell eine Verschiebung zur Diagnose in früherem Tumorstadium, ohne jedoch signifikante Verbesserung des Überlebens. Nicht zu vernachlässigen sind psychologische und physische Komorbiditäten bei chirurgischer Intervention bei falsch positivem Ergebnis. Deshalb kommt der Aufklärung und der differenzierten Indikationsstellung eine besonders hohe Bedeutung zu (Henderson JT et al. 2018) (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2016).

1.6 Histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms

Diese Dissertation befasst sich ausschließlich mit malignen Ovarialtumoren epithelialen Ursprungs. Es besteht die Empfehlung einer Einteilung in zwei Subgruppen, Typ-I- und Typ-II-Ovarialkarzinome. Ca. 25% werden als Typ-I-Karzinome klassifiziert. Diese entwickeln sich aus Vorstufen über die Adenom-Karzinom-Sequenz, sind meist lokal begrenzt und oft von niedrig malignem Potential. Jedoch entspringen diesem Weg der Genese gelegentlich auch Tumoren mit aggressivem Wachstum und frühzeitiger Metastasierung. Hierzu werden neben low-grade serösen, endometrioiden, ehemals seromuzinösen, klarzelligen und muzinösen Karzinomen auch Maligne-Brenner-Tumoren gezählt.

Typ-II-Karzinome liegen in ca 75% der Fälle vor. High-grade seröse Karzinome, Karzinosarkome und undifferenzierte Karzinome werden in dieser Gruppe zusammengefasst. Diese Tumoren wachsen aggressiv, invasiv und schnell. Aufgrund dieser Eigenschaften sind ca. 90% der Mortalität auf diese Subgruppe zurückzuführen. Viele Typ-II-Karzinome scheinen vom Tubenepithel auszugehen. Hier wurde die histomorphologische Einteilung in den Normaltyp und SET-Typ (solide pseudoendometrioid transitional) empfohlen. Der Normaltyp wurde meist mit STICs (serous tubal intraepithelial carcinoma), der SET-Typ in Zusammenhang mit BRCA-Mutationen beschrieben (Shih leM und Kurman RJ 2004) (Kurman RJ und Shih leM 2016). Zu Zwecken der Übersichtlichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit nur in Typ-I- und Typ-II-Ovarialkarzinome unterschieden.

Allgemein lässt sich aus der Einteilung in Typ-I- und Typ-II-Karzinome nicht auf das Malignitätspotential des jeweiligen Ovarialkarzinoms schließen, weshalb diese Klassifikation eher aus akademischen Gründen verwendet wird.

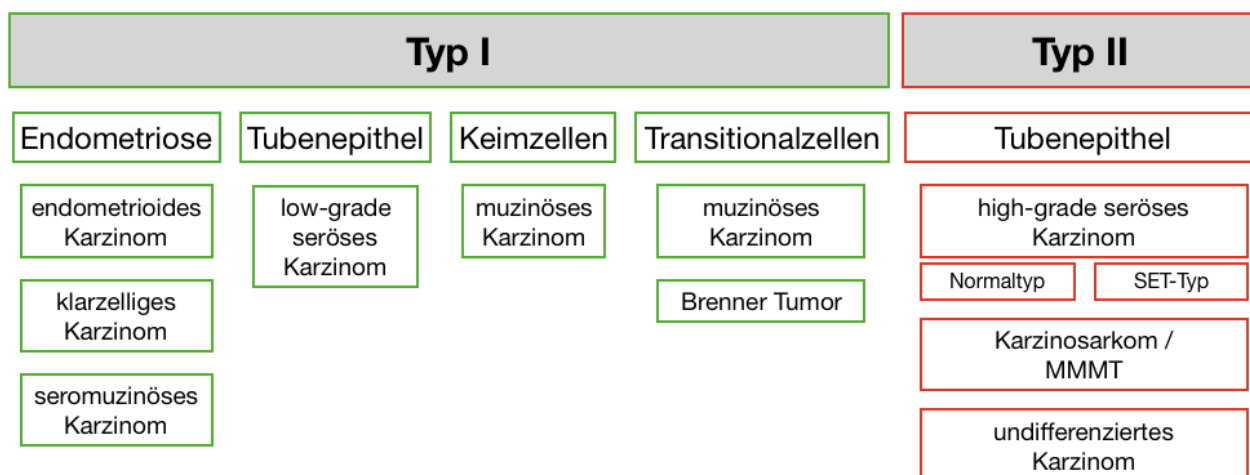


Abb. 1 Schematische Einteilung des Ovarialkarzinoms, modifiziert nach Kurman RJ und Shih M, 2016

1.6.1 Low-grade seröses Karzinom

Bei der Tumorklasse der serösen Ovarialkarzinome hat sich die Einteilung in ein duales System etabliert. Je nach histomorphologischem Erscheinungsbild, Kernatypie und Mitoserate erfolgt die Klassifizierung in high-grade und low-grade Karzinom. In unklaren Fällen sollte eine ergänzende Immunhistochemie mit p53 erfolgen (s. 4.6.9)

Das low-grade seröse Karzinom weist meist mehrere Wachstumsmuster auf. Einzelzellen, Zellnester, mikro- und, seltener, makropapilläre Strukturen sind in den Tumoren abzugrenzen. Die Kernatypie ist mild bis moderat ausgeprägt, mit prominentem Nukleolus und geringer Größenvarianz (<3fach). Insgesamt zeigt sich ein gleichförmiges Wachstumsmuster ohne Nekrosezone mit geringer Mitoseaktivität (≤ 12 MF/10HPF). Ein typisches Merkmal sind Verkalkungen, welche als Psammomkörperchen bezeichnet werden. Es wird postuliert, dass low-grade seröse Ovarialkarzinome über eine KRAS- oder BRAF-Mutation aus Vorläuferläsionen entstehen. Die Marker Wilms-Tumorprotein1 (WT1) und Östrogenrezeptor (ER) sind in den meisten Fällen exprimiert. Der Progesteronrezeptor (PR) kann in etwas mehr als der Hälfte der Fälle nachgewiesen werden. Eine Mutation von p53 liegt beim low-grade serösen Karzinom nie, eine atypische p16-Expression ebenfalls nur sehr selten vor (Kurman RJ et al. 2014) (Malpica A et al. 2007).

1.6.2 High-grade seröses Karzinom

Das high-grade seröse Ovarialkarzinom bildet meist solide Zellmassen mit schlitzförmigen Zwischenräumen. Weiterhin kommen papilläre, glanduläre und kribriforme Wachstumsmuster mit Nekrosezonen vor. Die Kernatypien sind ausgeprägter als beim low-grade Karzinom. So zeigen sich pleomorphe, große, hyperchromatische und oftmals multiple Zellkerne mit unregelmäßigem Chromatinmuster. Ein weiteres Kriterium zur Unterscheidung ist der höhere Mitoseindex mit mehr als 12 Mitosefiguren pro 10HPF (high-power fields). Diesen Tumoren liegt in über 90% der Fälle eine Mutation von p53 zugrunde, was sich wiederum immunhistochemisch nachweisen lässt. WT1 und ER werden in den meisten Fällen exprimiert. Auch für p16 zeigt sich eine deutlich höhere Alterationsrate als bei den restlichen Ovarialkarzinomen. PR wird in ca. einem Drittel der Fälle exprimiert (Malpica A et al. 2007) (Staebler A und Mayr D 2017) (Kurman RJ et al. 2014).

1.6.3 Muzinöses Karzinom

Das muzinöse Ovarialkarzinom weist ein zystisch-glanduläres Wachstumsmuster mit Epithel vom gastralen oder intestinalen Typ auf. Gelegentlich sind neuroendokrine und Paneth-Körnerzellen vorhanden. Das Wachstum erfolgt entweder expansiv mit labyrinthartiger, kribriformer Drüsenproliferation und geringem Stromaanteil oder destruktiv, invasiv mit atypischen Drüsen, Epithelnestern und Einzelzellen. In letzterem Fall ist häufig eine desmoplastische Stromareaktion zu beobachten. Die Mitoseaktivität ist meist relativ hoch mit atypischen Mitosefiguren. Gelegentlich zeigen sich anaplastische Bereiche, so genannte „mural nodules“. Auch diese Tumorgruppe entsteht meist über die Mutation von KRAS oder BRAF aus Adenomen und Borderline-Tumoren, welche in histologischen Untersuchungen häufig angrenzend zu beobachten sind. WT1 und PR werden nicht exprimiert. In wenigen Fällen kann ER oder eine p16-Alteration nachgewiesen werden. Eine Mutation von P53 liegt in etwa der Hälfte der Fälle vor (Frumovitz M et al. 2010) (Kurman RJ et al. 2014).

1.6.4 Endometrioides Karzinom

Histologisch zeigt sich ein dem Endometriumkarzinom ähnliches Wachstumsmuster mit einer „back-to-back“ Anordnung drüsenförmiger Zellen mit glandulärem, kribriformem und/oder villoglandulärem Wachstum. Gelegentlich besteht eine Gewebeinvasion in Form von Drüsen, Zellnestern und Einzelzellen, wobei hier ebenfalls häufig eine inflammatorische, desmoplastische Umgebungsreaktion zu beobachten ist. 30-50% der Karzinome weisen Bereiche mit Plattenepitheldifferenzierung auf und häufig sind fokale sekretorische Veränderungen zu beobachten. Das Vorkommen von Endometrioseherden, über atypische Endometriose und endometrioide Borderline-Tumoren im Bereich der Karzinome bestätigt

diese als Vorgängerläsionen. Besonders im Hinblick auf high-grade Karzinome erfordert die endgültige Differenzierung zwischen endometrioiden und serösen Tumoren zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen, da diese allein morphologisch nicht ausreichend reproduzierbar ist. Alterationen mehrerer Wege der Tumorigenese wurden beim endometrioiden Ovarialkarzinom beschrieben. Mutationen von PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase), ARID1A (AT-rich interactive domain-containing protein 1A), KRAS, BRAF und des Wnt-Signalweges sowie Mikrosatelliteninstabilität scheinen von Bedeutung zu sein. Gelegentlich werden verschiedene Mutationen im selben Karzinom identifiziert. Die Expression des Biomarkers WT1 sowie Mutationen von p53 oder p16 werden selten beobachtet. ER und PR sind jedoch in deutlich mehr als zwei Dritteln der Fälle exprimiert (Moreno-Bueno G et al. 2001) (Willner J et al. 2007) (Kurman RJ et al. 2014).

1.6.5 Klarzelliges Karzinom

Beim klarzelligem Ovarialkarzinom zeigt sich entweder ein tubulozystisches oder ein adenofibromatöses Wachstum. Gelegentlich sind auch dilatierte Zysten (einschichtig ausgekleidet mit flachen Zellen) oder solide Bereiche mit hyalinisiertem Stroma abzugrenzen. Typischerweise ist das Zytoplasma klar oder seltener eosinophil. Die Zellkerne sind hyperchromatisch, exzentrisch und besitzen einen prominenten Nukleolus. Eine Besonderheit stellen „hobnail“-Zellen dar, welche durch die Protrusion des Nukleus in die Zyste oder das Lumen entstehen. Auch das klarzellige Ovarialkarzinom scheint häufig aus Endometrioseherden hervorzugehen. Seltener sind klarzellige Borderline-Tumoren abzugrenzen. Mutationen von ARID1A, PTEN und PIK3CA wurden gehäuft bei diesem Tumortyp nachgewiesen. Insbesondere ARID1A-Alterationen konnten in angrenzenden Endometrioseherden nachgewiesen werden, was die These der Vorgängerläsion unterstützt. Die Biomarker ER und PR sind selten, WT1 ist nicht nachweisbar. In jeweils ca. 10% der Fälle ist eine Mutation von p53 oder p16 vorhanden (Seidman JD und Kurman RJ 2003) (Mabuchi S et al. 2016) (Kurman RJ et al. 2014).

1.6.6 Maligner-Brenner-Tumor

In dieser Tumorgruppe weisen zystische Formationen ein mehrschichtiges Epithel mit hyperchromatischen und pleomorphen Zellkernen auf. Auch hier besteht häufig in Bereichen mit Stromainvasion eine desmoplastische Reaktion. Maligne-Brenner-Tumoren können muzinös-glanduläre Formationen und Anteile eines muzinösen Adenokarzinoms aufweisen. Sind keine Areale von benignem oder Borderline-Wachstum vorhanden, ist differenzialdiagnostisch ein high-grade seröses oder ein endometrioides Karzinom mit

Wachstumsmuster vom Transitionalzelltyp zu erwägen. Im Hinblick auf die Karzinogenese konnten gehäuft PIK3CA-Mutationen nachgewiesen werden. Es wurde beschrieben, dass sich der Entstehungsweg des high-grade serösen Ovarialkarzinoms vom Transitionalzelltyp hiervon unterscheidet, da bei diesem eine p53-Mutation ausschlaggebend ist (Cuatrecasas M et al. 2009) (Kurman RJ et al. 2014) (Lang SM et al. 2017).

1.6.7 Ehemals seromuzinöses Karzinom

Die jüngste Entität stellt das seromuzinöse Ovarialkarzinom dar, welches 2014 durch die WHO neu definiert wurde. Bereits im Jahr 2020 wurde diese Subgruppe widerrufen. Weiterhin geblieben sind die Zystadenome und Borderlinetumoren. Sie bestehen zu mindestens 10% aus zwei oder mehr Zelltypen des Müller-Epithels. Das histomorphologische Erscheinungsbild setzt sich aus komplex papillären, glandulären, mikroglandulären und soliden Anteilen zusammen. Die Invasion erfolgt kribriform, konfluierend und seltener destruktiv diffus. Zellen mit klarem Zytoplasma, endometroid differenzierte Zellen und Plattenepithelmetaplasien können auftreten. Der Mitoseindex ist eher gering mit maximal 5 Mitosefiguren pro 10 HPF. Atypische Endometriose wird auch im Umfeld dieser Untergruppe beschrieben. Aufgrund der schwierigen diagnostischen Reproduzierbarkeit und der morphologischen wie auch molekularen Überlappung mit endometrioiden Karzinomen, wird das invasive Karzinom dieses histologischen Subtyps nach der aktuellen WHO-Klassifizierung von 2020 zu den endometrioiden Karzinomen, dann vom muzinösen Subtyp, gezählt. Ehemals seromuzinöse Ovarialtumoren exprimieren häufig ER, wohingegen WT1 nur selten nachgewiesen werden kann (Taylor J und McCluggage WG 2015) (Kurman RJ und Shih leM 2016) (Lax SF 2019) (WHO 2020).

1.6.8 Undifferenziertes und dedifferenziertes Karzinom

Wie bereits die Bezeichnung nahelegt, handelt es sich beim undifferenzierten Ovarialkarzinom um einen weitgehend entdifferenzierten Tumor. Bezeichnend ist das schalenförmige Wachstum mit Zellnestern, Clustern und Einzelzellen ovaler Form mit ausgedehnten Nekrosezonen. Häufig imponiert der Zellverband wenig kohäsiv. Die Zellkerne sind pleomorph und es zeigen sich bis zu 50 Mitosefiguren pro 10 HPF. Dedifferenzierte Karzinome zeigen neben undifferenzierten Anteilen einen differenzierten Tumoranteil, meist ein relativ gut differenziertes endometrioides Karzinom, selten auch ein seröses Karzinom. Der Weg der Tumorigenese ist bei den undifferenzierten Karzinomen noch nicht abschließend geklärt (Shih leM und Kurman RJ 2004) (Silva E et al. 2006) (Kurman RJ et al. 2014).

1.6.9 Karzinosarkom/Maligner-Müller-Mischtumor

Nach WHO werden Karzinosarkome, auch Maligne-Müller-Mischtumoren (MMMT), als gemischte Karzinome eingeordnet. Der Vollständigkeit halber werden sie hier aufgeführt.

Histologisch besteht diese Subgruppe aus einer Karzinom- und einer Sarkomkomponente. Häufig handelt es sich bei karzinomatösen Bestandteilen um ein high-grade seröses Karzinom, jedoch wurden auch andere Differenzierungen beschrieben. Die mesenchymalen Anteile werden in homolog und heterolog unterteilt. Als homolog wird entdifferenziertes, myxoides Sarkomgewebe mit Müller-Differenzierung bezeichnet. Heterologe Sarkombestandteile zeigen sich als Chondrosarkom, Rhabdomyosarkom, Osteosarkom und in seltenen Fällen als Liposarkom. Diese treten entweder singulär oder auch gemischt auf. Molekulare Untersuchungen legen einen epithelialen Ursprung nahe, da identische p53-Mutationen in Karzinom- und Sarkomanteilen identifiziert wurden. Zudem tritt ein Rezidiv meist als high-grade seröses Karzinom in Erscheinung und zeigt auch ein für diese Unterart typisches Muster der Metastasierung. Häufig können Mutationen für p53 und p16 nachgewiesen werden. Der Biomarker WT1 ist, wie auch beim high-grade serösen Karzinom, fast immer exprimiert (Kunkel J et al. 2012) (Fujii H et al. 2000) (Kurman RJ et al. 2014).

1.7 Einteilung der Tumorstadien nach TNM- und FIGO-Klassifikation

Die Einteilung des Tumorstadiums erfolgt allgemein und standardisiert durch die WHO (World Health Organisation) nach TNM- beziehungsweise FIGO-Klassifikation (International Federation of Gynecology and Obstetrics) und wird auf Tumoren des Ovars, der Tube und das primäre peritoneale Karzinom unabhängig vom Subtyp angewendet. Die TNM-Klassifikation wird von der Union for International Cancer Control (UICC) festgelegt und gibt Auskunft über Ausbreitung (T), Lymphknotenstatus (N) und Fernmetastasen (M). Diese beiden Systeme sind nur zum Teil aufeinander übertragbar, weshalb die Einteilung durch den Pathologen einheitlich nach TNM-Klassifikation erfolgen soll. Die Gegenüberstellung wird im Folgenden tabellarisch veranschaulicht (Staebler A und Mayr D 2017) (Kurman RJ et al. 2014).

TNM	FIGO	
TX		Primärtumor unbekannt, keine Angaben möglich
T0		Kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor auf die Ovarien oder Tuben beschränkt
T1a	IA	Tumor auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie

T1b	IB	Tumorbefall 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 Aszites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
T2b	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
N1	IIIA1	ausschließlich retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Metastasen ≤ 10 mm
N1b	IIIAii	Metastasen > 10 mm
T3a	IIIA2	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b	IIIB	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c	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)

Tab. 1 TNM- / FIGO-Klassifikation

UICC-Stadium	T	N	M
Stadium IA	T1a	N0	M0
Stadium IB	T1b	N0	M0

Stadium IC1	T1c1	NO	M0
Stadium IC2	T1c2	NO	M0
Stadium IC3	T1c3	NO	M0
Stadium IIA	T2a	NO	M0
Stadium IIB	T2b	NO	M0
Stadium IIIA1	T1/T2	N1	M0
Stadium IIIA2	T3a	NO/N1	M0
Stadium IIIB	T3b	NO/N1	M0
Stadium IIIC	T3c	NO/N1	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tab. 2 UICC-Stadium / TNM-Klassifizierung

1.8 Tumorgrading

Gemäß WHO erfolgt auf histologischer Ebene eine Beurteilung der Differenzierung. Prinzipiell bedeutet G1 gut, G2 mäßig und G3 schlecht differenziert. Diese Einteilung findet nur bei den endometrioiden Tumoren in vollem Umfang Anwendung. Die Kriterien für diesen Tumortyp werden direkt von der Empfehlung für endometrioid differenzierte Endometriumkarzinome übernommen. Für die muzinöse Differenzierung ist keine einheitliche Graduierung festgelegt, weshalb hier häufig ebenfalls in das genannte 3-Stufen-System unterteilt wird (McCluggage WG et al. 2015). Das seröse Ovarialkarzinom beinhaltet, aufgrund der molekularen Befunde und der Genese zwei komplett unabhängige Tumortypen, das seröse low-grade (G1) und das seröse high-grade (G3) Karzinom. Klarzellige Ovarialkarzinome werden immer als G3 eingestuft. Maligne-Brenner-Tumoren und undifferenzierte Karzinome werden nicht graduiert und gelten ebenfalls als G3 (Kurman RJ et al. 2014) (Malpica A 2008).

1.9 Therapie

Die Therapie des Ovarialkarzinoms richtet sich in erster Linie nach dem Tumorstadium sowie dem histologischen Subtyp. Für die therapeutischen Optionen ist darüber hinaus entscheidend, ob es sich um eine Erstdiagnose oder ein Rezidiv handelt. Individuelle

Therapieansätze sind jedoch, abgesehen von PARP-Inhibitoren (genauer s. unten) beim high-grade serösen Ovarialkarzinom, kaum etabliert.

1.9.1 Chirurgische Therapie

Prinzipiell geht, nach Empfehlung des aktuellen Leitlinienprogrammes, einer systemischen Chemotherapie immer primär die Operation zur maximalen Reduktion der Tumormasse voraus.

Bei frühem Ovarialkarzinom (FIGO-Stadium I bis IIA) umfasst die operative Intervention eine Exstirpation der Adnexe beidseits, eine Hysterektomie, eine Omentektomie (mindestens infrakolisch), eine bilaterale Lymphonodektomie pelvin und paraaortal. Bei unklarem oder muzinösem Tumortyp ist zusätzlich eine Appendektomie sowie ein umfassendes Staging via medianer Laparotomie angezeigt. Das Staging umfasst die Palpation und Inspektion der Abdominalhöhle, die Asservierung einer Peritonealzytologie und die großzügige Biopsieentnahme am Peritoneum und an sonstigen auffälligen Stellen. Nur so kann die Diagnose eines frühen Ovarialkarzinoms gesichert werden, da okkulte Tumorherde zum Upstaging führen. Nach komplettem intraoperativem Staging wurde eine verbesserte Prognose bezüglich des progressionsfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens beschrieben. Deshalb besteht nach insuffizienter Primäroperation die Empfehlung zum operativen Re-Staging zur Festlegung des postoperativen Therapieregimes (Trimbos B et al. 2010) (Grabowski JP et al. 2012). Studien konstatieren, dass im frühen Tumorstadium die Laparoskopie durch einen erfahrenen Operateur der offenen Laparotomie bezüglich der Prognose nicht unterlegen ist (Koo YJ et al. 2014). Bei jungen Patientinnen mit Kinderwunsch ist gemäß Leitlinie unter gewissen Voraussetzungen ein fertilitätserhaltendes Vorgehen bis zum FIGO-Stadium IC möglich. In Abhängigkeit des Tumorstadiums wurde jedoch ein erhöhtes Progressionsrisiko beschrieben, weshalb postoperativ immer eine engmaschige Nachkontrolle indiziert ist. Nach Erfüllung des Kinderwunsches ist die Komplettierung der bilateralen Salpingo-Oophorektomie empfohlen (Ditto A et al. 2015).

Ziel der Primäroperation in fortgeschrittenem Stadium (ab FIGO-Stadium IIB) ist die vollständige Entfernung aller makroskopisch sichtbaren Tumormassen. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei makroskopisch kompletter Resektion das mediane Überleben wesentlich verlängert. Bei jeglichen makroskopischen Tumorresiduen verringert sich dieser Überlebensvorteil, in Abhängigkeit der Größe des Tumorrestes, drastisch (du Bois A et al. 2009). Hierbei wird klar empfohlen, dass auch radikale, multiviszerales Resektionen durchgeführt werden sollen, sofern hierdurch makroskopische Tumorfreiheit erreicht werden kann. In diesem Fall überwiegt die Verbesserung der Prognose die postoperativen

Komorbiditäten. In fortgeschrittenen Tumorstadien konnte die CHORUS-Studie zeigen, dass bezüglich des Gesamtüberlebens kein signifikanter Unterschied zwischen Primäroperation und neoadjuvanter Chemotherapie mit anschließendem chirurgischem Tumordebulking besteht. Die neoadjuvante Chemotherapie erfolgt weitgehend im Rahmen von Studien bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2020) (Santaballa A et al. 2016) (Kehoe S et al. 2015).

1.9.2 First-line-Chemotherapie

Bei gut differenziertem Ovarialkarzinom (G1) FIGO-Stadium IA ist nach Primäroperation keine Chemotherapie indiziert. In den Stadien IC/IIA und IA/IB mit schlecht differenziertem Karzinom (G3) sowie bei Klarzellkarzinomen verbessert die adjuvante Chemotherapie, verabreicht über 6 Zyklen, sowohl das progressionsfreie Intervall als auch die 5-Jahres-Überlebensrate. Die Daten bei Patientinnen mit intermediärem Risiko, Stadium IA G2, IB G1/2, lassen keine eindeutige Aussage zur Risikoreduktion zu, sodass in diesen Fällen eine Chemotherapie optional ist. Bezüglich einer platinhaltigen Mono- oder Kombinationstherapie mit Taxanen ist beim frühen Ovarialkarzinom ebenfalls ungenügende Evidenz vorhanden. Je nach Leitlinie wird die Monotherapie mit Carboplatin der Kombinationstherapie mit Paclitaxel und Carboplatin vorgezogen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2020).

Bei allen fortgeschrittenen Karzinomen, ab FIGO-Stadium IIB, besteht die intravenöse adjuvante First-line-Chemotherapie aus 6 Zyklen Carboplatin und Paclitaxel alle 3 Wochen. Ab Stadium IIIB wurde für die zusätzliche Therapie mit Bevacizumab ein verlängertes progressionsfreies Intervall, in gewissen Untergruppen (high-grade seröses Karzinom, hohe Tumorlast) ebenfalls ein besseres Gesamtüberleben beschrieben. Im Falle eines optimalen Debulkings ist eine weitere Option die zusätzliche, intraperitoneale Applikation der Chemotherapeutika, für welche eine Überlegenheit gegenüber der alleinigen intravenösen Therapie beschrieben ist. Limitierend ist hier jedoch die Toleranz der Patientin aufgrund erhöhter systemischer Toxizität (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2020) (Santaballa A et al. 2016) (Kyrgiou M et al. 2006) (Tewari K et al. 2019) (Tewari D et al. 2015).

1.9.3 Chemotherapie bei Rezidiv

Bei einem Tumorrezidiv richtet sich die systemische Therapie nach dem Ansprechen auf eine platinhaltige First-line-Chemotherapie sowie dem BRCA-Status.

Tritt ein Tumorprogress in den ersten 6 Monaten nach platinhaltiger Chemotherapie auf, ist im Weiteren eine platinfreie Therapie durchzuführen. Therapieziele sind in diesem Fall hauptsächlich Symptomkontrolle und Erhaltung der Lebensqualität. Pegyliertes liposomales

Doxorubicin, Topotecan, Gemcitabin und Paclitaxel sind für eine Monotherapie etablierte Zytostatika. Es sind keine wesentlichen Unterschiede in der Wirksamkeit beschrieben. Falls Bevacizumab vorgängig noch nicht eingesetzt wurde, kann die Kombination mit den oben genannten Zytostatika eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens bewirken (Sehouli J et al. 2008) (Pujade-Lauraine E et al. 2012).

Bei initial gutem Ansprechen auf platinhaltige Therapie und Rezidiv erst zu einem späteren Zeitpunkt ist eine erneute Kombinationstherapie mit Carboplatin indiziert. Beim so genannten platinsensitiven Rezidiv zeigen Kombinationen von Carboplatin mit Paclitaxel, Gemcitabin oder pegyliertem liposomalem Doxorubicin einen signifikanten Vorteil gegenüber einer Monotherapie (Parmar MK et al. 2003) (Pfisterer J et al. 2006) (Pujade-Lauraine E et al. 2010). Analog zur platinfreien Therapie wird für die Tripeltherapie mit Carboplatin, Gemcitabin/Paclitaxel und erstmaligem Einsatz von Bevacizumab ein signifikanter Vorteil konstatiert (Aghajanian C et al. 2015).

Einen Sonderfall stellt das platinsensitive Rezidiv eines high-grade serösen Ovarialkarzinoms mit BRCA1/2-Mutation dar. Hier konnte in einer Placebostudie eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls unter Erhaltungstherapie mit Poly-ADP-Ribose-Polymerase-(PARP)-Inhibitoren gezeigt werden, weshalb diese mittlerweile in den besagten Fällen empfohlen sind (Ledermann J et al. 2014) (Moore K et al. 2018) (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2020).

1.9.4 Strahlentherapie

Trotz Strahlenempfindlichkeit der meisten Ovarialkarzinome findet eine Bestrahlung nur in Ausnahmefällen Anwendung. Bei Diagnosestellung liegt meist eine disseminierte Erkrankung vor, welche eine Ganzabdomenbestrahlung erfordern würde. Diese ist, aufgrund der systemischen Toxizität und den konsekutiven Nebenwirkungen, nicht möglich. Zu Zwecken der Verbesserung der Lebensqualität kann die lokale Strahlentherapie nach sorgfältiger Abwägung des Toxizitätsprofils im Einzelfall Anwendung finden (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2020).

1.10 Biomarker

Die allgemeinen und kaum individualisierten Therapieempfehlungen für eine sehr inhomogene Karzinomgruppe mit insgesamt schlechtem Outcome verdeutlichen die Notwendigkeit einer therapeutisch bedeutsamen Klassifizierung zur Entwicklung spezialisierter Therapiekonzepte. Ziel dieser Arbeit war es etwaige Subgruppen anhand molekularer Eigenschaften zu identifizieren und zu definieren, um eine Grundlage für eine „care for the rare“ Therapie zu

schaffen. Hierzu wurden für das Ovarialkarzinom etablierte und aus anderen Bereichen der Tumorpathologie bekannte Marker selektiert und ausgewertet. Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Dissertation immunhistochemisch und teils mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) untersuchten Biomarker aufgeführt; diese werden im Punkt 4.6 und 4.7 detaillierter beleuchtet.

1.10.1 Östrogenrezeptor

Der Östrogenrezeptor (ER) ist ein Steroidhormonrezeptor, von dem zwei Typen existieren, welche als Östrogenrezeptoren α (ER α) und β (ER β) bezeichnet werden. Diese Rezeptoren sind im Zellkern, dem Zytoplasma und an der Zellmembran lokalisiert. Durch die Interaktion mit Östrogenen werden Gentranskription, Chromatinkonfiguration und Organisation der Histone durch den Hormonrezeptorkomplex direkt im Zellkern beeinflusst. Ebenfalls wird durch die östrogenunabhängige Produktion von Wachstumsfaktoren bei manchen Tumoren eine gesteigerte Wachstumsrate im Sinne einer autokrinen Regulation beobachtet (Levin 2005). Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde der positive Einfluss einer Salpingo-Oophorektomie bei fortgeschrittenem Mammakarzinom beschrieben (Beatson GT 1896). Dies ist auf die Eliminierung von Östrogen als Wachstumsstimulator zurückzuführen. Die Bestimmung des Rezeptorstatus ist zwischenzeitlich fester Bestandteil der Diagnostik des Mammakarzinoms mit entsprechender antihormoneller Therapieindikation. Hierunter konnte eine deutliche Verbesserung der Prognose beschrieben werden. Beim Ovarialkarzinom hingegen findet eine derartige Individualisierung des Therapieregimes aktuell keine Anwendung. Jedoch legten Studien auch hier die Expression des Rezeptors als prognostischen Faktor nahe (Lumachi F et al. 2013) (Shen Z. et al 2017).

1.10.2 Progesteronrezeptor

Auch der Progesteronrezeptor (PR) ist ein Steroidhormonrezeptor mit Wirkung als Transkriptionsfaktor im Zellkern. Die zwei Isoformen des Progesteronrezeptors A (PRA) und B (PRB) sind physiologischerweise ausgeglichen exprimiert. Analog zum ER ist auch der PR gelegentlich membranständig und zudem im Zytoplasma nachweisbar. Die vereinfachte These, dass PRB als positiver Regulator und PRA als dessen Gegenspieler fungiert, konnte jedoch nicht allgemeingültig nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass unterschiedliche Gene von den jeweiligen Isoformen spezifisch in ihrer Transkription beeinflusst werden (Jacobsen B und Horwitz K 2012). PR konnte bei diversen Tumoren als prognostischer Marker identifiziert werden. Ebenfalls wird eine verbesserte Prognose von Ovarialkarzinomen bei Expression beschrieben (Luo H et al. 2017). Eine spezifische Modulation im Sinne einer individualisierten Therapie findet jedoch bislang keine Anwendung (Lee P et al. 2005) (Salmen J et al. 2011).

1.10.3 Wilms-Tumorprotein

Das Wilms-Tumorprotein 1 (WT1) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher durch das Gen WT1 auf Chromosom 11 codiert wird. Insbesondere Wachstumsfaktoren, Differenzierungsmarker, Regulatoren des Zellzyklus und der Apoptose werden durch das Genprodukt beeinflusst. Beim kindlichen Wilms-Tumor, auch Nephroblastom, ist gehäuft eine Inaktivierung beider Allele von WT1 zu beobachten. Außerdem konnte die Expression von WT1 bei malignen Tumoren als prädiktiver Biomarker identifiziert werden (Kim A et al. 2014) (Rauscher J et al. 2014). Je nach Differenzierung ist WT1 beim epithelialen Ovarialkarzinom in unterschiedlichem Ausmaß nukleär nachweisbar und stellt einen negativen Prognosefaktor dar (Kurman RJ et al. 2014) (Carter JH et al. 2018) (Netinatsunthorn W et al. 2006).

1.10.4 ARID1A

ARID1A bezeichnet das Tumorsuppressorgen AT Rich Interactive Domain containing protein 1A, welches auf Chromosom 1 lokalisiert ist. Das Genprodukt steuert die Chromatinstruktur und beeinflusst so die Transkription verschiedener Gene. Weiterhin ist es von Bedeutung in der Gewebeentwicklung und Zelldifferenzierung. In Tumoren verschiedener Lokalisation wurden Mutationen im ARID1A-Gen nachgewiesen. Beim Ovarialkarzinom betrifft dies insbesondere den klarzelligen und endometrioiden Subtyp (Mao T und Shih leM 2013). Im Mausmodell konnte durch die Wiederherstellung des Wildtyp-ARID1A-Gens ein Rückgang des Tumorwachstums und der Zellproliferation beschrieben werden, was die Rolle als Tumorsuppressor unterstreicht (Guan B et al. 2011).

1.10.5 BRCA1 und BRCA2

BRCA1 und BRCA2 bezeichnet jeweils die abgekürzte Form von breast cancer antigen 1 bzw. 2. Beides sind Gene, welche Proteine codieren, die zur DNA-Reparatur bei Doppelstrangbrüchen beitragen. Die Erhöhung des Risikos für diverse Malignome wurde für die Mutation beider Gene beschrieben. Hauptsächlich sind das Melanom, das Kolorektale-, das Pankreas- und das Prostatakarzinom zu nennen (Mersch J et al. 2015). Wie die Namensgebung vermuten lässt, besteht für das Mammakarzinom ein erhöhtes Risiko, welches bis zum 80. Lebensjahr mit einer Erkrankungsrate von 72% für BRCA1 und 69% für BRCA2 angegeben wird. Für das Ovarialkarzinom wird bis zum 80. Lebensjahr eine Inzidenz von 44% für BRCA1 und 17% für BRCA2 beschrieben (Kuchenbaecker KB et al. 2017). Patientinnen mit Ovarialkarzinom bei nachgewiesener BRCA1- oder BRCA2-Keimbahnmutation scheinen eine signifikant bessere Prognose zu haben (Zhong Q et al. 2014). Der positive BRCA1- und BRCA2-Mutationsstatus ist unter gewissen Voraussetzungen von therapeutischer Konsequenz, da für den Einsatz von Poly-ADP-Ribose-Polymerase- (PARP)-Inhibitoren bei high-grade serösen Karzinomen ein

geringeres Risiko für Tumorprogress und Tod nachgewiesen werden konnte (Moore K et al. 2018) (Mirza MR et al. 2020).

1.10.6 EP3

EP3 ist einer von vier bekannten Prostaglandin-E2-Rezeptoren, von welchem mehrere Isoformen existieren. Prostaglandin-E2 ist ein Entzündungsmediator, welcher durch Cyclooxygenase (COX) aus Arachidonsäure gebildet wird. Es ist auch ein Einfluss auf Tumorentstehung und -progress beschrieben (Sugimoto Y und Narumiya S 2007). In Neoplasien unterschiedlichen Ursprungs, wie dem Kolon-, Prostata- und Lungenkarzinom, konnte das erhöhte Vorkommen von Prostaglandin-E2 und eine COX-Überexpression nachgewiesen werden (Wang D. und DuBois R. 2010). Im Hinblick auf das Ovarialkarzinom könnte eine gesteigerte Expression von EP3 vor allem bei klarzelligem Subtyp vorliegen und in bestimmten Konstellationen einen negativen prognostischen Marker darstellen (Czogalla B. et al. 2019).

1.10.7 Her2

Ein weiterer Biomarker, welchem insbesondere beim Mammakarzinom große Bedeutung zukommt, ist der human epidermal growth factor receptor 2 (Her2). Dieser transmembranöse Rezeptor ist Teil der Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und fördert die Zellproliferation und hemmt die Apoptose. In 20-30% der Fälle ist beim invasiven Mammakarzinom eine Überexpression von Her2 beschrieben, was mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Burstein HJ. 2005). Mit der zielgerichteten Antikörpertherapie gegen die extrazelluläre Rezeptordomäne konnte die Prognose dieser Risikogruppe jedoch deutlich verbessert werden, sodass die Bestimmung des Her2-Status mittlerweile ein etablierter Bestandteil der Standarddiagnostik des Mammakarzinoms ist (Hudis CA 2007). Im Vergleich zum Mammakarzinom ist die Datenlage für das Ovarialkarzinom im Hinblick auf das progressionsfreie Intervall sowie das Gesamtüberleben kontrovers. Klinische Studien zur Evaluation der Wirksamkeit einer Antikörpertherapie gegen Her2 zeigten bisher keine Verbesserung der Prognose (Cortez AJ et al. 2018) (Tuefferd M et al. 2007).

1.10.8 Lef1

Lymphoid-enhancer-binding factor 1 (Lef1) stellt einen Transkriptionsfaktor im Wnt/ β -catenin-Signalweg dar. Dieser beeinflusst Zielgene, welche unter anderem die Zellproliferation und Apoptose steuern. Weiter ist bekannt, dass Lef1 eine Rolle in der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) spielt. Bei diesem Prozess zeigt sich eine Auflösung von Zellkontakten, was eine erhöhte Zellmobilität und damit eine physiologische Zellmigration während der

Embryogenese ermöglicht. Im Rahmen von Tumorerkrankungen ist dies beim Prozess der Metastasierung und Invasion zu beobachten. Bei diversen malignen Neoplasien konnte eine Alteration des Wnt/ β -catenin/Lef1-Signalweges im Rahmen der Karzinogenese nachgewiesen werden (Santiago L et al. 2017). Zudem wurde eine Erhöhung von Lef1 in Tumorgewebe ohne korrelierende nukleäre Erhöhung des Upstream-Mediators β -Catenin beschrieben, was eine vom Signalweg unabhängige Aktivität nahelegt. Für das high-grade seröse Ovarialkarzinom könnte die Überexpression von Lef1 einen negativen prognostischen Marker darstellen (Schmoeckel E et al. 2017).

1.10.9 β -Catenin

β -Catenin besitzt eine duale Funktion. Es ist ein zytoplasmatisches Protein, welches Teil des Wnt-Signalweges ist und somit eine ähnliche Funktion wie Lef1 besitzt. Im Rahmen dieser Signalkaskade bindet es Lef1 im Zytoplasma oder im Zellkern und führt so zur Transkription der Zielgene. Weiterhin stellt β -Catenin eine Komponente in Zell-Zell-Verbindungen dar, indem es direkt an membranständige Cadherine bindet und die Verbindungskomplexe ins Zytoskelett integriert. Diese Funktion dient der Stabilisierung des Zellverbandes. Eine Alteration ist deshalb von Relevanz beim Prozess der Invasion und Metastasierung (Rask K et al. 2003). β -Catenin-Alterationen können gehäuft in endometrioiden Karzinomen beobachtet werden. Insbesondere beim klarzelligen und endometrioiden Ovarialkarzinom wird dem Muster der Expression und der generellen Nachweisbarkeit eine prädiktive Bedeutung im Hinblick auf die Prognose zugeschrieben (Bodnar L et al. 2014) (Heckl M. et al 2018).

1.10.10p53

Das Molekül des Jahres 1993 p53 ist nach seiner molekularen Masse von 53 kDalton benannt und fungiert hauptsächlich als Transkriptionsfaktor. Das Protein wird kontinuierlich gebildet und schnell wieder abgebaut. Kommt es in einer Zelle zur Schädigung der DNA, der Aktivierung von Onkogenen oder Hypoxie, erfolgt die Stabilisierung des Moleküls, was zur Akkumulation führt. p53 bindet in diesem Fall sequenzspezifisch an die DNA, wo es zur Aktivierung oder Repression der Zielgene führt. So werden Apoptose und der Zellzyklus gesteuert, wobei dies wiederum von komplexen Kontextfaktoren abhängig zu sein scheint. Endpunkt dieser Kaskade ist der Arrest des Zellzyklus oder die Apoptose relevant geschädigter Zellen (Zilfou JT und Lowe SW 2009). Es wurde gezeigt, dass mehr als 50% aller malignen Neoplasien des Menschen mit einer Mutation des p53-Gens in Zusammenhang stehen (Ozaki T und Nakagawara A 2011). Im Hinblick auf das Ovarialkarzinom ist die höchste Mutationsrate für das high-grade seröse Karzinom, das Karzinosarkom (MMMT) und das muzinöse Karzinom beschrieben (Kurman RJ et al. 2014).

1.10.11p16

Der cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A), auch bezeichnet als p16, ist ein Protein, welches den Übergang im Zellzyklus von der G1- in die S-Phase steuert, indem es mit dem Retinoblastom-Protein (Rb) und den Enzymen CDK4/CDK6 (cyclin dependent kinase) interagiert. Der Funktionsverlust von p16 ist gleichbedeutend mit dem Verlust eines Checkpoints (G1- zu S-Phase) im Zellzyklus (Rayess H et al. 2011). Am Lungenkarzinom konnte gezeigt werden, dass in allen Fällen eine Mutation des p16/Rb-Suppressorkomplexes vorliegt, was den Einfluss in der Entstehung maligner Neoplasien nahelegt (Sen M et al. 2017). Mutationen von p16 können hauptsächlich bei high-grade serösen Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden (Kurman RJ et al. 2014).

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden folgende Zielsetzungen und Fragestellungen bearbeitet.

- Ergeben sich aus den untersuchten Faktoren und Biomarkerkombinationen prognostische Informationen?
- Korrelieren die untersuchten Biomarker mit bestimmten histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms?
- Ergeben sich aus den untersuchten Biomarkern Ansätze für eine zielgerichtete individualisierte Therapie im Sinne „care for the rare“?

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnenkollektiv

Das Patientinnenkollektiv umfasst die Jahrgänge 2003 bis 2006 des Münchner Tumorregisters und beinhaltet alle am Pathologischen Institut der LMU München erstdiagnostizierten Ovarialkarzinome. Im Vorfeld wurden 87 Fälle aufgrund fehlenden Materials und 55 Fälle von Tumoren nichtepithelialen Ursprungs, respektive Borderline-Läsionen ausgeschlossen. 299 Fälle wurden selektiert und in die Untersuchungen eingeschlossen.

Das Alter bei Diagnose betrug zwischen 29 und 94 Jahren mit einem mittleren Erkrankungsalter von 61,5 Jahren (Standardabweichung 12,1 Jahre). Zum Zeitpunkt der Auswertung waren 193 Patientinnen (64,5%) verstorben, 104 (34,8%) lebten und in 2 Fällen (0,7%) fehlten die entsprechenden Angaben. Bei den Todesfällen waren 173 (89,6%) tumorabhängig, 7 (3,6%) tumorunabhängig, bei 13 Patientinnen (6,7%) war die Todesursache unbekannt. Bei den tumorassoziierten Todesfällen betrug das mittlere Überleben 38,0 Monate.

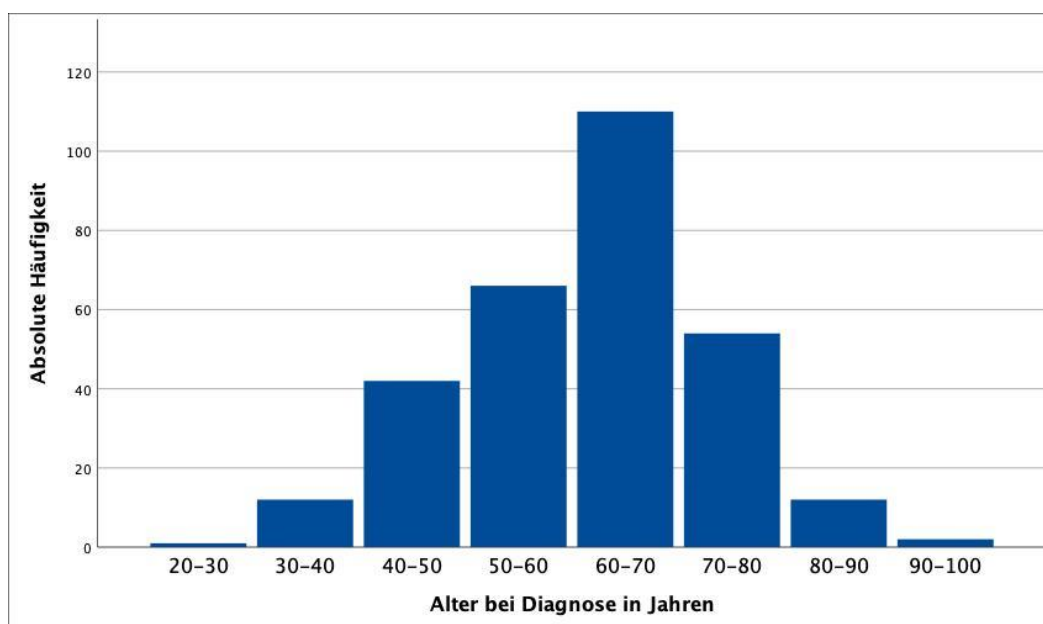


Abb. 2 Altersverteilung bei Diagnose

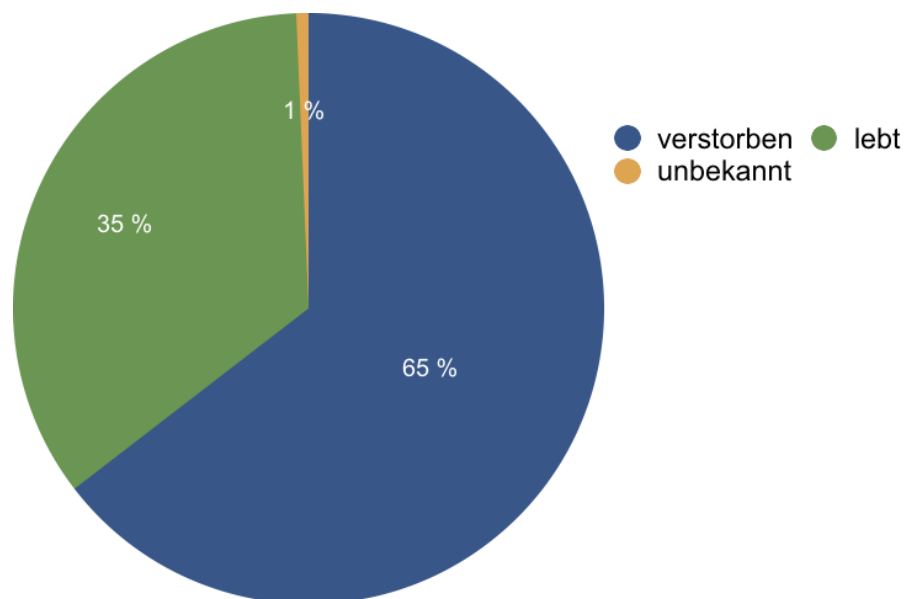


Abb. 3 Überleben zum Zeitpunkt der Datenerhebung

Die Klassifizierung der Ovarialkarzinome erfolgte zum Zeitpunkt der Untersuchung nach der Nomenklatur der WHO von 2014.

Von den 299 ausgewählten Fällen waren 247 serös (24 G1, 223 G3), 23 endometrioid (5 G1, 14 G2, 4 G3), 13 muzinös (3 G1, 8 G2, 2 G3), 4 klarzellig (per definitionem G3) und 4 seromuzinös (1 G1, 2 G2, 1 G3) differenziert. 8 Karzinome wurden als undifferenziert (G3) klassifiziert. Abbildung 5 zeigt das Verteilungsmuster des Differenzierungsgrades innerhalb der einzelnen Subkategorien. Aufgrund der Änderung zur Graduierung von serösen Ovarialkarzinomen erfolgte bei allen ursprünglich als G2 graduierten Fällen ein Nachgrading. Hinsichtlich FIGO-Klassifikation wurden 32 Fälle (10,7%) im Stadium I, 21 (7,0%) Fälle im Stadium II, 196 (65,6%) im Stadium III und 47 (15,7%) im Stadium IV diagnostiziert. In 3 Fällen (1,0%) fehlten die entsprechenden Angaben, eine Zuordnung war retrospektiv nicht möglich.

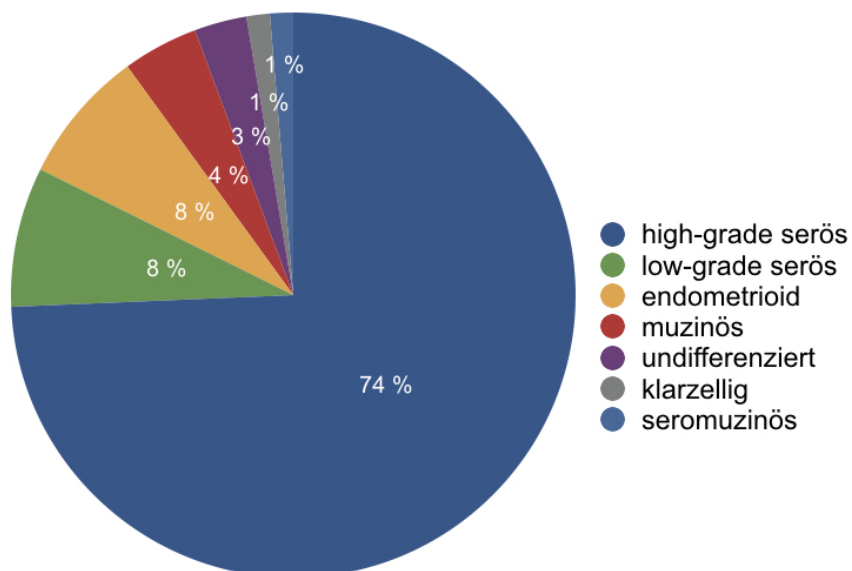


Abb. 4 Subgruppenverteilung des Gesamtkollektivs

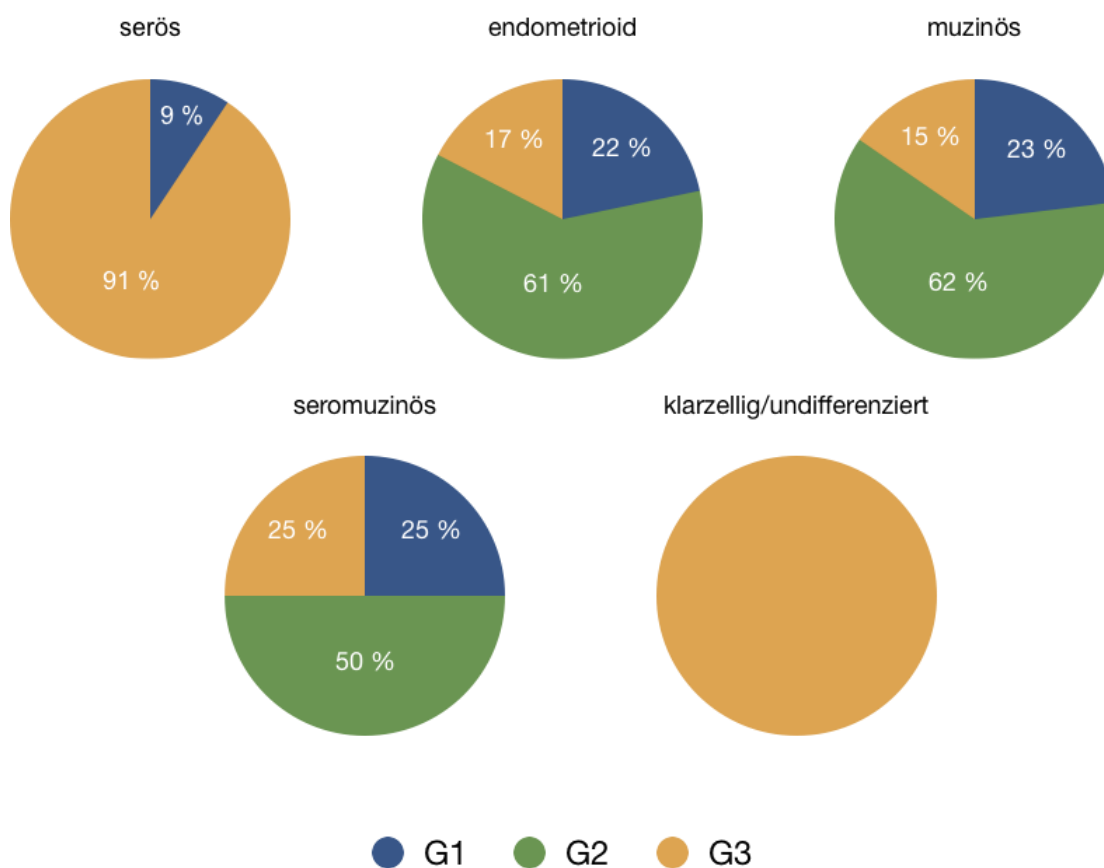


Abb. 5 Grading innerhalb der Subgruppen

2.2 Material

2.2.1 Histologisches Material

Es wurden alle asservierten Gewebeproben der eingeschlossenen Fälle gesichtet und analysiert. Dies erfolgte histologisch an Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten. Unter Berücksichtigung des gesamten Tumorbildes wurden ein bis zwei repräsentative, in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Tumorproben selektiert, an welchen die weiteren Untersuchungen erfolgen sollten. Hierbei wurde darauf geachtet, dass möglichst viele Tumorzellen erfasst sind und Nekrosezonen vermieden werden.

2.2.2 Geräte

Brutschrank, T6030	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Digitales Kontroll-Thermometer, 30 1034	TFA Dostmann GmbH, Wertheim-Reicholzheim, Deutschland
Färbeautomat Sakura, Tissue-Tek Prisma E2S, Code: 6133	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Färbeautomat, BenchMarkULTRA®, IHC Färbemodul	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz
Färbeautomat, BenchMarkXT®, IHC Färbemodul	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz
Gefrierschrank, Arctis,70340-GS1	Electrolux Hausgeräte GmbH, Nürnberg, Deutschland
Heizplatte, Präzitherm Typ 281	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Hybridisierungsgerät, StatSpin Thermo Brite, S500-24	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Hybridisierungsgerät, ZytoBrite Hybridizer	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Kühlplatte, Para Cooler	Weinkauf Medizin und Umwelttechnik, Forchheim, Deutschland
Kühlschrank, EN 153	Siemens AG, München, Deutschland
Magnetmischer, REO basic	IKA Labortechnik GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland

Mikroskop, 4776063	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop, Axioskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop, digital, Leica DMD108	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera, AxioCam HRC	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikrotom, ThermoFisher Microm, HM340E	Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA
pH-Messelektrode LE 409	Mettler Toledo Inc., Columbus, OH, USA
pH-Messgerät, FiveEasy	Mettler Toledo Inc., Columbus, OH, USA
Pipetten, Refence, 0,1-2,5µl bis 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten, Research, 10-100 bis 100 – 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schlittenmikrotom, SM 2000 R	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Deutschland
Thermometer, Electronic Standard, E905000	Amarell Electronic GmbH, Kreuzwertheim, Deutschland
Thermometer, Laborthermometer 12.1011	Matzner Messgeräte, München, Deutschland
Thermomischer, RCT basic	IKA Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Tischzentrifuge	Labnet International Inc., Edison, NJ, USA
Tissue Arrayer, Personal Tissue Arrayer	Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA
Universal Hybridisierungs-ofen, BD53#03-46769	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Vortexer, MX-S	Dragon Laboratory Instruments Ltd., Beijing, China
Waage, Handy H120-HD2	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Medax-Nagel GmbH, Neumünster, Deutschland
Wasserbad, W6	Medingen Labortechnik, GK Sondermaschinenbau GmbH, Arnsdorf, Deutschland

2.2.3 Verbrauchsmaterial

Deckgläser Thermo Scientific Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland

Eppendorfgefäße Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Fixogum Marabu GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland

Kaisers Glyceringelatine, Cat. No.
1.09242.0100 Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Mikroskopieröl, Immersol 518F Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

Objektträger, Menzel-Gläser
SuperFrost Ultra Plus Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland

Pipettenspitzen Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.2.4 Chemikalien

Aqua bidest Apotheke LMU, München, Deutschland

Chromogen AEC+, Cat. No. K3461 Dako, Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, CA, USA

Chromogen DAB+, Cat. No. K3467 Dako, Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, CA, USA

DAPI Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Merck, Steinheim,
Deutschland

Eindeckmedium Aquatex Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Eindeckmedium Eukitt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Merck, Steinheim, Deutschland
Ethanol (absolut)	AppliChem PanReac, Darmstadt, Deutschland
FISH Pretreatment Solution Citric I	ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland
Hämalaun nach Mayer	Apotheke LMU, München, Deutschland
HCl (1M, Maßlösung)	AppliChem PanReac, Darmstadt, Deutschland
Hematoxylin Gill's, Formula Cat. No. H-3401	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
PBS Puffer	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Pepsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Merck, Steinheim, Deutschland
Verbrauchsreagenzien für Ventana Benchmark® XT und ULTRA	Ventana Medical Systems, Roche Group, Basel, Schweiz
SSC Puffer	AppliChem PanReac, Darmstadt, Deutschland
Target Retrieval Solution, Cat. No. S1699	Dako, Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, CA, USA
Target Unmasking Fluid, Cat. No. Z000R0000	PanPath B.V., Amsterdam, Niederlande
Tween 20	AppliChem PanReac, Darmstadt, Deutschland
Vectashield , Mounting Medium	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Vectastain ABC-Kit, Elite Universal, Cat. No. PK6200	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid (7,5%, wässrig)	Apotheke LMU, München, Deutschland

Xylol reinst

AppliChem PanReac, Darmstadt, Deutschland

2.2.5 Antikörper und Detektionssysteme

Antigen	Antikörper Hersteller, Katalognr.	Klon	Verdünnung	Detektions-system
ARID1A	Abcam, Cambridge, Großbritannien ab182561	EPR 13501- 73	1:1200	Vectastain ABC-Kit Elite Universal (Fa. Vector, Cat. No. PK6200)
β-Catenin	Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, USA 760-4242	14	ready to use	Ventana UltraView DAB IHC Detection Kit
BRCA1	Abcam, Cambridge, MA, USA ab94	8F7	1:100	Vector Vectastain ABC-Kit Elite Universal (Cat. No. PK6200)
BRCA2	Atlas Antibodies, Bromma, Schweden HPA026815	polyclonal antibody	1:200	Vector ImmPRESS Reagent Kit Anti-RABBIT Ig (Cat. No. MP-7401)
EP3	Abcam, Cambridge, MA, USA ab189131	polyclonal antibody	1:300	Zytomed ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit) (Nr. POLHRP-100)
ER	Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, USA 790-4325	SP1	ready to use	Ventana UltraView DAB IHC Detection Kit
Her2	Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, USA 790-2991	4B5	ready to use	Ventana UltraView DAB IHC Detection Kit

Lef1	Cell Signaling, Danvers, MA, USA #2230	C12A5	1:150	Vectastain ABC-Kit Elite Universal
P16	Medac (Zeta), Wedel, Deutschland Z2217	G175-405	1:50	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit
P53	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA MS-186-P	DO-7	1:1000	Ventana UltraView DAB IHC Detection Kit
PR	Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, USA 790-4296	1E2	ready to use	Ventana UltraView DAB IHC Detection Kit
WT1	Agilent, Santa Clara, CA, USA M356101-2	6F-H2	1:100	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit

2.2.6 FISH Sonde

Zielgen	Antikörper Hersteller,	Katalognr.
ERBB2/HER2	ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland	Z-2015-50

2.2.7 Tissue Micro Array

Bei einem Tissue Micro Array (TMA) werden mehrere Gewebeproben auf einem Objektträger systematisch angeordnet.

Auf den HE-gefärbten Schnitten der selektierten Gewebelöcher wurde die Haupttumormasse lokalisiert und eingezeichnet. Anschließend wurden die korrelierenden Bereiche als Zylinder mit 2 mm Durchmesser aus dem zugehörigen Material gestanzt. Die so entstandenen Zylinder

wurden wiederum in einen vorbereiteten Trägerblock eingesetzt. Pro Fall wurden jeweils zwei Tumorstanzen in den Trägerblock gebettet. Zur Fixierung der Zylinder im TMA-Block erfolgt die Inkubation für 30 Minuten bei 37° Celsius. Bei einer Gesamtzahl von 299 Fällen wurden pro Objektträger im Durchschnitt 2 x 29 Tumorproben und 2 x eine Probe mit Kontrollgewebe aufgebracht. Dies ermöglichte eine zeit- und materialsparende Bearbeitung im Färbeprozess.

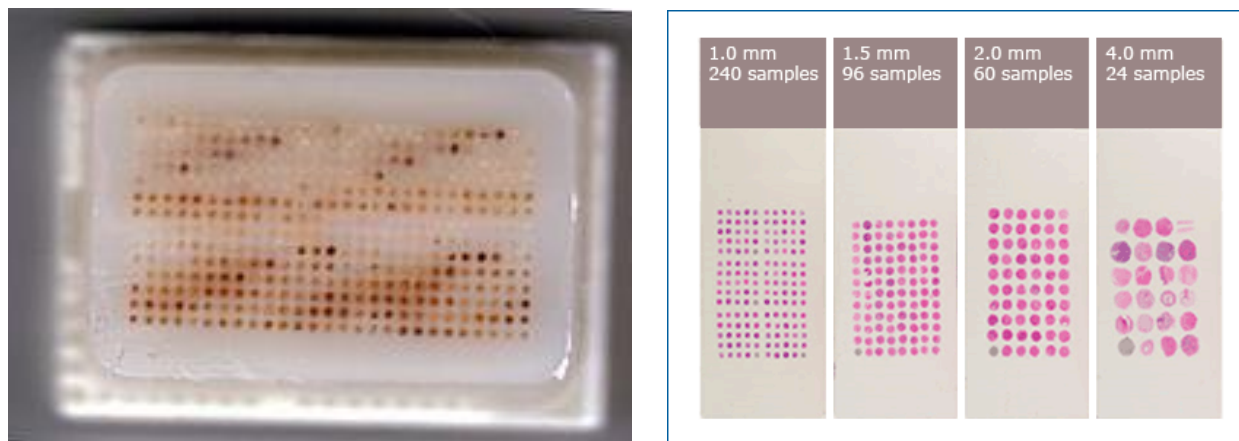


Abb. 6 links: TMA-Paraffin-Block, rechts: Gewebeproben auf Objektträger

Kontrolle	Kontrolle	OVCA7	OVCA7	OVCA14	OVCA14	OVCA21	OVCA21	OVCA28	OVCA28
OVCA1	OVCA1	OVCA8	OVCA8	OVCA15	OVCA15	OVCA22	OVCA22	OVCA29	OVCA29
OVCA2	OVCA2	OVCA9	OVCA9	OVCA16	OVCA16	OVCA23	OVCA23	OVCA30	OVCA30
OVCA3	OVCA3	OVCA10	OVCA10	OVCA17	OVCA17	OVCA24	OVCA24	OVCA31	OVCA31
OVCA4	OVCA4	OVCA11	OVCA11	OVCA18	OVCA18	OVCA25	OVCA25		
OVCA5	OVCA5	OVCA12	OVCA12	OVCA19	OVCA19	OVCA26	OVCA26		
OVCA6	OVCA6	OVCA13	OVCA13	OVCA20	OVCA20	OVCA27	OVCA27		

Abb. 7 TMA Lageplan

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Allgemein

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein gebräuchliches Verfahren zur Detektion von Antigenstrukturen (Epitopen) im Gewebe. Hierbei binden monoklonale oder polyklonale Antikörper in einer immunologischen Reaktion das spezifische Antigen. Die Methodik der Detektion unterscheidet die direkte von der indirekten. Bei der direkten IHC wird der Antigen-

Antikörper-Komplex mittels markierter Antikörper visualisiert. Gekoppelt sind Enzyme für eine Farbreaktion oder fluoreszierende Partikel. Bei der indirekten Methode erfolgt die Detektion durch einen zweiten Schritt, in welchem ein markierter Sekundärantikörper den Primärantikörper bindet. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an den primären Immunkomplex eine Verstärkung des Signals erreicht wird.

2.3.2 Färbeprozess

Der Färbeprozess lief stets in standardisierten Arbeitsschritten ab, welche im Folgenden erläutert werden. Für etablierte Färbungen wurde der Prozess in einem Färbeautomat durchlaufen. Die weniger häufigen Untersuchungen wurden von Hand gefärbt.

In einem ersten Arbeitsschritt erfolgte die Vorbereitung der geschnittenen und auf Objektträger aufgetragenen Gewebeproben. Mittels Bades in Xylol wurde die Entparaffinierung durchgeführt. Zur Entfernung des Xylols wurden die Schnitte anschließend in reinem Ethanol geschwenkt.

Um eine Verfälschung des Ergebnisses durch endogene Peroxidasen zu vermeiden, wurden diese im Bad mit Wasserstoffperoxid blockiert.

Zur Hydrophilisierung erfolgte das Schwenken im Ethanolbad absteigender Konzentration und die Spülung mit destilliertem Wasser.

Durch die Fixierung in Formalin und Einbettung in Paraffin entstehen im Gewebe Quervernetzungen und Molekülmodifikationen, welche die Immunreaktivität beeinflussen, was wiederum das Ergebnis der gesamten Färbung verfälschen würde. Aus diesem Grund wurden im nächsten Schritt diese ungewollten Bindungen im Natrium-Citrat-Puffer unter Dampfhitze oder alternativ, je nach Färbeschema, mit Mikrowellen gespalten. Im Anschluss wurde eine erneute Spülung mit destilliertem Wasser und phosphatgepufferter Salzlösung durchgeführt.

Neben der Molekülstruktur beeinflussen auch elektrostatische Ladungen im Gewebe die Antigen-Antikörper-Reaktion. Durch Zugabe einer Blockierlösung konnten diese ausgeglichen und eine unspezifische Antikörperbindung verhindert werden.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in spezifischer Verdünnung.

Da alle Verfahren, welche im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, der Gruppe der indirekten IHC angehören, folgte ein weiterer Schritt zur Detektion der Antikörper-Antigen-Komplexe. Bei der HRP-Methode (horseradish peroxidase) ist die Peroxidase an den Sekundärantikörper gebunden, welcher mit dem Primärantikörper interagiert. Das

zugegebene Diaminobenzidin (DAB) wird durch das gekoppelte Enzym in das unlösliche Endprodukt, einen braunen Farbstoff, umgewandelt. Bei der ABC (avidin biotin complex) Methode findet die bereits erwähnte Signalverstärkung Anwendung. Hierbei ist der Sekundärantikörper nicht direkt an das Enzym gekoppelt, sondern ist biotinyliert. Weiter wird an HRP-gekoppeltes Streptavidin (durch *Streptomyces avidinii* synthetisiertes Avidin) zugegeben. Durch die hohe Bindungsaffinität von Avidin und Biotin kommt es zur Bildung von Komplexen, da Avidin jeweils 4 Bindungsstellen für Biotin aufweist. Die so entstandenen Komplexe enthalten die farbgebende Peroxidase. Analog zur HRP Methode erfolgt die Detektion durch Umwandlung von DAB zum braunen Farbstoff.

Um die Farbreaktion zu stoppen, wurde das Substrat DAB mit destilliertem Wasser ausgewaschen.

Zur Färbung der elektrostatisch negativ geladenen Gewebestrukturen wurde im Anschluss an die Immunreaktion eine Gegenfärbung mit saurem Hämalun nach Mayer oder Gill durchgeführt. Im Bad mit Leitungswasser entstand eine blaue Farbreaktion, sodass Antigene und Gewebe histologisch beurteilt werden konnten.

Im Bad einer aufsteigenden Alkoholreihe und in Xylol erfolgte die Dehydrierung, bevor die gefärbten Gewebeproben mittels Eindeckmedium und Deckglas luftdicht verschlossen wurden.

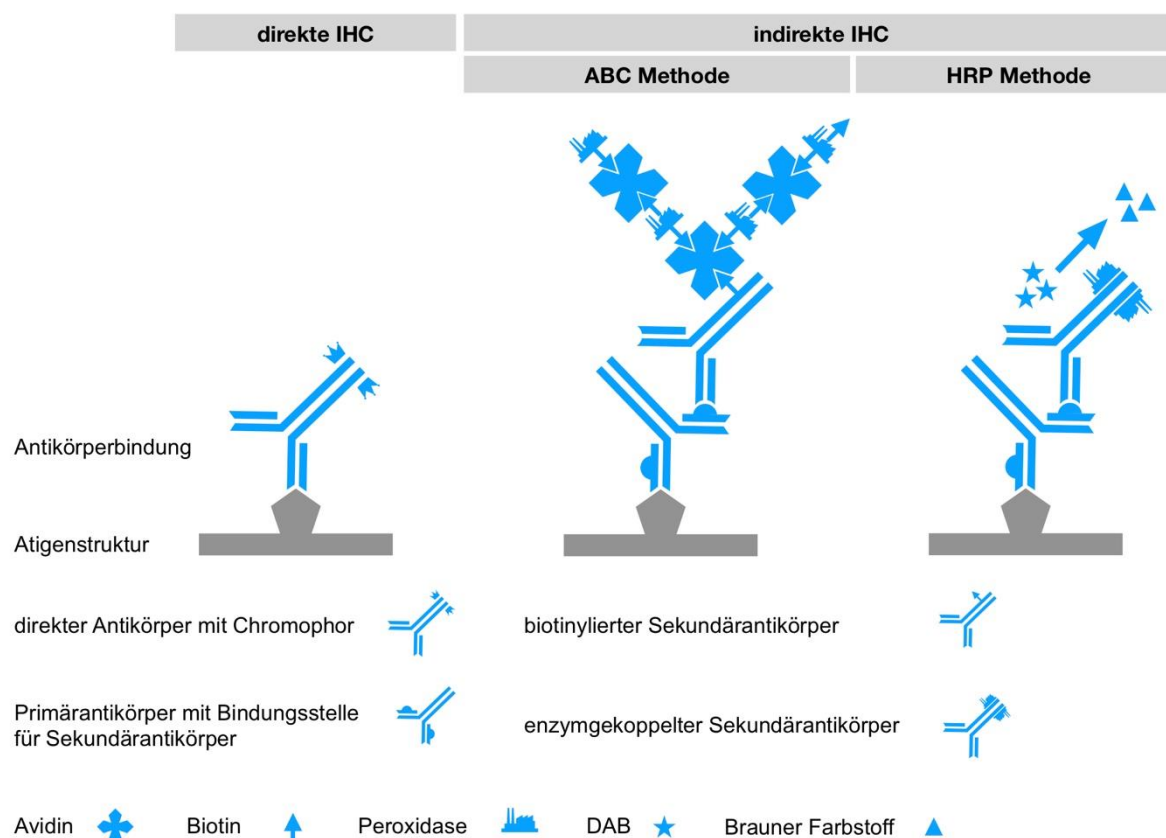


Abb. 8 Methodik der IHC

2.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

2.4.1 Allgemein

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist eine Methode zur Detektion bestimmter Basensequenzen im RNA- und DNA-Einzelstrang. Hierbei nutzt man die spezifische Bindung komplementärer Nukleinsäuren. Synthetisierte Sonden sind an ein fluoreszierendes Molekül gebunden, welche nach Hybridisierung mit der Zielsequenz in polarisiertem Licht visualisiert werden können.

2.4.2 Färbeprozess

Der Färbeprozess läuft bei der FISH ebenfalls nach standardisiertem Schema ab. Dieses wird in Abhängigkeit der verwendeten Sonden angepasst, jedoch nicht wesentlich im Verlauf abgeändert.

Analog zur Vorbehandlung bei der IHC erfolgte zunächst die Entparaffinierung der geschnittenen und auf Objektträger aufgetragenen Proben mit Xylol und Ethanol. Im Anschluss wurden diese an der Luft getrocknet.

Die ungewollten, durch die Fixierung und Einbettung entstandenen, Quervernetzungen der Moleküle wurden mittels Inkubation im Brutschrank im Natrium-Citrat-Puffer gespalten, welcher nach diesem Schritt mit destilliertem Wasser abgespült wurde.

Um die Penetration der Sonden durch die Zellmembran zu ermöglichen, wurde in einem nächsten Schritt eine Pepsin-Lösung auf das Gewebe aufgetragen. Nach der Inkubation für 20 Minuten bei 37°C erfolgte die erneute Spülung mit destilliertem Wasser. Nachdem die Objektträger an der Luft getrocknet waren, wurde das zu hybridisierende Areal zur besseren Visualisierung mit einem Diamantschreiber markiert.

Nach der Denaturierung der Gewebeproben bei 77,5°C für 5 Minuten wurden die auf Raumtemperatur gebrachten DNA-Sonden auf das markierte Areal pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Im Anschluss wurden die Deckgläser mittels Fixogum, einem auf Naturkautschuk basierendem Montagekleber, abgedichtet. Es war darauf zu achten, dass sich unter dem Deckglas keine Luftblasen befinden, um eine gleichmäßige Verteilung der Sonden zu gewährleisten. Die Co-Denaturierung erfolgte für weitere 10 Minuten auf der Heizplatte. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Sonden wurde hierbei eine lichtdichte Abdeckung verwendet. Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C für 16-18 Stunden.

Am folgenden Tag wurden Fixogum und das Deckglas vom Objektträger entfernt. Nach Spülung in SSC-Puffer (saline-sodium-citrate) und Polysorbat 20 (auch Tween 20) wurde das 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Gegenfärbemittel (DAPI) aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt.

Die so entstandenen Präparate waren bis zur Auswertung lichtgeschützt und gekühlt bei 4°C zu lagern. Eine Langzeitlagerung der Präparate ist nicht möglich.

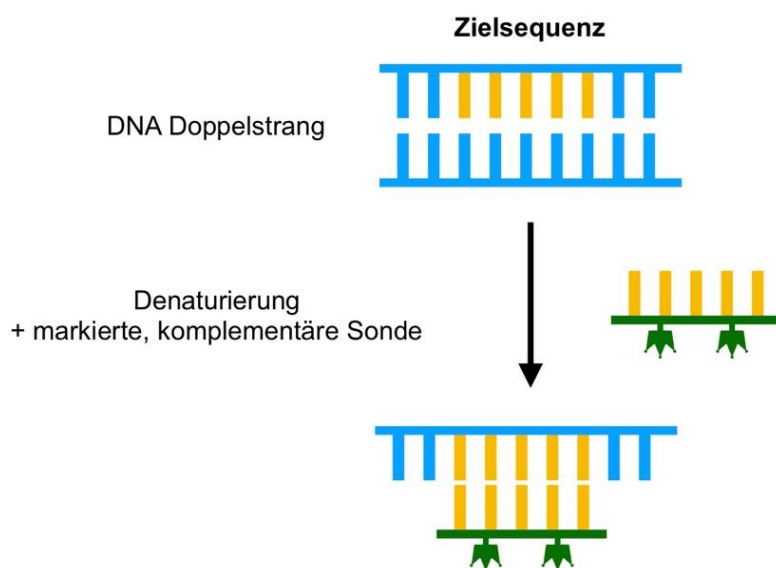


Abb. 9 Methodik der FISH

2.5 Auswertung

2.5.1 Immunhistochemie

2.5.1.1 PR und ER

Die Bewertung der Standardfärbungen PR und ER erfolgte, wie aktuell allgemein definiert, nach Beurteilung des Anteils gefärbter Tumorzellen. Als PR bzw. ER „positiv“ wurden Tumoren eingeordnet, sobald mehr als 5% der Zellen eine Farbreaktion aufwiesen. Die Intensität der Färbung wurde bei der Klassifizierung nicht berücksichtigt. Unterhalb dieser definierten Grenze wurden die Fälle als „negativ“ klassifiziert (Vang R et al. 2005) (Kurman RJ et al. 2014).

2.5.1.2 WT1 und ARID1A

Die Klassifizierung der Färbungen für WT1 und ARID1A erfolgte analog zueinander und nach etablierter Methodik in ein dichotomes System. „Negativ“ wurde als vollständiges Fehlen einer Farbreaktion definiert. Als „positiv“ wurden Tumoren gewertet, welche eine Färbung jeglicher Intensität aufwiesen. Der Anteil gefärbter Zellen wurde jeweils nicht berücksichtigt (Heckl M. et al 2018) (Netinatsunthorn W et al. 2006).

2.5.1.3 BRCA1 und BRCA2

In der Literatur werden aktuell verschiedene Systeme zur Beurteilung von BRCA1- und BRCA2-Expression verwendet. Am häufigsten wird der Cut-Off für den BRCA-Expressionsverlust in der IHC auf 10% gefärbte Zellen festgelegt, wobei die Färbeintensität ausgeklammert wird. Dies bedeutet, dass eine BRCA1- oder BRCA2-Alteration vorliegt, wenn weniger als 10% der Tumorzellen gefärbt sind (Teixeira LA und Candido dos Reis FJ 2019). Die Auswertung am vorliegenden Kollektiv erfolgte im Hinblick auf die Färbeintensität und den Anteil gefärbter Zellen. Als „positiv“ wurden die Fälle gewertet, bei denen eine Farbreaktion in geringer Intensität vorlag und/oder der Anteil gefärbter Zellen 10% unterschritt.

2.5.1.4 EP3

EP3 wurde in Anlehnung an die Publikation von *Czogalla et al.* nach dem immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele durchgeführt. Hierbei wurde die Färbeintensität in keine (0), schwach (1), mäßig (2) und stark (3) eingeteilt. Ebenso wurde der Anteil der reaktiven Zellen in die Kategorien keine (0), weniger als 10% (1), 10-50% (2), 50-80% (3) und mehr als 80% (4) eingeordnet. Das Produkt beider Werte lieferte den IRS, welcher als „negativ“ (0-2), „schwach positiv“ (3-5), „mäßig positiv“ (6-8) und „stark positiv“ (9-12) definiert wurde. EP3-Positivität wurde für Scores ≥ 2 definiert (Czogalla B. et al. 2019) (Remmele W und Stegner HE 1987).

2.5.1.5 Her2

Die Auswertung der Her2-IHC erfolgte nach den Guidelines der American Society of Clinical Oncology (Wolff A et al. 2013) (Wolff A et al. 2018). Dieses System teilt die Tumoren in drei Kategorien ein. Als „negativ“ wurden die Proben klassifiziert, welche keine oder nur eine schwache Färbung der Zellmembran aufwiesen. Als „unklar“ wurden Tumoren bezeichnet, bei welchen eine inkomplette, moderate zirkumferentielle Färbung der Zellmembran in $> 10\%$ oder eine starke zirkumferentielle Färbung in $\leq 10\%$ der Zellen auftrat. Falls eine starke Färbung der gesamten Membran nachgewiesen wurde, wurden diese Tumoren als „positiv“ für Her2-Expression eingestuft.

2.5.1.6 Lef1

Die primäre Beurteilung der Färbung für Lef1 erfolgte nach dem Anteil gefärbter Zellen, wobei die Färbeintensität nicht maßgeblich war. Der Cut-Off für Positivität wurde in Anlehnung an die Praxis der Lymphomdiagnostik auf 70% reaktive Zellen festgelegt (Menter T et al. 2017).

2.5.1.7 β -Catenin

Bei der Beurteilung der immunhistochemischen Färbung von β -Catenin erfolgte die Einteilung in 3 Gruppen nach Verteilungsmuster in den Tumorzellen. Als „zytoplasmapositiv“ wurden die Fälle gewertet, welche eine Färbung der Zellmembran und des Zytoplasmas, nicht jedoch des Kerns aufwiesen. „Kernpositiv“ wurden die Fälle bezeichnet, welche eine teilweise oder komplette nukleäre Färbung zeigten. Waren die Tumorzellen nicht gefärbt, wurden sie als „negativ“ klassifiziert.

2.5.1.8 p53

Eine Aberration in der Expression von p53, hier als „p53-positiv“ definiert, zeichnet sich durch die Überexpression oder komplettes Fehlen des Proteins aus. Das Fehlen wurde definiert als Nachweis bei weniger als 5% der Zellen. Überexpression wurde definiert als intensive Färbung bei mehr als 50% der Tumorzellen. In der Literatur liegt der Cut-Off für Überexpression meist bei 80%. Dies wurde aus technischen Gründen bei dieser Arbeit jedoch angepasst (Kurman RJ et al. 2014) (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2020) (Staebler A und Mayr D 2017).

2.5.1.9 p16

p16 wurde im Hinblick auf Färbeintensität und den Anteil gefärbter Zellen ausgewertet. Als „p16-positive“ Tumoren wurden diejenigen bezeichnet, bei denen eine zumindest moderate Färbeintensität in mehr als 90% aller Zellen aufgetreten war. Dieses „block-staining“ definiert sich als Färbung sowohl des Zellkerns als auch des Zytoplasmas im Zellverbund von mehr als 10-20 Zellen. In der Literatur wird die Einteilung nach diesen Kriterien aktuell empfohlen (Clinton LK et al. 2015) (Rambau PF et al. 2018)

2.5.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Auswertung der FISH-Analyse von HER2 erfolgte gemäß der Empfehlung zur Testung des Her2-Status beim Mammakarzinom der American Society of Clinical Oncology von 2013 unter Berücksichtigung des Updates aus dem Jahr 2018 (Wolff A et al. 2013) (Wolff A et al. 2018). Zunächst wurden in den entsprechenden Gewebeproben Bereiche potentieller Her2-Amplifikationen lokalisiert, in welchen in 25 Zellkernen das Gen- und Zentromersignal gezählt wurde. Dieses Verfahren wurde jeweils an beiden Stenzen eines Falles durchgeführt, sodass pro Tumor 50 Zellkerne analysiert wurden. Konnte diesen Anforderungen nicht nachgekommen werden, wurden die entsprechenden Fälle als „technisch nicht auswertbar“ beurteilt und ausgeschlossen. Die Beurteilung des Amplifikationsstatus erfolgte anhand zweier Quotienten. Quotient A liefert das Verhältnis vom Gen- zum Zentromersignal. Quotient B liefert das Verhältnis des Gensignals zu den gezählten Kernen. Als nicht amplifiziert bzw.

negativ wurden die Proben beurteilt, wenn Quotient A $< 2,0$ und Quotient B $< 4,0$ waren. Unklarer Amplifikationsstatus bestand bei Quotient A $< 2,0$ und Quotient B $\geq 4,0$ und $< 6,0$. Eine Amplifikation wurde angenommen, sobald der Quotient A $\geq 2,0$ oder Quotient A $< 2,0$ und Quotient B $\geq 6,0$ lieferten. Veranschaulicht wird dies im folgenden Flowchart.

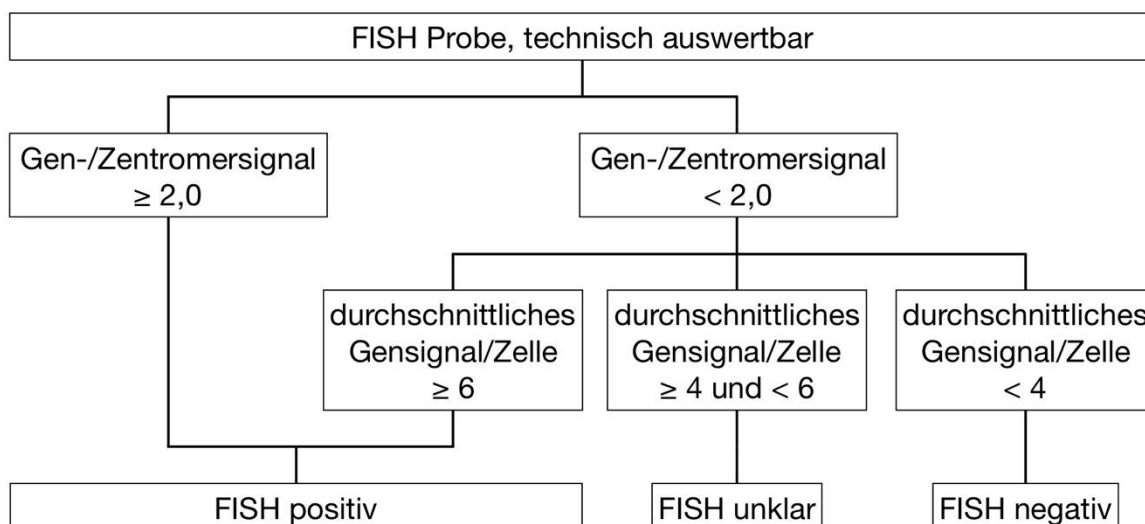


Abb. 10 Flowchart Auswertung Her2 FISH

2.6 Statistik

Die Dokumentation und die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics 26.

Zur Evaluation eines Zusammenhangs zwischen nominal- und ordinalskalierten Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet. Wenn die erwartete Häufigkeit einer Zelle der Kreuztabellen weniger als 5 betrug, wurde der exakte Test nach Fisher verwendet.

Um einen linearen Zusammenhang zweier mindestens ordinalskalierter Variablen zu prüfen, wurde die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Die Testung auf Signifikanz erfolgte zweiseitig und wurde als p-Wert angegeben.

Die Überlebensanalysen erfolgten mittels Überlebens Tabellen und Kaplan-Meier-Kurven. Ob eine statistisch signifikante Unterscheidung der Kurven vorlag, wurde mit dem Log-Rank-Test überprüft.

Zur Überprüfung des prognostischen Einflusses von Rezeptorkombinationen wurde zudem die Cox-Regression angewendet. Dieses Modell ermöglicht eine multivariate Analyse unabhängiger Variablen im Hinblick auf die Überlebenszeit, sodass das Risiko für ein Ereignis,

in diesem Fall der Tod, als individuelle Risikorate (Hazard Ratio) angegeben werden kann. Welche Gruppe als Referenz festgelegt wurde, ist im jeweiligen Abschnitt deklariert.

Statistische Signifikanz wurde allgemein für p-Werte $< 0,05$ definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Statistik

3.1.1 Östrogenrezeptor α

298 (99,7%) Fälle konnten bezüglich des Östrogenrezeptorstatus beurteilt werden. In einem Fall (0,3%) war die Auswertung technisch nicht möglich. 41 Fälle (13,7%) waren nach definierten Kriterien negativ, 257 Fälle (86,0%) zeigten eine Expression des Rezeptors.

Der exakte Test nach Fisher zeigte einen zweiseitigen, statistisch signifikanten Zusammenhang des histologischen Subtyps mit der Expression von ER ($p < 0,001$).

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	negativ	41	13,7	13,7	13,7
	positiv	257	86,0	86,0	99,7
	technisch nicht auswertbar	1	,3	,3	100,0
	Gesamt	299	100,0	100,0	

Tab. 3 Verteilungsmuster ER α

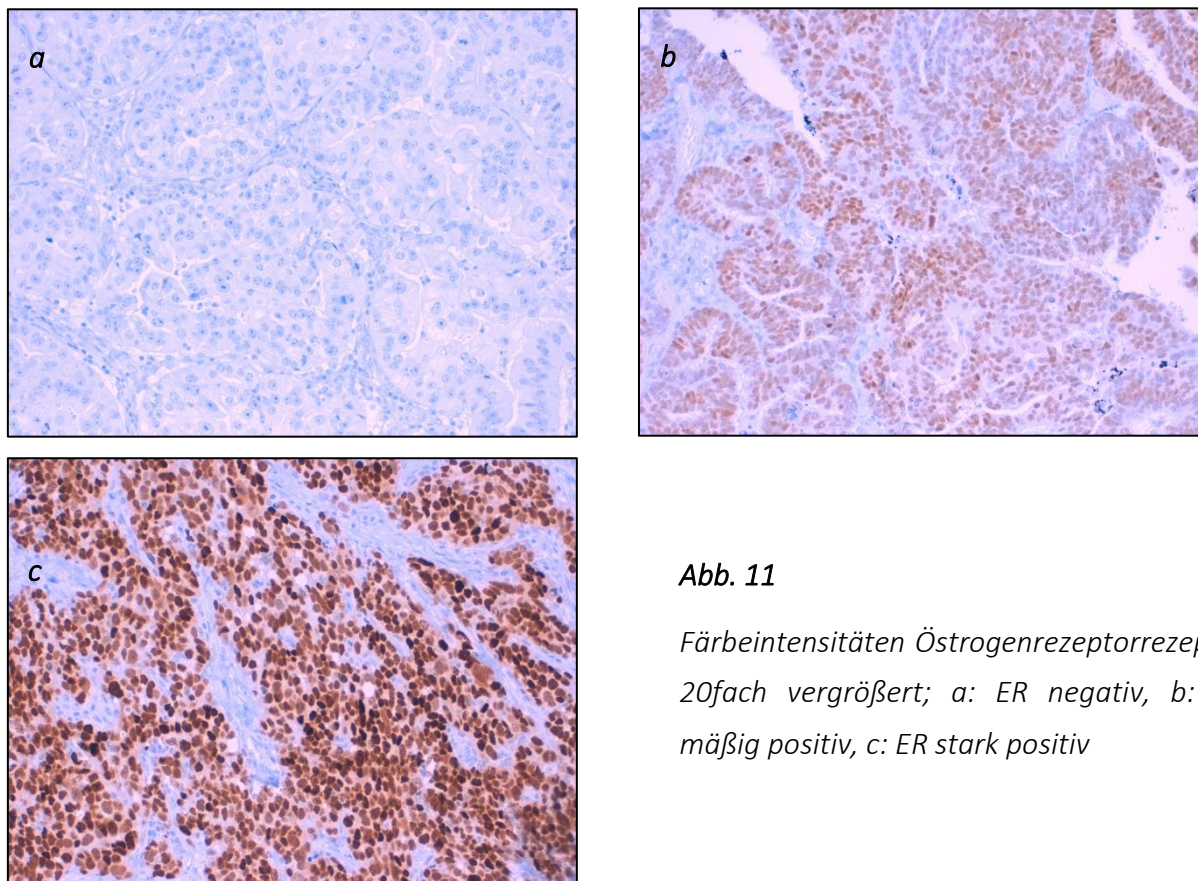


Abb. 11

Färbeintensitäten Östrogenrezeptor
20fach vergrößert; a: ER negativ, b: ER
mäßig positiv, c: ER stark positiv

3.1.2 Progesteronrezeptor

Die Färbung für PR war in 298 Fällen (99,7%) technisch auswertbar. Ein Fall (0,3%) wurde bei der Erhebung des Status ausgeschlossen. 92 Fälle (30,8%) wurden als negativ, 206 Fälle (68,9%) als positiv klassifiziert.

Eine Abhängigkeit des Progesteronrezeptorstatus und des histologischen Subtyps konnte nicht nachgewiesen werden ($p = 0,324$). Es zeigte sich ein Zusammenhang mit dem ER α -Status ($p < 0,001$). Häufig wird eine Co-Expression beider Rezeptoren beobachtet.

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	negativ	92	30,8	30,8	30,8
	positiv	206	68,9	68,9	99,7
	technisch nicht auswertbar	1	,3	,3	100,0
	Gesamt	299	100,0	100,0	

Tab. 4 Verteilungsmuster PR

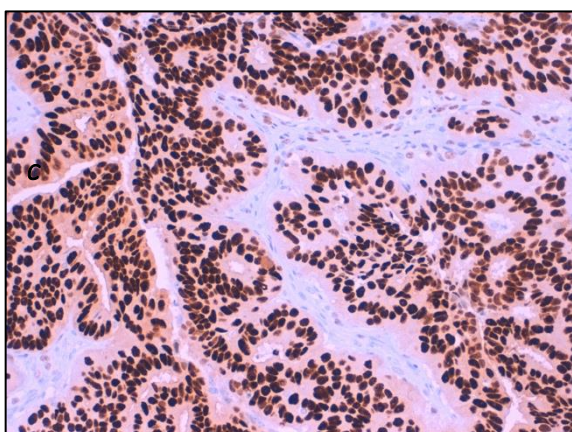
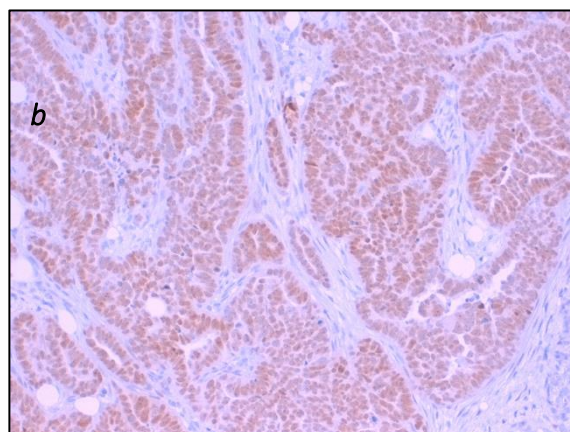
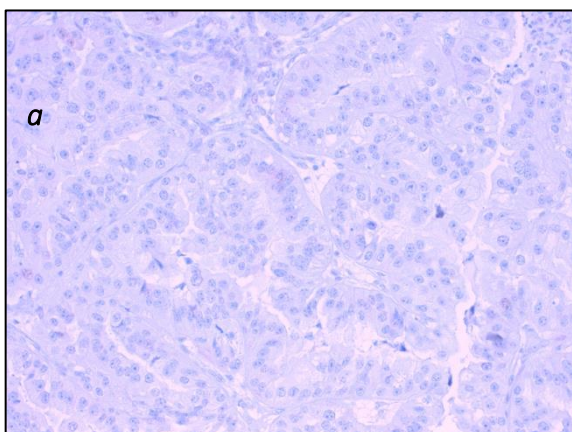


Abb. 12

Färbeintensitäten Progesteronrezeptor
20fach vergrößert; a: PR negativ, b: PR
mäßig positiv, c: PR stark positiv

3.1.3 WT1

41 Fälle (13,7%) waren negativ, 240 Fälle (80,3%) positiv. WT1 wurde, in Anlehnung an aktuelle Publikationen, ebenfalls zur Verifikation der histologischen Subtypenklassifikation eingesetzt (Kurman RJ et al. 2014). Die IHC für WT1 konnte bei 18 Proben (6%) nicht ausgewertet werden.

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang des WT1-Status mit den histologischen Subtypen ($p < 0,001$). Positivität trat im größten Teil bei seröser Differenzierung auf.

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	negativ	41	13,7	13,7	94,0
	positiv	240	80,3	80,3	80,3
	technisch nicht auswertbar	18	6,0	6,0	100,0
	Gesamt	299	100,0	100,0	

Tab. 5 Verteilungsmuster WT1

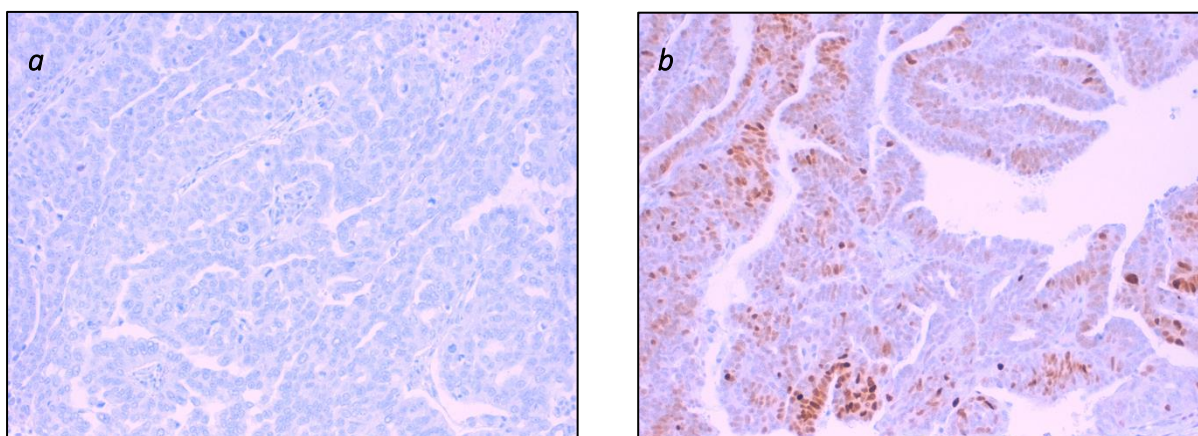


Abb. 13 Farbreaktion WT1 20fach vergrößert; a: WT1 negativ, b: WT1 positiv

3.1.4 ARID1A

Die Färbung für ARID1A konnte in allen 299 Fällen (100%) beurteilt werden. 14 Fälle (4,7%) wurden als negativ, 285 (95,3%) als positiv klassifiziert.

Der ARID1A-Status zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit dem histologischen Subtyp ($p = 0,069$).

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	keine Färbereaktion	14	4,7	4,7	4,7
	Färbereaktion vorhanden	285	95,3	95,3	100,0
Gesamt		299	100,0	100,0	

Tab. 6 Verteilungsmuster ARID1A

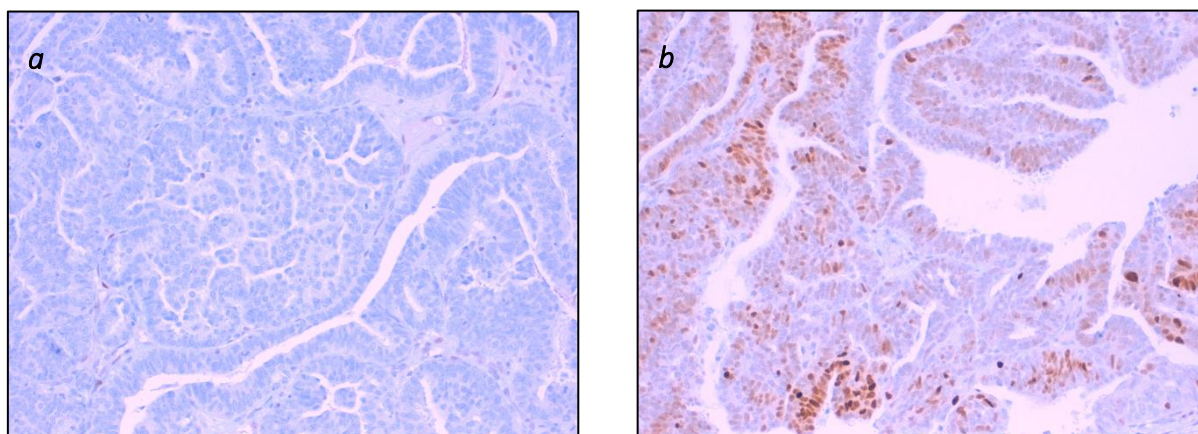


Abb. 14 Farbreaktion ARID1A 20fach vergrößert; a: ARID1A negativ, b: ARID1A positiv

3.1.5 BRCA1

In 236 Fällen (78,9%) wurde das Färbemuster als negativ, gewertet. 61 Fälle (20,4%) wurden als positiv klassifiziert. Bei der Färbung für BRCA1 wurden 2 Fälle (0,7%) aufgrund mangelnder Beurteilbarkeit ausgeschlossen.

Ein statistischer Zusammenhang zum histologischen Typ konnte nicht nachgewiesen werden ($p = 0,610$). Es fällt jedoch auf, dass in 78,7% der positiven Fälle ein seröses high-grade Karzinom vorlag.

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	negativ	236	78,9	78,9	78,9
	positiv	61	20,4	20,4	99,3
	technisch nicht auswertbar	2	,7	,7	100,0
Gesamt		299	100,0	100,0	

Tab. 7 Verteilungsmuster BRCA1

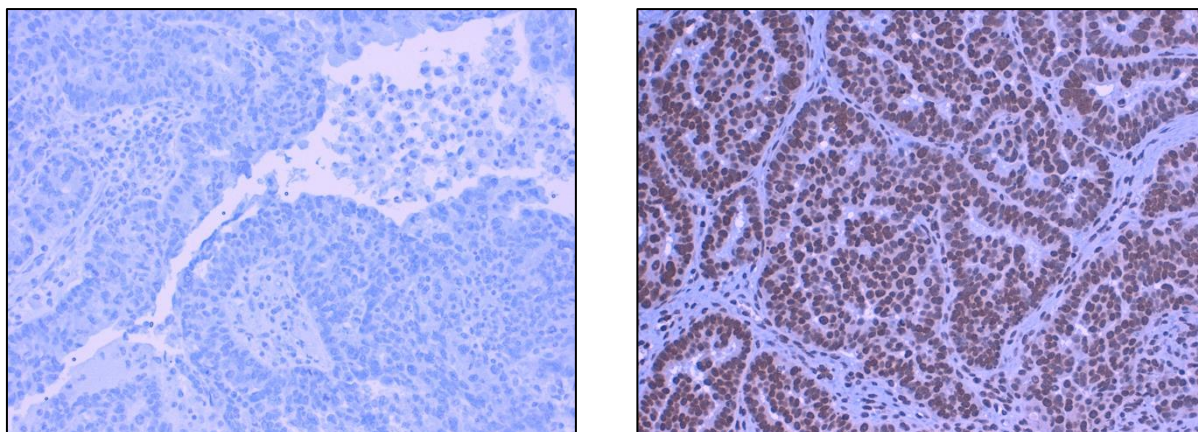


Abb. 15 BRCA1 Expression 20fach vergrößert, a: BRCA1 Expressionsverlust, b: BRCA1 Wildtyp-Expression (analog hierzu BRCA2)

3.1.6 BRCA2

BRCA2 konnte am gesamten Kollektiv ausgewertet werden. 259 Fälle (86,6%) zeigten eine Wildtyp-Ausprägung und wurden als negativ eingestuft. Bei 40 Fällen (13,4%) lag ein aberrantes Expressionsmuster von BRCA2 vor, sodass diese als positiv gewertet wurden.

Der exakte Test nach Fisher zeigte keinen Zusammenhang der BRCA2-Ausprägung und des histologischen Subtyps ($p = 0,847$). In 80,0% der positiven Fälle wurde das Karzinom histomorphologisch als seröses high-grade Karzinom klassifiziert.

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	negativ (wildtyp)	259	86,6	86,6	86,6
	positiv (mutiert)	40	13,4	13,4	100,0
	Gesamt	299	100,0	100,0	

Tab. 8 Verteilungsmuster BRCA2

3.1.7 EP3

78 Fälle (26,1%) wurden als negativ, 211 Fälle (70,6%) als positiv klassifiziert. In 10 Fällen (3,3%) war eine Beurteilung der EP3 Färbung technisch nicht möglich.

Wurde das Gesamtkollektiv betrachtet, ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang der EP3-Ausprägung mit den jeweiligen Subtypen ($p = 0,256$).

Korrelierte man den IRS von EP3 mit dem FIGO-Stadium, so ergab sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang (Spearman's Rho = -0,036, $p = 0,547$, $n = 289$). Zwischen der EP3-Expression und dem Grading zeichnete sich eine inverse Korrelation ab; diese erreichte aber nicht statistische Signifikanz (Spearman's Rho = -0,110, $p = 0,061$, $n = 289$).

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	negativ	78	26,1	26,1	26,1
	positiv	211	70,6	70,6	96,7
	technisch nicht auswertbar	10	3,3	3,3	100,0
	Gesamt	299	100,0	100,0	

Tab. 9 Verteilungsmuster EP3

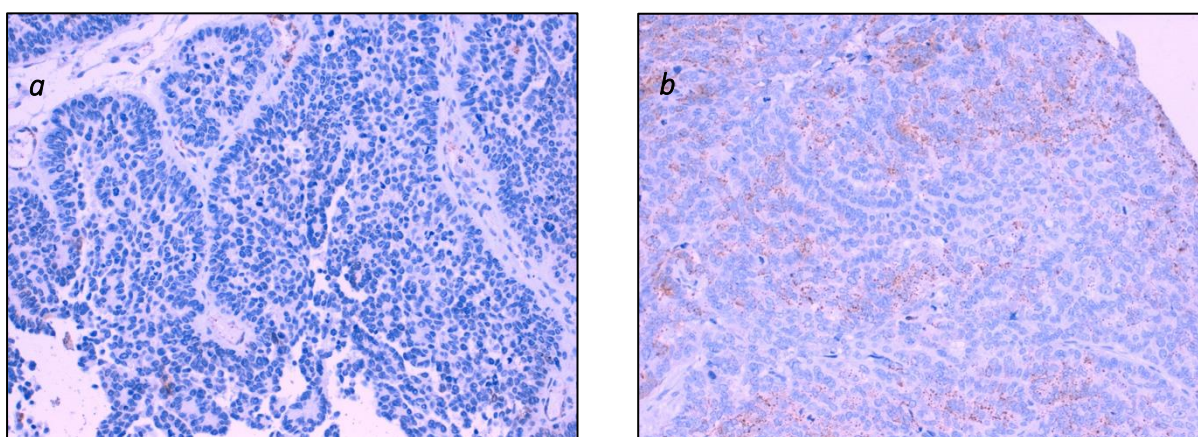


Abb. 16 Farbreaktion EP3 20fach vergrößert; a: EP3 negativ, b: EP3 positiv

3.1.8 Her2

Immunhistochemisch konnte das gesamte Kollektiv (100%) bezüglich des Her2-Rezeptorstatus beurteilt werden. 252 Fälle (84,3%) wurden als negativ, 44 Fälle (14,7%) als unklar und 3 Fälle (1,0%) als positiv eingestuft.

Der in der IHC ermittelte Her2-Status zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit der Klassifikation der histologischen Subtypen ($p = 0,672$). Ebenfalls zeigte sich keine Korrelation der immunhistochemischen Färbereaktion mit dem Grading (Spearman's Rho = -0,089, $p = 0,124$, $n = 299$) oder dem FIGO-Stadium (Spearman's Rho = 0,030, $p = 0,601$, $n = 299$).

Eine Amplifikation zeigte sich bei 12 Tumoren (4,0%). 12 (4,0%) wurden als unklar und 271 (90,7%) als nicht amplifiziert gewertet. In der FISH konnten 4 Fälle (1,3%) nicht beurteilt werden.

Für die amplifizierten Fälle zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit high-grade seröser Differenzierung und undifferenzierten Karzinomen ($p = 0,035$). Bei 10 der amplifizierten Fälle lag ein seröser high-grade, bei 2 Fällen ein undifferenzierter Subtyp vor. Eine Korrelation konnte weder für das Grading (Spearman's Rho = $-0,003$, $p = 0,964$, $n = 295$) noch für das FIGO-Stadium (Spearman's Rho = $0,090$, $p = 0,125$, $n = 295$) gezeigt werden.

Die 3 in der IHC positiv eingeordneten Fälle zeigten auch in der FISH eine Amplifikation. Von den 44 in der IHC unklaren Fällen war bei 9 (20,5%) eine Her2-Amplifikation nachweisbar. 5 (11,4%) blieben auch in der FISH unklar, 28 (63,6%) zeigten keine Her2-Amplifikation und 2 (4,5%) waren in der FISH technisch nicht beurteilbar. Von den 252 immunhistochemisch Her2-negativen Tumoren war in der FISH bei 243 Fällen (96,4%) keine Amplifikation vorhanden, 7 Fälle (2,8%) waren von unklarem Status und 2 (0,8%) waren nicht auswertbar.

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	negativ	252	84,3	84,3	84,3
	unklar	44	14,7	14,7	99,0
	positiv	3	1,0	1,0	100,0
	Gesamt	299	100,0	100,0	

Tab. 10 Verteilungsmuster Her2 IHC

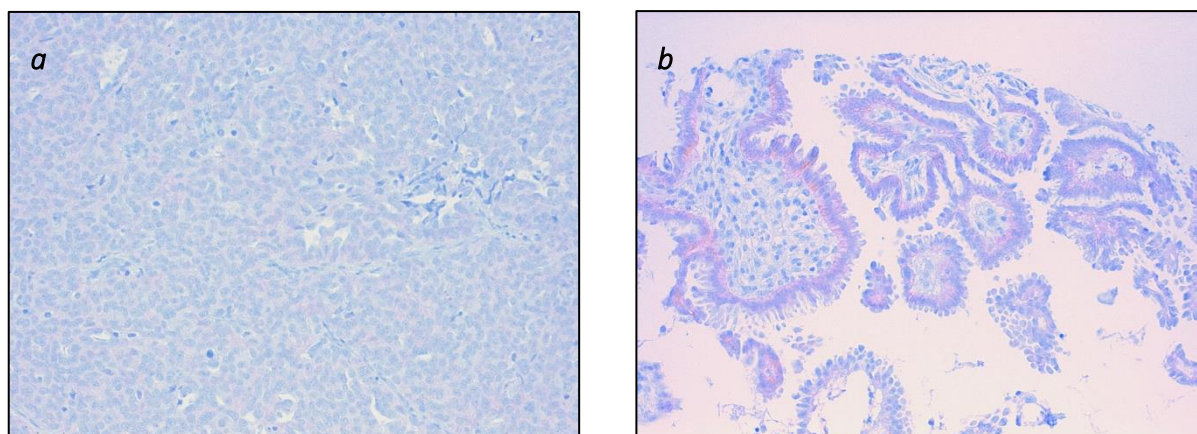


Abb. 17 Farbreaktion Her2 20fach vergrößert; a: Her2 negativ, b: Her2 positiv

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	nicht amplifiziert	271	90,6	90,6	90,6
	unklar	12	4,0	4,0	94,6
	amplifiziert	12	4,0	4,0	98,7
	technisch nicht auswertbar	4	1,3	1,3	100,0
	Gesamt	299	100,0	100,0	

Tab. 11 Verteilungsmuster Her2 FISH

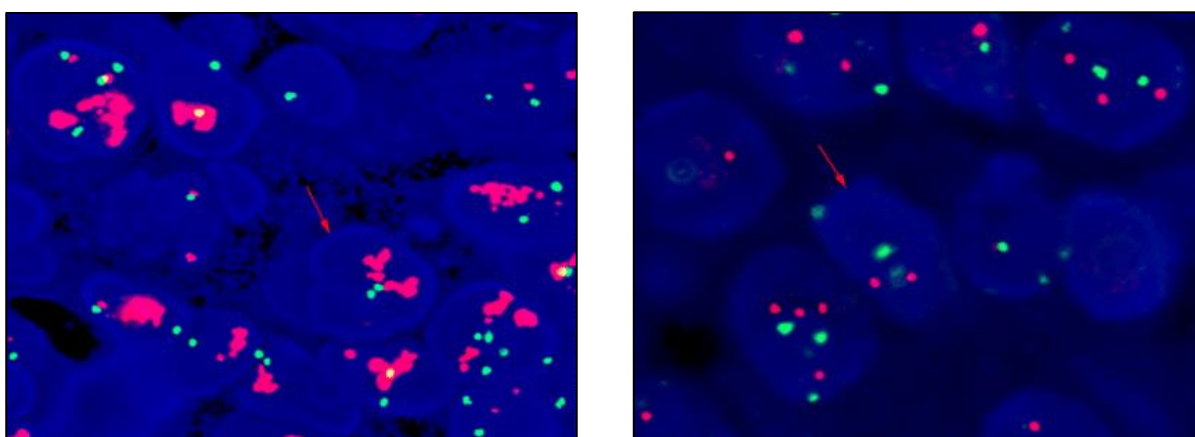


Abb. 18 HER2 FISH in polarisiertem Licht 400fach vergrößert, rot: Gen-Sonde, grün: Zentromersignal, links: HER2 Amplifikationsstatus positiv, rechts: HER2 Amplifikationsstatus negativ

3.1.9 Lef1

Der Lef1-Status konnte bei 297 Fällen (99,3%) des Gesamtkollektivs erhoben werden. 268 Fälle (89,6%) wurden als negativ und 29 Fälle (9,7%) als positiv klassifiziert. 2 Fälle (0,7%) wurden aufgrund mangelnder Verwertbarkeit ausgeschlossen.

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Lef1-Expression und dem histologischen Subtyp ($p = 0,017$). Betrachtete man den Anteil gefärbter Zellen und das Grading (Spearman's Rho = $-0,013$, $p = 0,828$, $n = 297$) bzw. das FIGO-Stadium (Spearman's Rho = $-0,060$, $p = 0,301$, $n = 297$) ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation.

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	negativ	268	89,6	89,6	89,6
	positiv	29	9,7	9,7	99,3
	technisch nicht auswertbar	2	,7	,7	100,0
	Gesamt	299	100,0	100,0	

Tab. 12 Verteilungsmuster Lef1

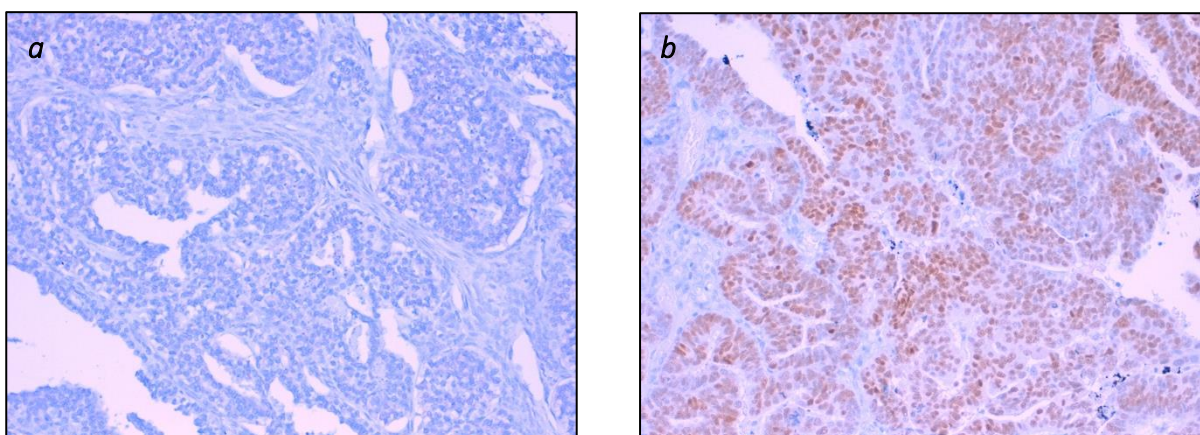


Abb. 19 Farbreaktion Lef1 20fach vergrößert; a: Lef1 negativ, b: Lef1 positiv

3.1.10 β -Catenin

298 Fälle (99,7%) konnten bezüglich der β -Catenin-Expression beurteilt werden. 1 Fall (0,3%) war technisch nicht verwertbar. Bei 2 Tumorproben (0,7%) zeigte sich keine Farbreaktion, diese wurden als negativ bezeichnet. Bei 278 Fällen (93,0%) trat eine Färbung der Membran und/oder des Zytoplasmas auf. Eine Kernfärbung war in 18 Fällen (6,0%) zu beobachten.

Zwischen der Lokalisation der Farbreaktion und dem histologischen Subtyp zeigte sich im exakten Test nach Fisher ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$). Eine kernpositive Färbung wurde gehäuft bei endometrioiden Karzinomen beobachtet.

Eine Co-Expression von Lef1 und β -Catenin lag in 10 Fällen (3,4% des Gesamtkollektivs) vor. Beide Fälle mit Negativität für Lef1 waren ebenfalls negativ für β -Catenin.

Die Co-Expression von Lef1 und β -Catenin wies einen signifikanten Zusammenhang mit dem histologischen Subtyp auf ($p < 0,001$). Von den 10 co-exprimierenden Fällen wurde 1 Fall (10%) als low-grade serös, 2 Fälle (20%) als high-grade serös, 1 Fall (10%) als seromuzinös und 6 Fälle (60%) als endometrioid klassifiziert.

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	negativ	2	,7	,7	,7
	Membran ± Zytoplasma positiv	278	93,0	93,0	93,6
	Kernpositiv	18	6,0	6,0	99,7
	technisch nicht auswertbar	1	,3	,3	100,0
	Gesamt	299	100,0	100,0	

Tab. 13 Verteilungsmuster β -Catenin

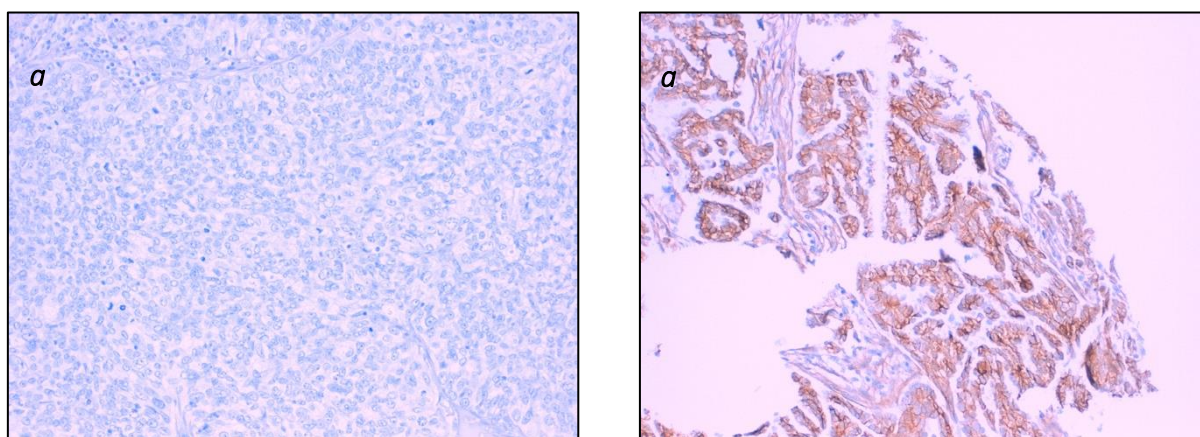


Abb. 20 Farbreaktion β -Catenin 20fach vergrößert; a: β -Catenin negativ, b: β -Catenin zytoplasmapositiv

		keine Co-Expression	Co-Expression	Gesamt
Histologie	serös G1	22	1	23
	serös G3	221	2	223
	endometroid	17	6	23
	muzinös	11	0	11
	klarzellig	4	0	4
	undifferenziert	8	0	8
	seromuzinös	3	1	4
Gesamt		286	10	296

Tab. 14 Kreuztabelle Lef1 und β -Catenin Co-Expression, histologische Subtypen

3.1.11 p53

Die Erhebung des p53-Status war bei 298 Fällen (99,7%) des Kollektivs möglich. 1 Fall (0,3%) konnte nicht beurteilt werden. 60 Fälle (20,1%) zeigten eine Wildtyp-Expression für p53 und wurden als negativ klassifiziert. In 238 Fällen (79,6%) lag ein aberrantes Expressionsmuster vor, diese Tumore wurden als positiv gewertet. Bei 166 (69,7%) dieser Fälle trat eine Überexpression, bei 72 (30,3%) ein Expressionsverlust auf.

Es zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang der p53-Mutation mit dem histologischen Subtyp ($p < 0,001$), dem FIGO-Stadium ($p < 0,001$) und dem Tumorgrading ($p < 0,001$).

203 Fälle (85,3%, der mutierten Fälle) wurden als Typ-II-Ovarialkarzinom klassifiziert.

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Überexpression	166	55,5	55,5	55,5
	Expressionsverlust	72	24,1	24,1	79,6
	Wildtyp-Expression	60	20,1	20,1	99,7
	technisch nicht auswertbar	1	,3	,3	100,0
	Gesamt	299	100,0	100,0	

Tab. 15 Verteilungsmuster p53

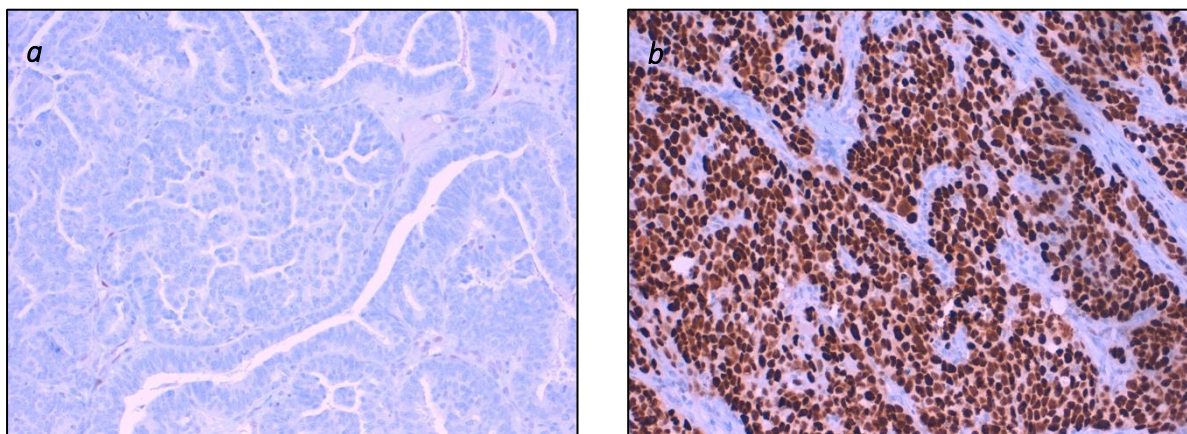


Abb. 21 Farbreaktion p53 20fach vergrößert; a: vollständiges Fehlen der Farbreaktion für p53, b: Überexpression von p53

3.1.12 p16

167 Proben (55,9%) wurden als negativ, 128 (42,8%) als positiv gewertet. Bei 4 Fällen (1,3%) eignete sich das gefärbte Material, aufgrund ungenügender Tumorzellzahl, nicht zur Beurteilung der p16-Expression.

Zwischen den histomorphologischen Typen und dem p16-Expressionsstatus zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,015$). Bei der Einteilung der Subklassen in Typ-I- und Typ-II-Ovarialkarzinome war dieser Zusammenhang von noch höherer Signifikanz ($p < 0,001$).

Eine Abhängigkeit zeigte sich auch im Hinblick auf das Grading ($p = 0,002$). Das FIGO-Stadium hingegen wies keinen Zusammenhang mit der p16-Expression auf ($p = 0,154$).

		Häufigkeit	Prozente	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	negativ	167	55,9	55,9	55,9
	positiv	128	42,8	42,8	98,7
	technisch nicht auswertbar	4	1,3	1,3	100,0
	Gesamt	299	100,0	100,0	

Tab. 16 Verteilungsmuster p16

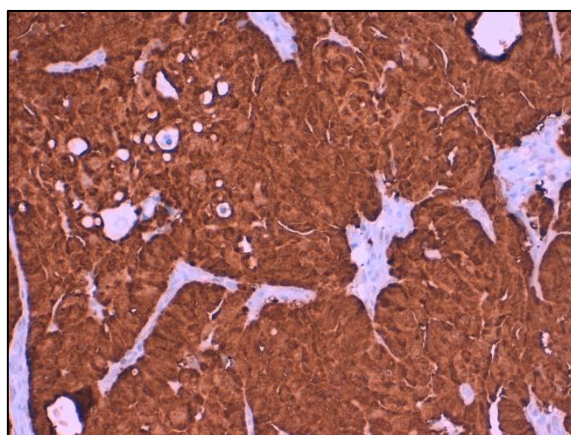


Abb. 22 Farbreaktion p16 20fach vergrößert; typisches block-staining bei p16-Positivität

3.2 Überlebensanalyse

Die Überlebensanalyse wurde jeweils für das Gesamtkollektiv und die jeweiligen Subgruppen durchgeführt. Die p-Werte beziehen sich, sofern nicht anders deklariert, auf die zugehörige Grafik und das Gesamtkollektiv. Die Berechnungen für die Gruppe der serösen, high-grade

serösen, low-grade serösen, Typ-I- und Typ-II-Ovarialkarzinome werden jeweils nur bei statistisch signifikanten Ergebnissen explizit erwähnt.

3.2.1 Alter bei Diagnose

Das Alter bei Diagnose war ein statistisch signifikanter Faktor im Hinblick auf das Überleben. Höheres Alter stellte einen negativen prognostischen Marker dar ($p = 0,002$). Zur Übersicht erfolgte die Auswertung in 3 Gruppen, 0-50 Jahre, 51-70 Jahre und >70 Jahre.

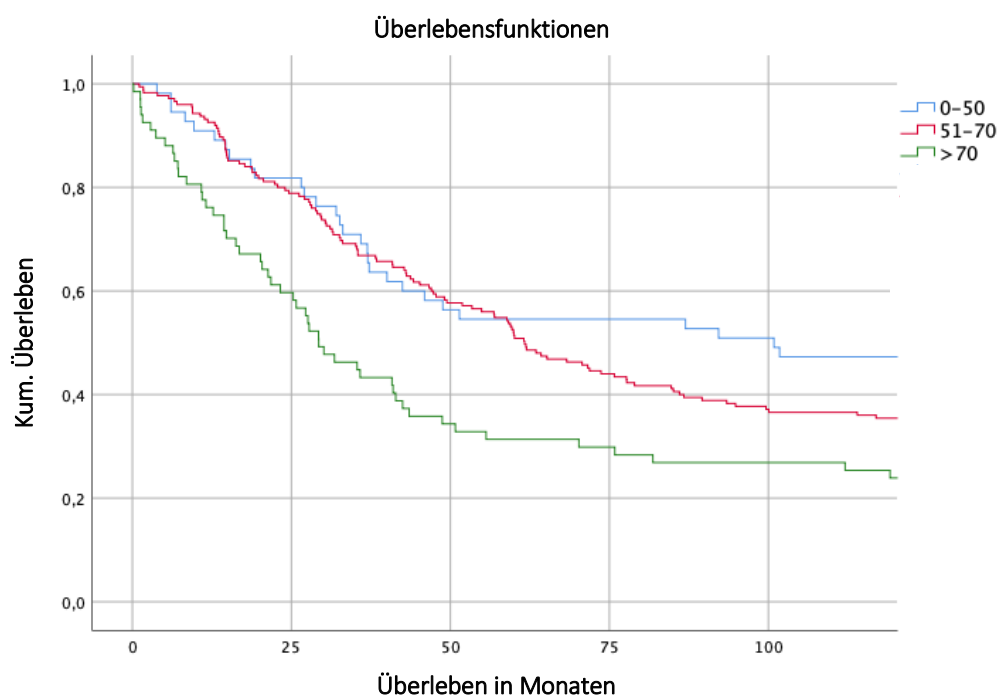


Abb. 23 Kaplan-Meier-Kurve Alter bei Diagnose, Alter in Jahren

3.2.2 FIGO-Stadium

Die FIGO-Klassifikation wurde zu Zwecken der Übersichtlichkeit vereinfacht. Alle Unterkategorien der Primärziffern wurden zusammengefasst. Unter diesen Voraussetzungen war das FIGO-Stadium in der Überlebensanalyse der Gesamtkohorte ein signifikanter Prädiktor ($p < 0,001$). Wie erwartet, präsentierte sich für Patientinnen der Stadien III und IV ein deutlich schlechteres Outcome. Diese Analyse lieferte in der Subgruppe der Typ-I-Karzinome ebenfalls ein signifikant schlechteres Outcome in höherem Tumorstadium ($p < 0,001$). In der Auswertung der Typ-II-Karzinome zeigte sich das FIGO-Stadium nicht als signifikantes prognostisches Kriterium ($p = 0,198$)

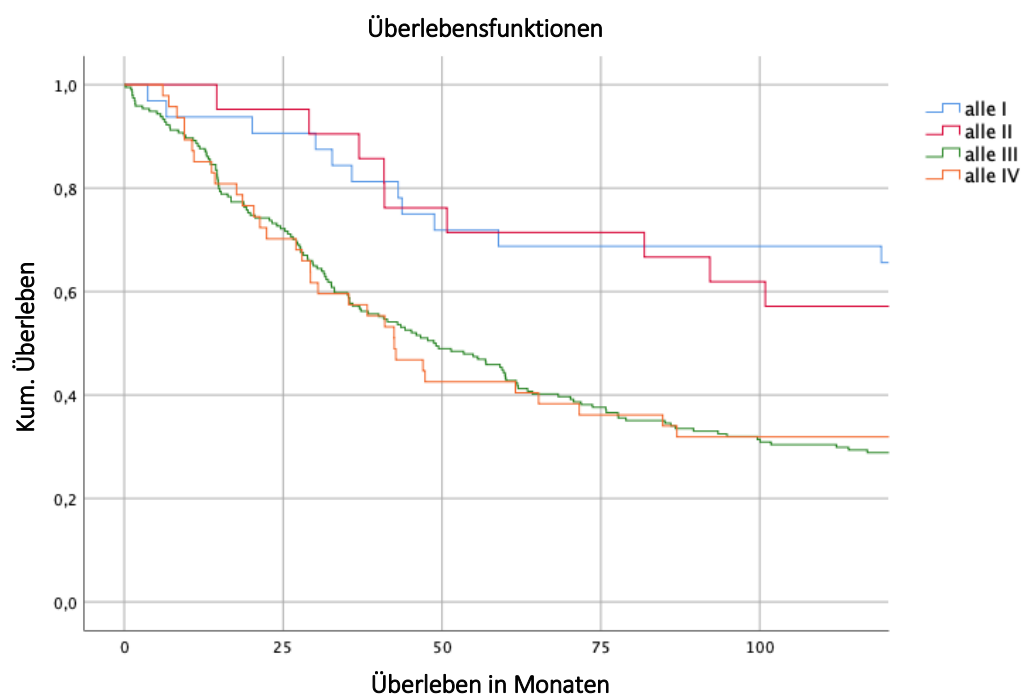


Abb. 24 Kaplan-Meier-Kurve FIGO-Stadium, FIGO-Stadium zusammengefasst, Gesamtkohorte

3.2.3 Grading

Ebenso zeigte sich für den Differenzierungsgrad (Grading) G3 ein signifikant schlechteres Überleben über den gesamten Beobachtungszeitraum ($p = 0,037$). Auffällig ist, dass das Grading G1 langfristig ein schlechteres Outcome aufwies, als die G2 klassifizierten Fälle. Fasste man die Gruppen G1 und G2 zusammen zeigte sich ein Unterschied zu G3-Karzinomen von höherer Signifikanz ($p = 0,012$). Bei Auswertung des serösen Subtyps zeigte sich im Hinblick auf das Überleben kein signifikanter Unterschied zwischen high-grade (G3) und low-grade serösen (G1) Ovarialkarzinomen ($p = 0,838$). Untersuchte man jedoch die Gruppe der nicht serösen Subtypen, zeigte sich ein signifikantes positives, intermediäres und schlechtes Outcome für die Differenzierungsgrade G1, G2 und G3 ($p = 0,015$).

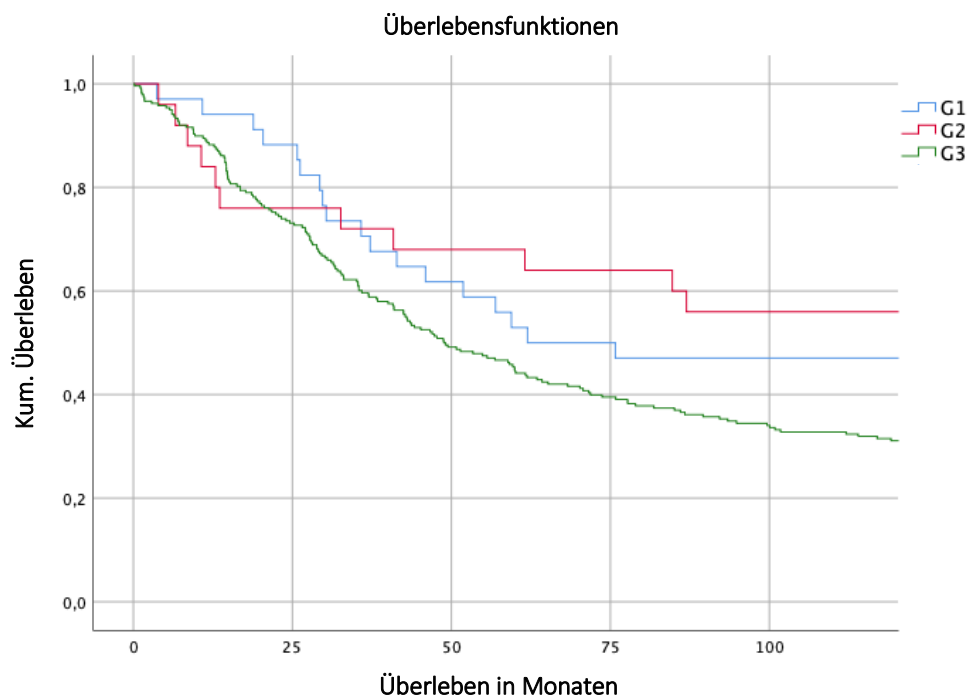


Abb. 25 Kaplan-Meier-Kurve Grading Gesamtkollektiv

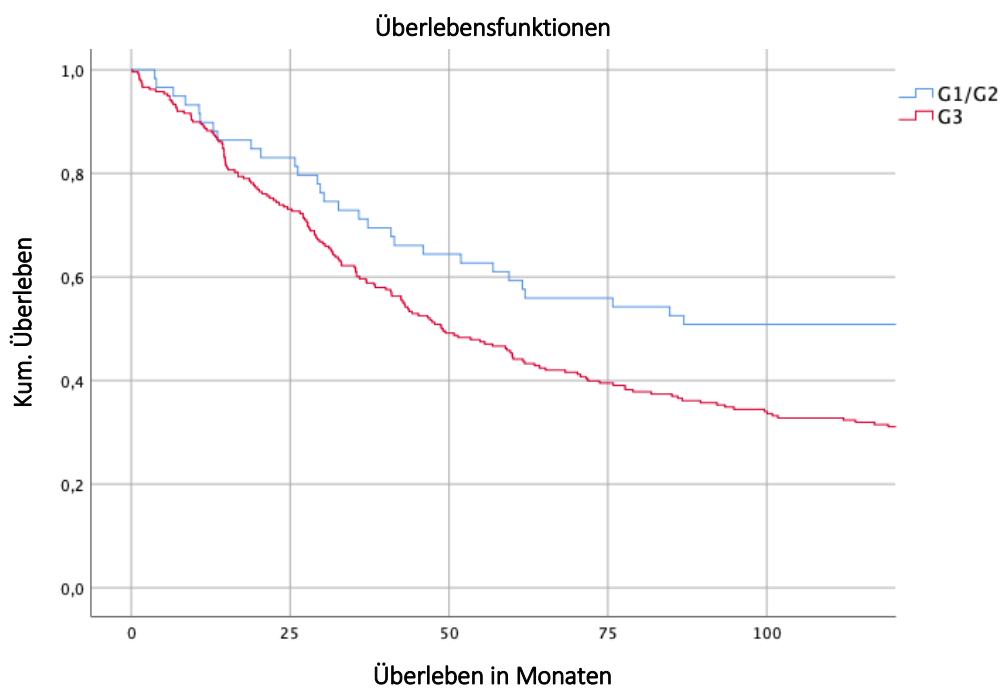


Abb. 26 Kaplan-Meier-Kurve Grading zusammengefasst, G1/2 vs. G3

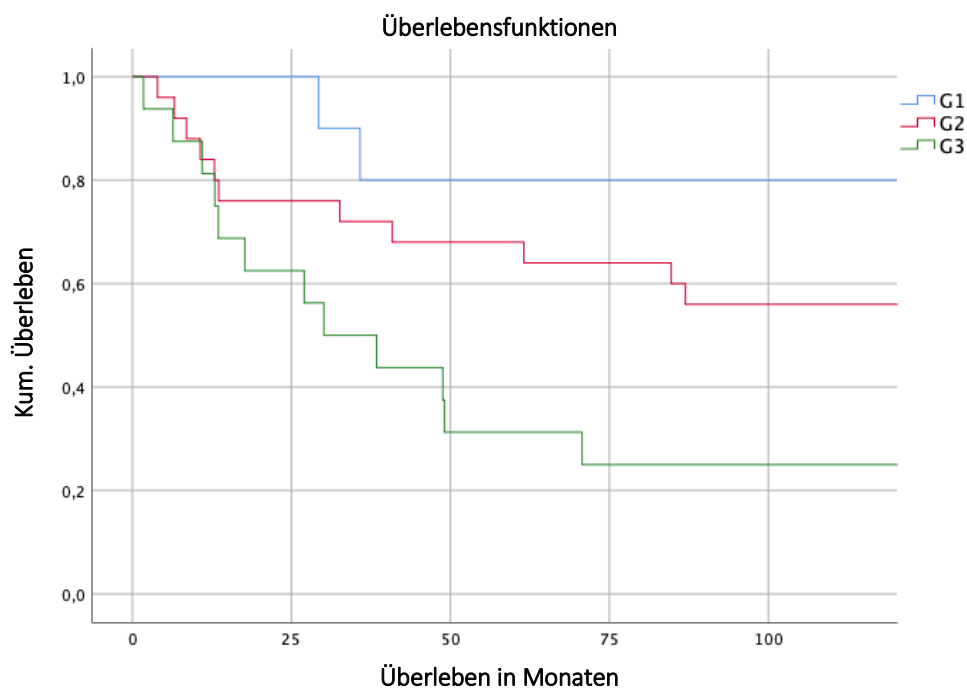


Abb. 27 Kaplan-Meier-Kurve Grading nicht seröse Karzinome

3.2.4 Histologischer Subtyp

Die Subgruppenanalyse lieferte im Hinblick auf das Überleben kein statistisch signifikantes Ergebnis ($p = 0,422$). Teilte man die Karzinome nach Typ-I- und Typ-II-Ovarialkarzinomen ein, so zeigte sich die Tendenz des schlechteren Überlebens für Typ-II-Karzinome, wobei im Log-Rank-Test das statistische Signifikanzniveau nicht erreicht wurde ($p = 0,067$).

Im direkten Einzelvergleich des Überlebens zwischen den jeweiligen Subtypen wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen. Jedoch zeichnete sich, verglichen mit der Subgruppe der high-grade serösen Karzinome, eine positivere Prognose für endometrioide Karzinome ab ($p = 0,051$). Dieser Trend erreichte jedoch nicht das Niveau statistischer Signifikanz und ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Fallzahlen zurückzuführen (223 high-grade seröse Karzinome vs. 23 endometrioide Karzinome).

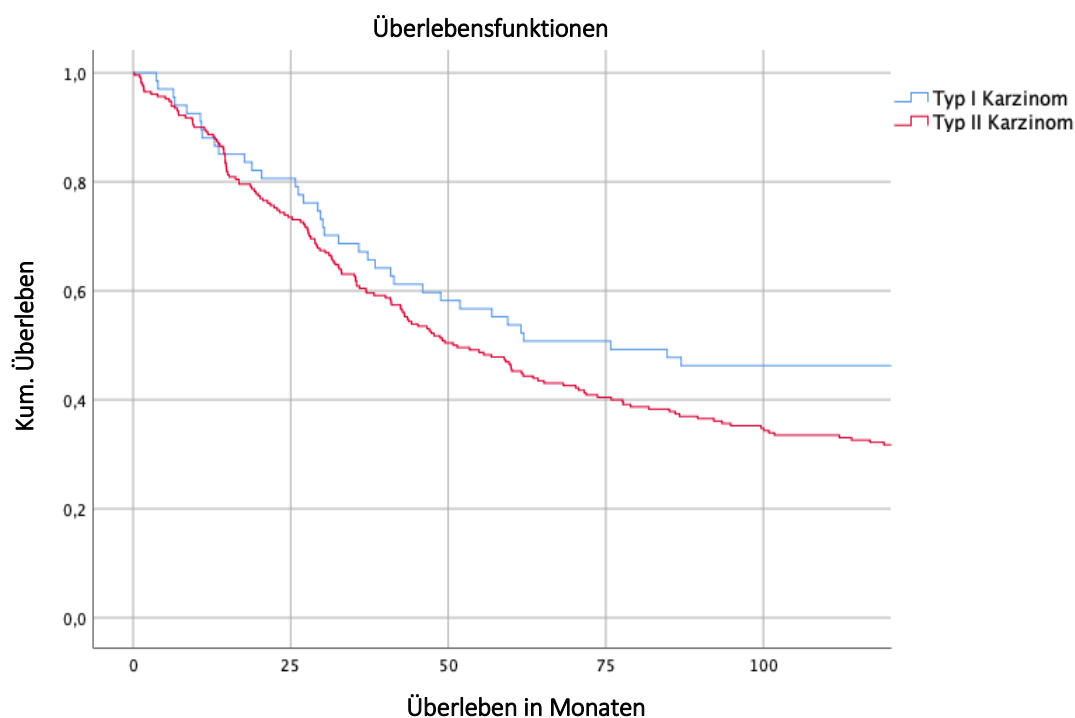


Abb. 28 Kaplan-Meier-Kurve Typ-I- / Typ-II-Karzinome

3.2.5 Östrogenrezeptor

Beim Gesamtkollektiv bestand eine Tendenz des schlechteren Überlebens bei ER-negativen Karzinomen, statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht ($p = 0,091$). Beschränkte man die Analyse auf Typ-II-Karzinome so bestand ein signifikant schlechteres Überleben für ER-negative Fälle ($p = 0,038$).

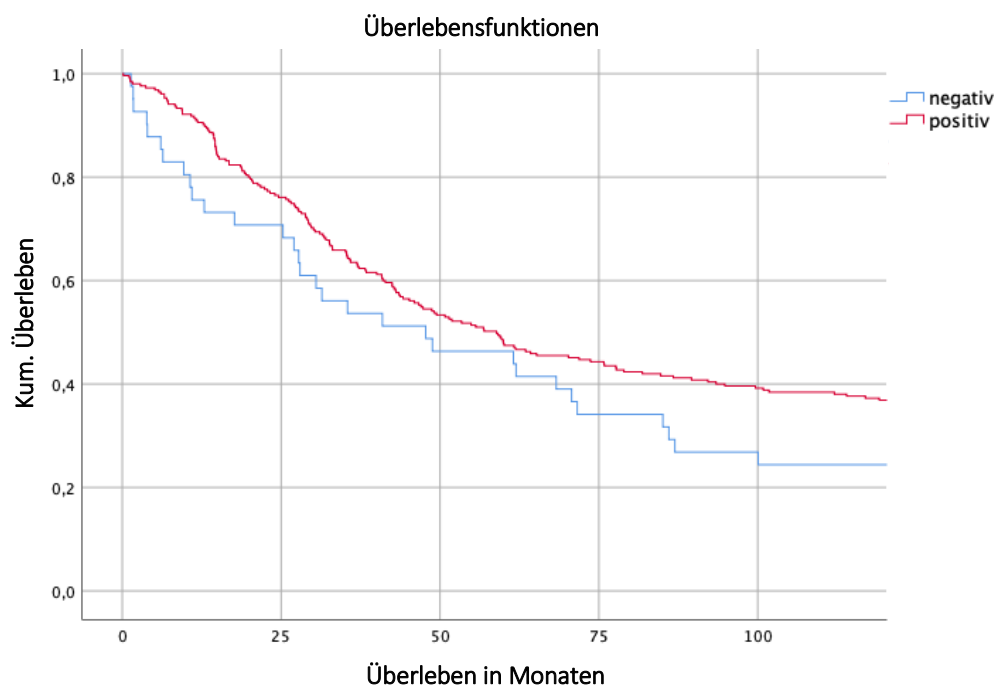


Abb. 29 Kaplan-Meier-Kurve ER α , Gesamtkollektiv

3.2.6 Progesteronrezeptor

Am Gesamtkollektiv ergab sich kein signifikanter Unterschied des Überlebens im Hinblick auf das Expressionsmuster des Progesteronrezeptors ($p = 0,592$).

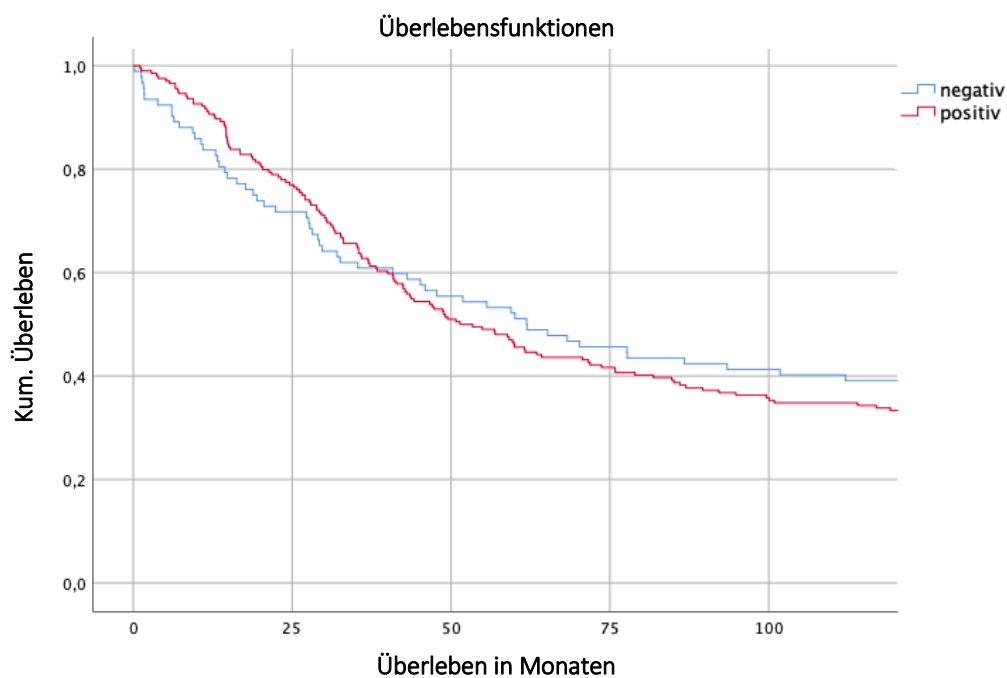


Abb. 30 Kaplan-Meier-Kurve PR

3.2.7 WT1

Am Gesamtkollektiv zeigte sich über den Beobachtungszeitraum kein signifikanter Unterschied des Überlebens zwischen WT1-positiven und WT1-negativen Karzinomen ($p = 0,196$). Langfristig betrachtet schien sich jedoch eine bessere Prognose bei WT1-negativen Fällen abzuzeichnen. Dieser Trend war in allen Teilanalysen vorhanden, statistische Signifikanz wurde jedoch nicht nachgewiesen.

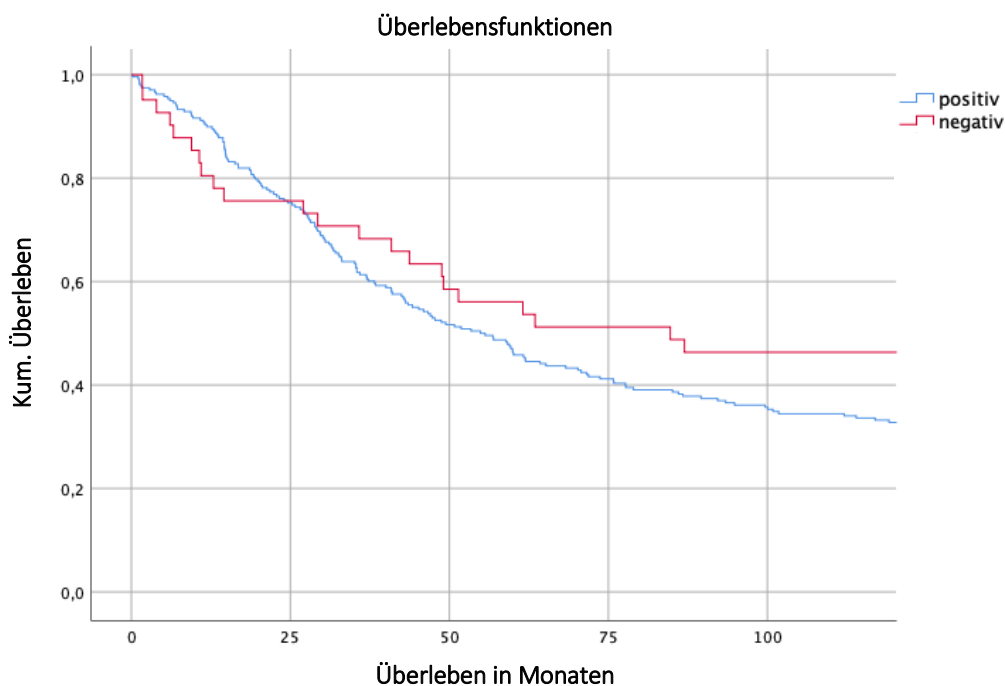


Abb. 31 Kaplan-Meier-Kurve WT1

3.2.8 ARID1A

Für die beiden Gruppen der Einteilung für ARID1A konnte kein signifikanter Überlebensunterschied nachgewiesen werden ($p = 0,380$).

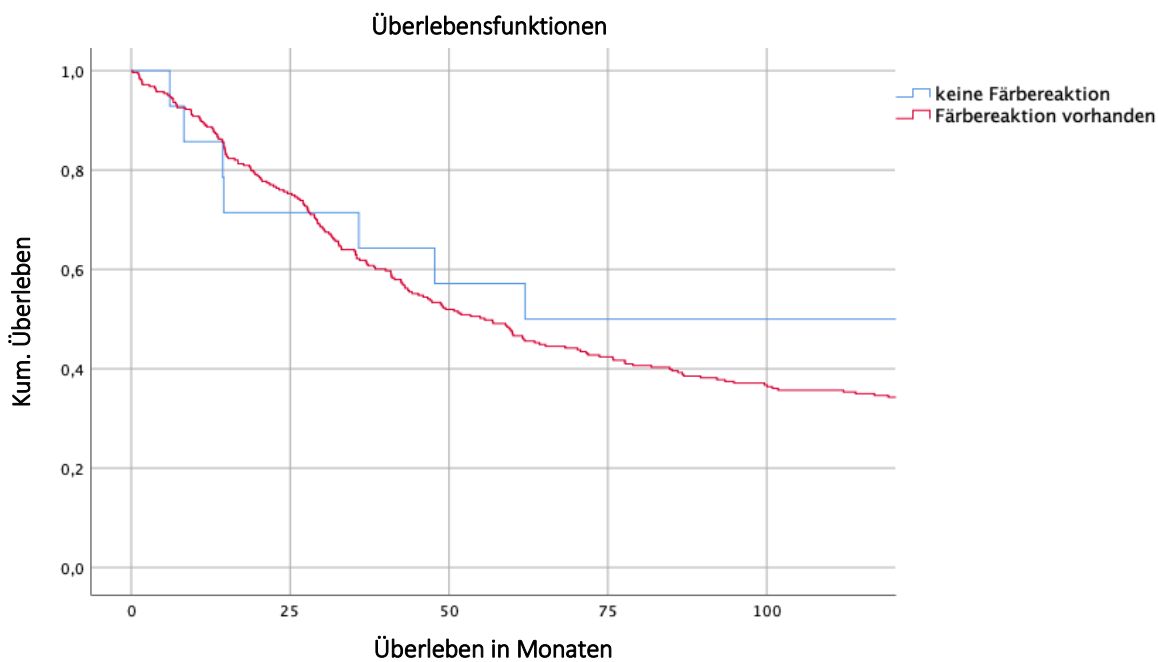


Abb. 32 Kaplan-Meier-Kurve ARID1A

3.2.9 BRCA1

Der BRCA1-Status zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Outcome des Gesamtkollektivs ($p = 0,731$) oder einer der einzelnen Teilgruppen.

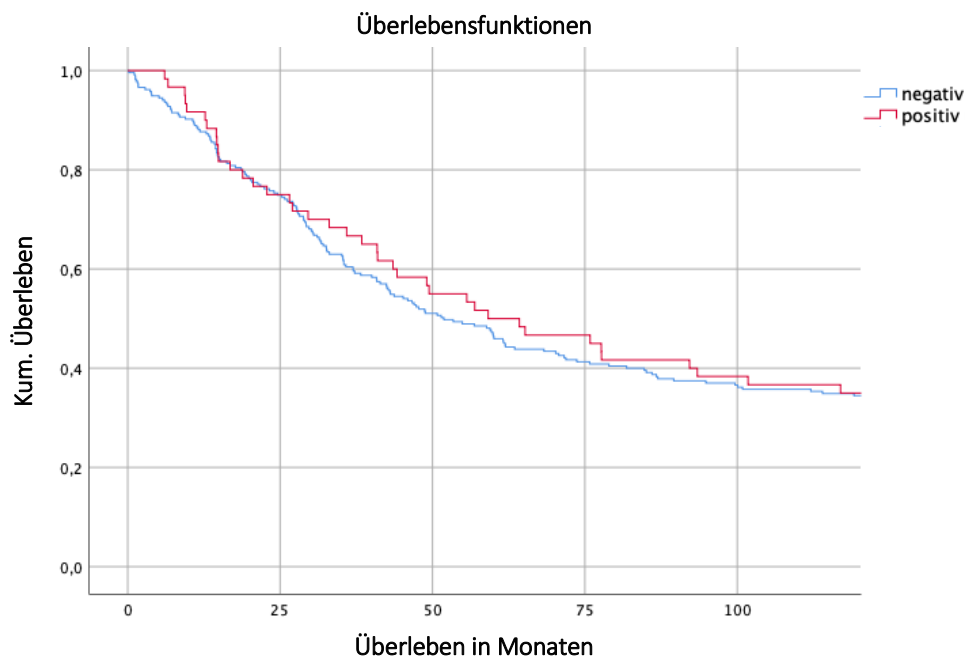


Abb. 33 Kaplan-Meier-Kurve BRCA1

3.2.10 BRCA2

Werden alle Fälle berücksichtigt, so bestand ein Trend für ein besseres Überleben für BRCA2-positive Fälle über den Beobachtungszeitraum. Die statistische Signifikanz wurde im Log-Rank-Test nicht erreicht ($p = 0,060$). Diese Tendenz zeigte sich in allen Teilgruppen, jedoch ohne signifikantes Ergebnis.

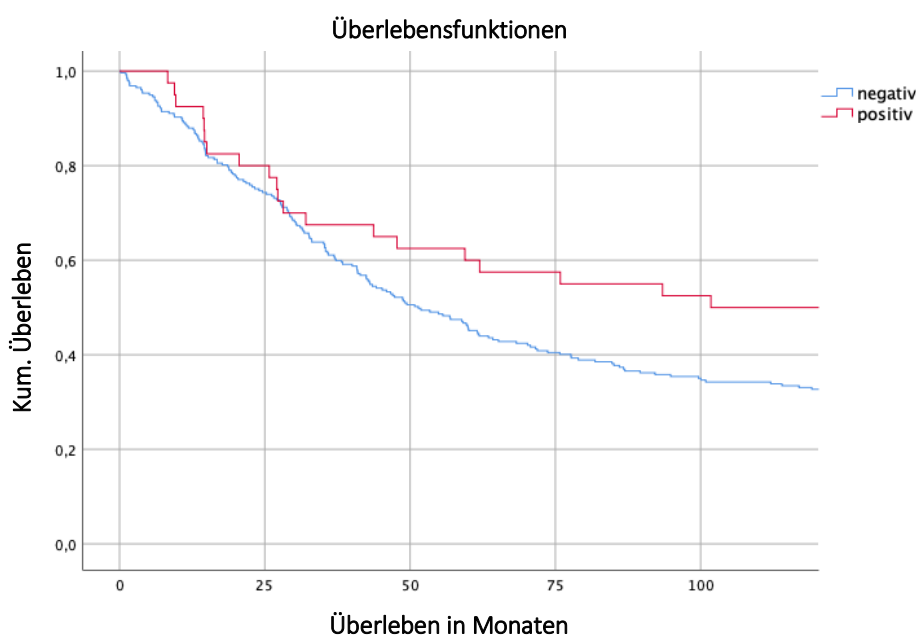


Abb. 34 Kaplan-Meier-Kurve BRCA2

3.2.11 EP3

Der EP3-Status stellte keinen signifikanten Prognosefaktor im Hinblick auf das Überleben des Gesamtkollektivs dar ($p = 0,140$).

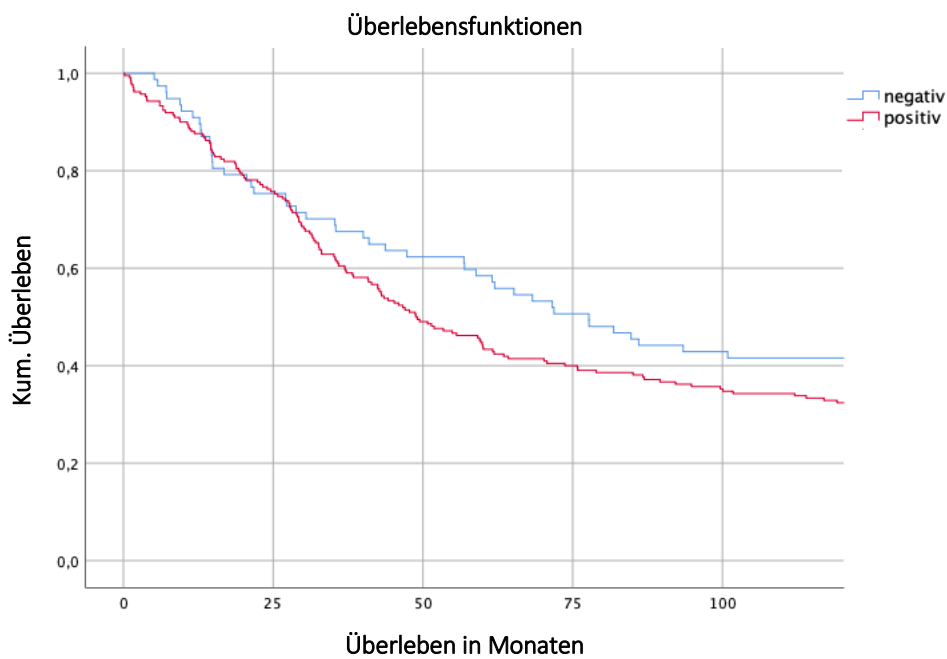


Abb. 35 Kaplan-Meier-Kurve EP3

3.2.12 Her2

Die in der FISH Her2 amplifizierten Fälle unterschieden sich im Überleben nicht signifikant von den als unklar und nicht amplifiziert klassifizierten Fällen ($p = 0,762$).

Ebenso war auch die alleinige Auswertung der Her2 IHC kein prognostischer Marker im Hinblick auf das Überleben ($p = 0,235$).

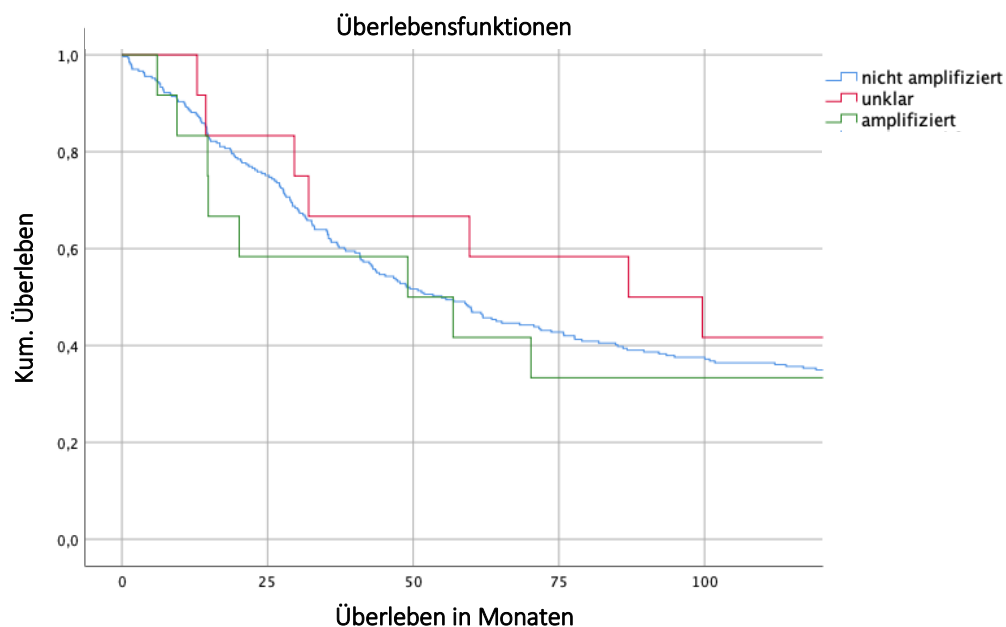


Abb. 36 Kaplan-Meier-Kurve Her2 FISH

3.2.13 Lef1

Für den Lef1-Status konnte kein Unterschied in der Prognose über den ausgewerteten Zeitraum beobachtet werden ($p = 0,953$).

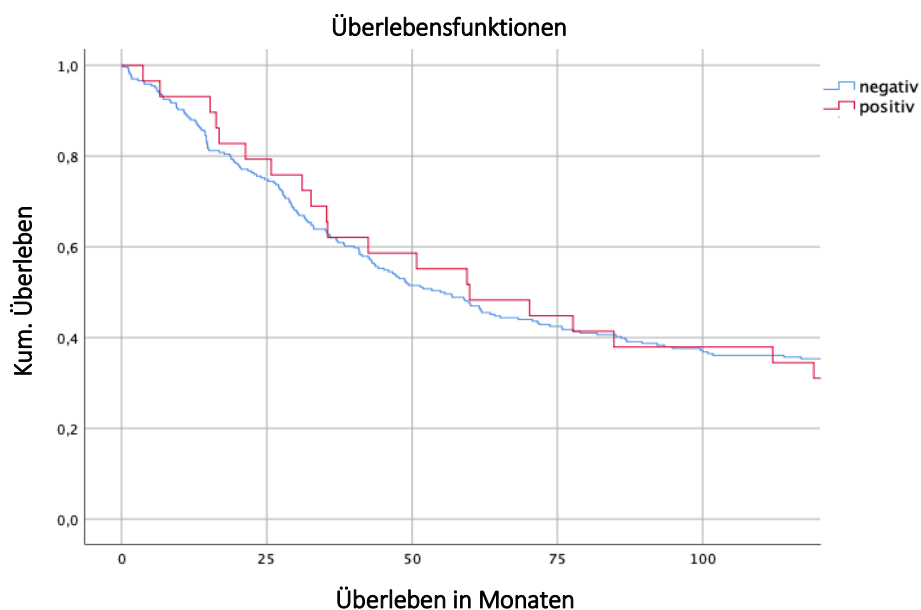


Abb. 37 Kaplan-Meier-Kurve Lef1

3.2.14 β -Catenin

Die Einteilung der Tumoren nach Lokalisation der β -Catenin Farbreaktion zeigte über den Zeitraum der Auswertung keine Unterschiede im Hinblick auf das Überleben des Gesamtkollektivs ($p = 0,692$) oder einer Teilgruppe.

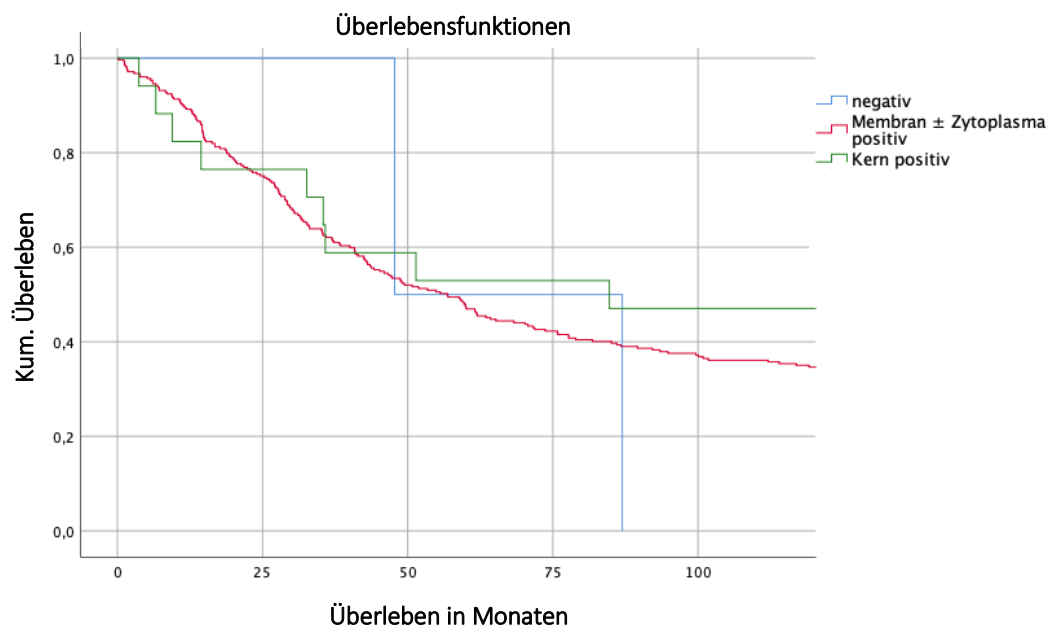


Abb. 38 Kaplan-Meier-Kurve β -Catenin Verteilung

3.2.15 p53

Am vorliegenden Kollektiv konnte kein Einfluss des p53-Expressionsmusters auf das Überleben gezeigt werden ($p = 0,320$).

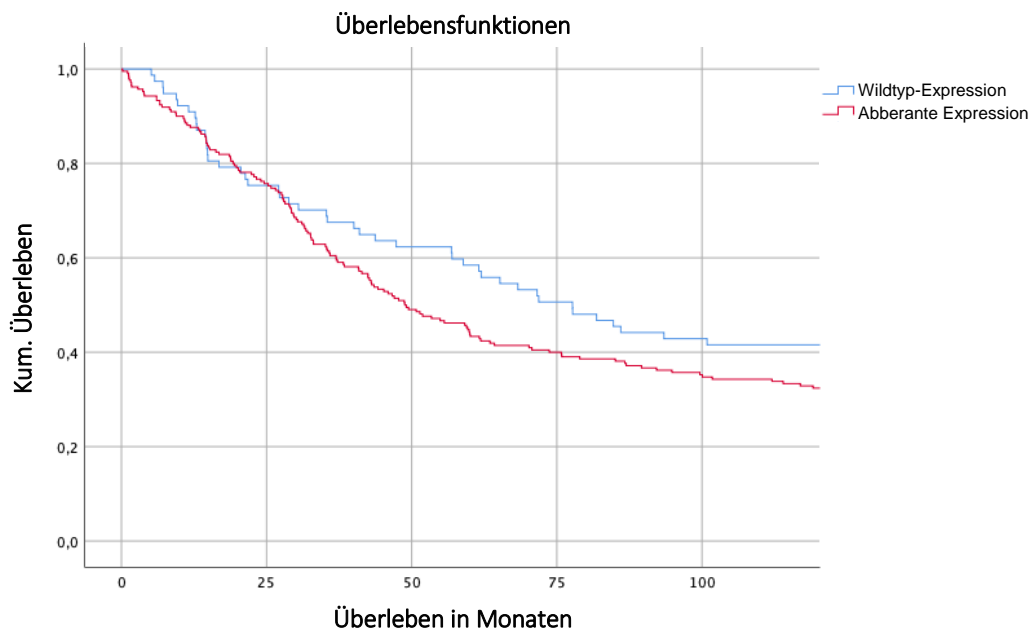


Abb. 39 Kaplan-Meier-Kurve p53

3.2.16 p16

Betrachtete man alle eingeschlossenen Fälle, stellte die p16-Mutation keinen statistisch signifikanten Prognosefaktor dar ($p = 0,226$). Ein deutlicher Trend zur schlechteren Prognose bei p16-Mutation zeigte sich im Kollektiv der Typ-I-Karzinome, welcher jedoch das Level statistischer Signifikanz nicht erreichte ($p = 0,067$).

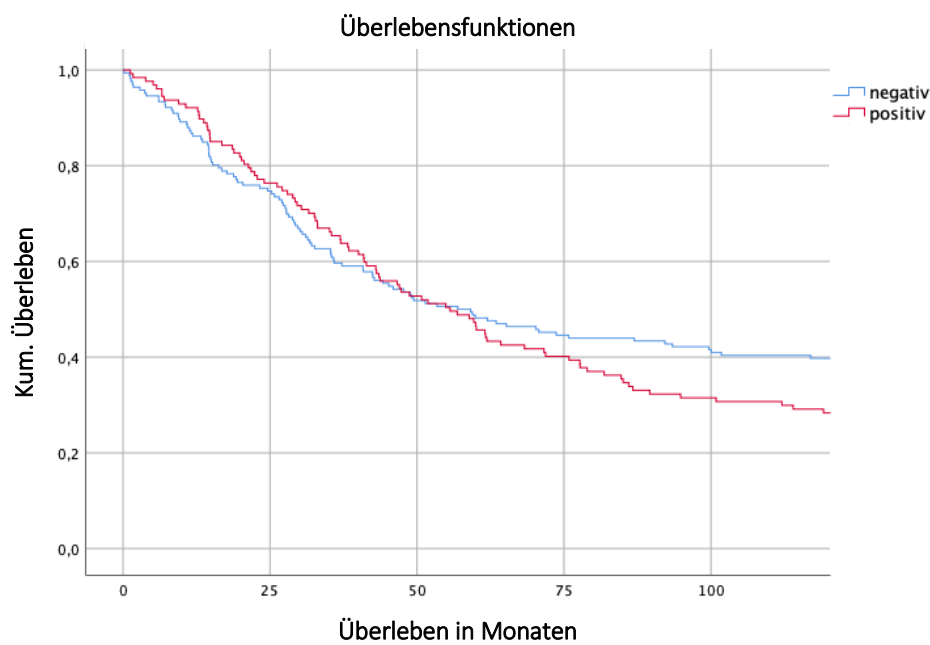


Abb. 40 Kaplan-Meier-Kurve p16

3.3 Kombinierte Überlebensanalyse

Im Folgenden wurden verschiedene Rezeptorkonstellationen im Hinblick auf die Prognose untersucht. Aufgrund der Datenmenge werden ausschließlich Ergebnisse von statistischer und akademischer Signifikanz aufgeführt.

3.3.1 Östrogen- und Progesteronrezeptor

Die Einteilung zur kombinierten Überlebensanalyse im Hinblick auf den Östrogen- und den Progesteronrezeptorstatus erfolgte im Log-rank-Test in zwei Kategorien. ER/PR negativ (ER-/PR-) wurde der Vergleichsgruppe (ER+/PR-, ER-/PR+ und ER+/PR+) gegenübergestellt. In der Gruppe der Typ-II-Ovarialkarzinome zeigte sich bei ER/PR negativem Rezeptorstatus ein signifikant schlechteres Überleben ($p = 0,028$).

Auch in der Cox-Regression zeigte sich der Einfluss des ER/PR negativen Status auf das Überleben in der Subgruppe der Typ-II-Karzinome. Im Vergleich mit der Referenzgruppe

(ER+/PR+, ER/PR positiv) war für ER/PR negative Karzinome ein etwa 2-fach erhöhtes Mortalitätsrisiko zu beobachten. Das statistische Signifikanzniveau wurde erreicht ($p = 0,046$).

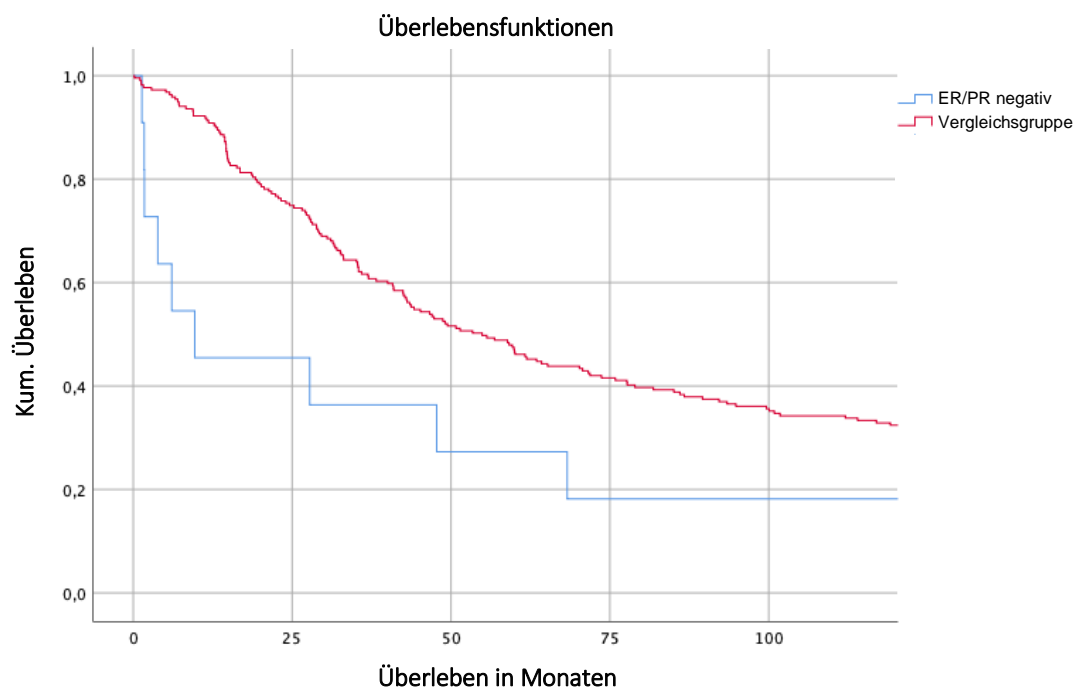


Abb. 41 Kaplan-Meier-Kurve ER/PR, Typ-II-Karzinome

3.3.2 Her2, Östrogen- und Progesteronrezeptor

Eine Erweiterung des Punktes 3.3.1 stellte die Einbeziehung des Her2-Status dar. Im Falle der Konfiguration Her2-/ER-/PR-, wurden die Karzinome als „triplenegativ“ klassifiziert. Die übrigen Fälle wurden als „nicht triplenegativ“ zusammengefasst. Beim Vergleich dieser beiden Gruppen zeigte sich am gesamten Kollektiv keine prognostische Relevanz ($p = 0,105$). Betrachtete man alleinig die Untergruppe der high-grade serösen Tumoren, zeigte sich ein signifikant schlechteres Überleben in der triplenegativen Kohorte ($p = 0,031$). In der Subgruppe der Typ-II-Karzinome war diese Signifikanz noch höher ($p = 0,007$).

In der Cox-Regression zeigte sich in der Gruppe der high-grade serösen Karzinome die schlechteste Prognose für die Konstellation ER-/PR-/Her2-. Setzte man die triplenegative Kohorte als Referenzgruppe ein, zeigte sich für die Gruppe Hormonrezeptor+/Her2- ein 0,4-faches Risiko, den Endpunkt (Tod) zu erreichen ($p = 0,034$). Die beiden weiteren Konstellationen wiesen keine signifikanten p-Werte auf.

Betrachtete man die gesamte Klasse der Typ-II-Karzinome bestätigte sich der triplenegative Status als negativer prognostischer Faktor ebenfalls. Auch hier wurde der triplenegative Status als Referenz verwendet. Hiermit verglichen zeigen alle anderen Konstellationen ein geringeres

Risiko für den Tod. Statistische Signifikanz wurde für Status Hormonrezeptor+/Her2- erreicht ($p = 0,009$), welcher ein 0,4-faches Risiko für den Tod aufwies.

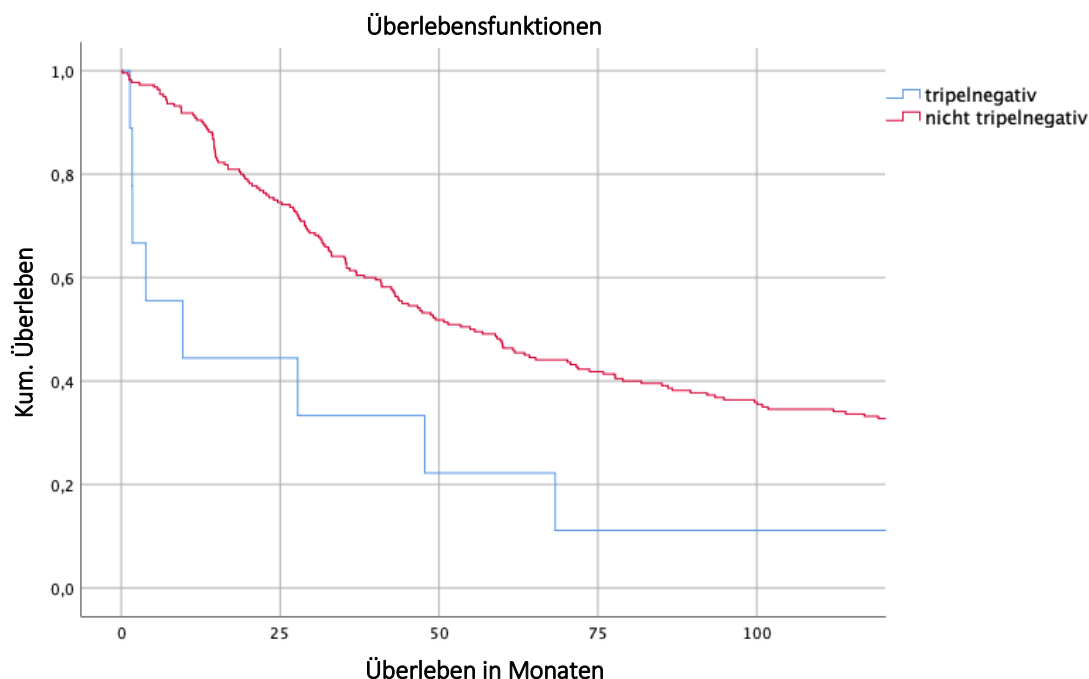


Abb. 42 Kaplan-Meier-Kurve ER/PR/Her2, Typ-II-Karzinome

3.3.3 p53 und EP3 Co-Expression

In einer weiteren Analyse erfolgte die Gruppierung anhand der Expression von p53 und EP3. Es wurde in „Co-Expression für p53/EP3“ (p53+/EP3+) und in „keine Co-Expression für p53/EP3“ (p53+/EP3-, p53-/EP3+, p53-/EP3-) klassifiziert. Im Vergleich des Überlebens beider Subgruppen zeigte sich langfristig eine ungünstigere Prognose für die Fälle mit Co-Expression für p53/EP3, sodass das kumulierte Überleben dieser Gruppe um ca. 10% unter dem der Vergleichsgruppe lag. Im Log-Rank-Test ergab sich hierfür jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,129$).

Dieser Trend wurde ebenfalls in der Cox-Regression beobachtet. Setzte man die Gruppe mit Status p53+/EP3+ als Referenzgruppe ein, zeigten die übrigen Konstellationen ein geringeres Risiko für den Tod. Statistische Signifikanz wurde aber auch in diesem Modell nicht erreicht.

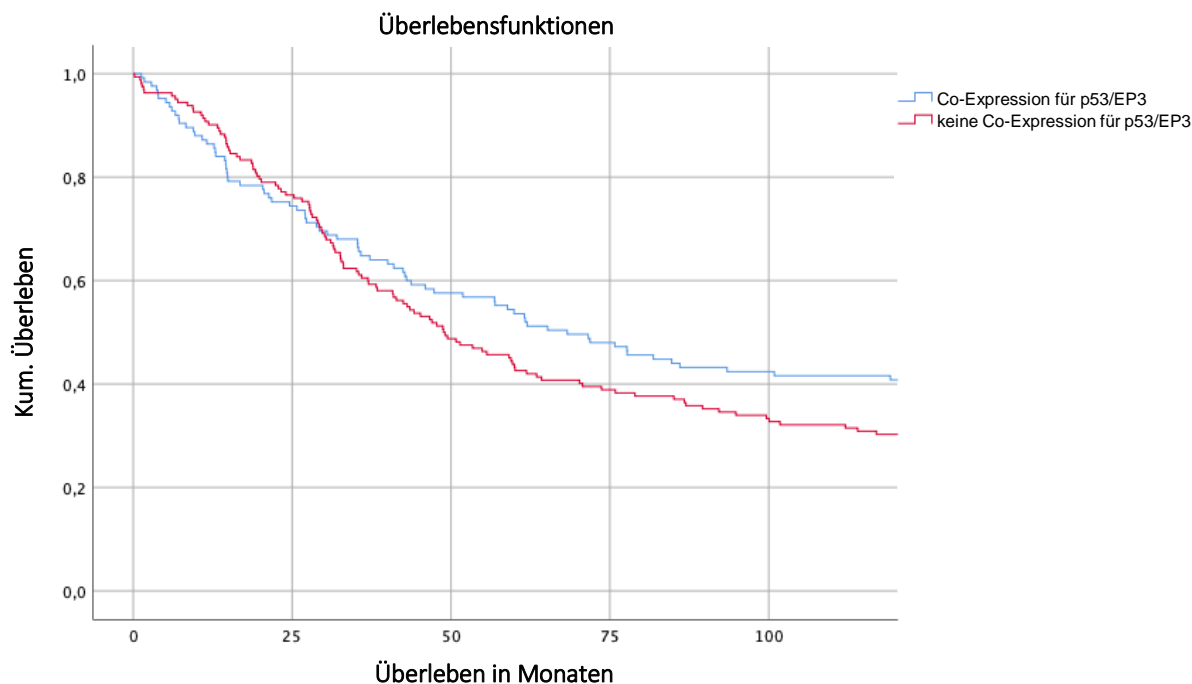


Abb. 43 Kaplan Meier Kurve p53 / EP3 Co-Expression

3.3.4 p53 und p16 Co-Alteration

Zur Analyse der Auswirkung einer Co-Alteration von p53 und p16 wurde das Kollektiv in eine „doppelt positive“ (p53+/p16+) und eine „nicht doppelt positive“ (Konstellationen p53+/p16-, p53-/p16+, p53-/p16-) Gruppe aufgeteilt. Auf das Gesamtkollektiv bezogen zeigte sich bezüglich des Überlebens während des Beobachtungszeitraumes kein signifikanter Unterschied ($p = 0,191$). Wurde die Untersuchung jedoch auf Typ-I-Ovarialkarzinome beschränkt, so konnte ein signifikant schlechteres Überleben für die Kohorte mit Co-Alteration nachgewiesen werden ($p = 0,029$).

Bezogen auf Typ-I-Karzinome zeigte sich auch im Cox-Modell ein erhöhtes Risiko für den Tod bei Co-Alteration. Für die anderen Kategorien zeigte sich ca. ein 0,5-faches Risiko für den Endpunkt Tod. Die p-Werte erreichten nicht das statistische Signifikanzniveau.

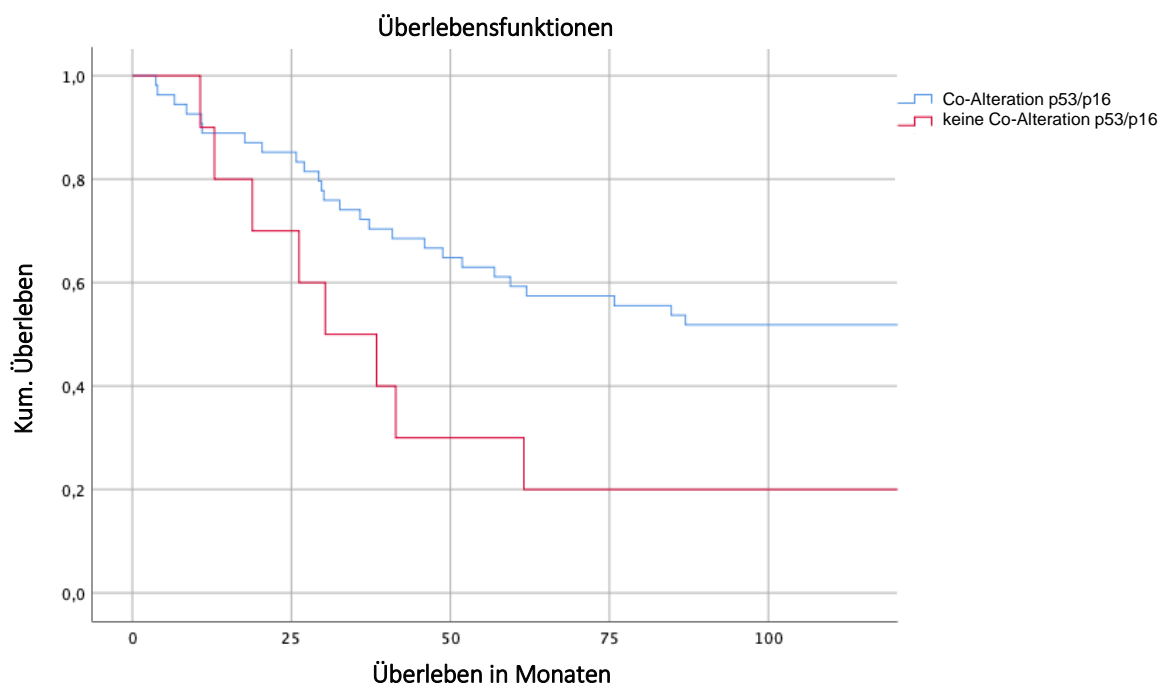


Abb. 44 Kaplan Meier Kurve p53 / p16 Co-Alteration, Typ-I-Karzinome

4 Diskussion

4.1 Allgemein

Wie in der Einleitung dargestellt, ist aktuell die Therapie des Ovarialkarzinoms überwiegend abhängig vom Tumorstadium und der Tatsache, ob es sich um eine Erstdiagnose oder ein Rezidiv handelt. Eine chirurgische Intervention geht in den meisten Fällen einer systemischen Chemotherapie voraus. Die weiteren Therapieschritte richten sich im Verlauf grundlegend nach dem klinischen Ansprechen auf die jeweiligen Therapeutika. Der bisher einzige in den Leitlinien verankerte molekulare Biomarker, welcher maßgeblichen Einfluss auf die Therapie im Sinne einer Individualisierung hat, ist der BRCA1- und BRCA2-Status beim platinsensitiven Rezidiv eines high-grade serösen Ovarialkarzinoms.

Durch den Einsatz von PARP-Inhibitoren im beschriebenen Sonderfall konnte gezeigt werden, dass sich die Prognose bei dieser Subgruppe signifikant verbesserte (Ledermann J et al. 2014). Zwischenzeitlich wurde auch die Verbesserung der Prognose bei platinsensitiven Rezidiven high-grade seröser Karzinome unabhängig vom BRCA-Mutationsstatus nachgewiesen. Die nächste Generation der PARP-Inhibitoren wurde für diesen Einsatz bereits in den USA und in Europa zugelassen (Sisay M und Edessa D 2017). Im Rahmen von Studien zeigte sich bei Ovarialkarzinomen mit einer Defizienz der Doppelstrangreparaturmechanismen (HRD, s. unten) ein verbessertes Outcome unabhängig von histologischem Subtyp und BRCA-Mutationsstatus in der First-Line-Therapie (Mirza MR et al. 2020). Diese Erkenntnisse wurden jedoch noch nicht in die deutschen Leitlinien implementiert.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation erfolgten an einem unselektierten Kollektiv zur Identifizierung von Unterschieden in den jeweiligen Subgruppen. Die zugrundeliegenden epithelialen Ovarialkarzinome wurden jeweils am Pathologischen Institut der LMU München neu diagnostiziert. Insgesamt wurden 12 Biomarker immunhistochemisch ausgewertet, wobei die Her2 Bestimmung nach Empfehlung durch eine kombinierte Auswertung von IHC und FISH erfolgte. Der Großteil der Biomarker findet bei anderen Tumorentitäten bereits klinische Anwendung, ein klarer Zusammenhang zu ovariellen Neoplasien wurde doch in den meisten Fällen noch nicht nachgewiesen. Subgruppen, die sich durch ein Merkmal oder eine Merkmalkombination vom Rest der Kohorte unterscheiden, könnten zur Entwicklung individueller Therapieregime - ganz im Sinne „care for the rare“ - von Bedeutung sein.

4.2 Patientinnenkollektiv

Gemäß den offiziellen Daten des Robert Koch Institutes (RKI) wurde für das Ovarialkarzinom im Tumorbericht von 2017 ein mittleres Erkrankungsalter von 70 Jahren angegeben (Robert Koch-Institut 2017). Beim ausgewerteten Kollektiv lag das mittlere Alter bei Diagnose bei 61,5 Jahren und damit deutlich darunter. Zum einen ist dies wahrscheinlich auf die zeitliche Differenz der Auswertung zurückzuführen. So wurde im Jahr 2004 durch das RKI ein mittleres Erkrankungsalter von 66 Jahren publiziert (Robert Koch-Institut 2004). Zum anderen beträgt die Anzahl der Neudiagnosen in Deutschland ca. 7500 pro Jahr. Bei der Auswertung einer Studiengruppe von 299 Fällen, gesammelt über 4 Jahre, ist deshalb, verglichen mit einem deutschlandweiten Gesamtregister, eine gewisse Abweichung anzunehmen.

Die initiale Beurteilung erfolgte bei allen Tumoren anhand der Klassifikation nach Silverberg. Diese teilt das Grading, unter Berücksichtigung des prädominanten Wachstumsmusters, Kernatypien und Mitoserate, in gut (G1), mäßig (G2) und schlecht (G3) differenziert ein (Silverberg SG 2000). Dies hat zur Folge, dass in der archivierten Dokumentation ein gewisser Anteil als seröse G2-Karzinome bezeichnet wurde. In den Jahren ab 2007 wurde das Grading-Schema für seröse Ovarialkarzinome jedoch überarbeitet und auch die WHO empfiehlt nur noch die Einteilung in high-grade (3) seröse und low-grade (G1) seröse Karzinome. Grundlage hierfür sind die unterschiedlichen molekularpathologischen Eigenschaften und die Wege der Tumorigenese (Malpica A et al. 2007). Aus diesem Grund erfolgte an allen als G2 graduierten Fällen ein Nachgrading nach aktuellen Kriterien. Zur Validierung der serösen Histologie wurde die immunhistochemische Analyse des WT1-Status durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass WT1 hauptsächlich beim serösen Subtyp exprimiert und nur in sehr seltenen Fällen in den übrigen Karzinomen nachzuweisen ist (Kurman RJ et al. 2014) (Hwang H et al. 2004). War ein Ergebnis fraglich, erfolgte die erneute unabhängige Beurteilung durch mindestens zwei Betrachter der Arbeitsgruppe und in wenigen Fällen wurde die Subgruppe nachträglich geändert. Aufgrund der begrenzten Tumormasse auf den TMAs wäre ein Grading oder die histomorphologische Beurteilung an diesen Präparaten nicht möglich gewesen, weshalb dies bei unklarem Ergebnis an ganzen HE gefärbten Schnitten durchgeführt wurde.

Teilweise war die letzte dokumentierte Kontrolle des Tumorleidens nur wenige Tage bis wenige Monate nach der Erstdiagnose. Da aber auch der Tod in dieser Sparte dokumentiert wurde, wurde davon ausgegangen, dass alle Patientinnen, bei denen zum Zeitpunkt der Auswertung der Status „lebt“ dokumentiert war, diese auch nicht verstorben waren. Der Tod wurde in dieser Kategorie auch unabhängig von klinischen Kontrollen erfasst. Das 5-Jahresüberleben des vorliegenden Kollektivs von 47,3% deckt sich mit den Vergleichsdaten der USA (46,5%), dieser

Wert wird in Deutschland mit 41% angegeben (Testa U et al. 2018) (Robert Koch-Institut 2017).

Insgesamt wurden 441 Fälle des Tumorregisters der Jahre 2003 bis 2007 nach erfasstem ICD-10 Code für den Einschluss in das Untersuchungskollektiv evaluiert. 142 Fälle wurden aufgrund unzureichender Dokumentation, unpassender Tumorentität oder insuffizientem Tumormaterial ausgeschlossen. Ein Bias war aufgrund der rein technischen Ausschlusskriterien hierdurch nicht zu erwarten.

Die anteilige Verteilung der histologischen Subtypen entsprach in etwa den in der Literatur beschriebenen Daten. Jedoch war am vorliegenden Kollektiv die Subgruppe der klarzelligen Karzinome unterrepräsentiert (1,3% vs. 10%), was am Ehesten auf die begrenzte Gesamtzahl zurückzuführen ist (Brett MR et al. 2017).

Gesamt betrachtet stimmte das Untersuchungskollektiv im Wesentlichen mit den in der Literatur beschriebenen Daten überein. Fehler in der Zuordnung der Subgruppen wurden aktiv gesucht, nach Möglichkeit korrigiert und den aktuellen Standards angepasst. Einschränkungen sind jedoch im Hinblick auf die Fallzahl gegeben. Tumorentitäten, welche einen Anteil von wenigen Prozent ausmachen, erfordern für fundierte spezifische Aussagen ein wesentlich größeres Patientenkollektiv. Dies limitierte die Subgruppenanalysen in manchen Fällen. Tests der größeren Teilgruppen konnten jedoch an einem großen Kollektiv mit hoher Aussagekraft vorgenommen werden.

4.3 TMA

Die Herstellung und Verwendung von TMAs ist in der aktuellen Forschung ein fester und etablierter Bestandteil. Durch die Zusammenführung vieler Gewebeproben auf einem Objektträger kann so maximal ökonomisch gearbeitet werden. Werden alle Tumorproben eines Kollektivs in einem Färbedurchgang mit denselben Chemikalien und Antikörpern behandelt, minimiert sich das Risiko prozessbedingter Unterschiede am endgültigen Präparat. Limitierender Faktor ist die Tumormasse, welche aus dem Spenderblock in den Empfängerblock eingesetzt wird. Der Durchmesser der jeweils zwei Stanzen betrug im Fall dieser Dissertation 2mm. Schwierig bei der Auswahl der Tumorareale, welche in das TMA übertragen werden sollen, ist, dass am Paraffinblock die Dicke des markierten Bereichs kaum abzuschätzen ist. Dies führte wiederum dazu, dass bestimmte Untersuchungen, insbesondere zu späteren Zeitpunkten, aufgrund mangelnden Materials nicht mehr durchgeführt werden konnten. Weiterhin geben die ausgewählten Bereiche der Tumorstanzen lediglich Auskunft über einen begrenzten Anteil der Gesamtmasse, da nicht selektierte Areale von den Untersuchungen am TMA ausgeschlossen sind. Bei Mutationsanalysen in Studien zur

Karzinomentstehung zeigten sich Hinweise dafür, dass insbesondere Typ-II-Karzinome Schlüsselmutationen in Vorgängerkzellen aufweisen, die wiederum zur Karzinogenese führen. Die Mutationen der Vorläuferzellen sind typischerweise in allen Tumorzellen nachweisbar. Jedoch zeigten diese Untersuchungen auch, dass sich diese Mutationen räumlich unterscheiden können (Bashashati A et al. 2013) (Testa U et al. 2018). Es ist also denkbar, dass gewisse Merkmale nicht oder ausschließlich im Bereich der Stanze exprimiert werden. Die Auswahl repräsentativer Bereiche erfolgte ausschließlich nach histomorphologischer Beurteilung. Je mehr Tumorzellen auf einem Objektträger vorhanden sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, intratumorale Heterogenitäten zu erfassen. Nach Studien, welche die Übereinstimmung von immunhistochemischen Untersuchungen an TMAs und ganzen Schnitten untersuchten, ergibt sich bei Verwendung von zwei selektierten 1mm-Stanzen eine Übereinstimmung von 96% mit dem Gesamttumor. Die Validität für immunhistochemische Untersuchungen ist also gegeben. Da in dieser Dissertation 2mm-Stanzen verwendet wurden, ist davon auszugehen, dass die Konkordanz eher noch höher ist (Rosen DG 2004) (Hecht JL et al. 2008).

4.4 Immunhistochemie

Die Methode der IHC ist ein etabliertes Verfahren zum Nachweis von Antigenstrukturen. Alle Färbungen waren im Pathologischen Institut der LMU oder im Forschungslabor der Frauenklinik der LMU etabliert und validiert. Die Auswertung erfolgte für die Färbungen ER, PR, Her2 und BRCA1 jeweils durch zwei Personen, welche je die Hälfte des Kollektivs beurteilten. Die Auswertung von WT1, ARID1A, BRCA2, EP3, Lef1, β -Catenin und p16 erfolgten durch mindestens 2 Personen am gesamten Kollektiv. Die Instruktion und Überprüfung erfolgte durch Fachärztinnen für Pathologie. Fragliche Befunde wurden arbeitsgruppenintern mit den entsprechenden Fachärztinnen besprochen. Für den Großteil der Untersuchungen erfolgte die Beurteilung der Färbeintensität und die Schätzung des Anteils gefärbter Zellen. Die Cut-Offs für Positivität und Negativität orientierten sich an der aktuellen Literatur, wie im Methoden-Teil beschrieben. Waren keine Publikationen der jeweiligen Antikörper zu Ovarialkarzinomen vorhanden, erfolgte die Einteilung nach den Kriterien anderer Tumorentitäten.

4.5 Klinische Aspekte als Prognosefaktoren

4.5.1 Alter bei Diagnose

Das Alter bei Diagnose stellte einen statistisch signifikanten Prognosefaktor am vorliegenden Kollektiv dar. Eingeteilt in 3 Altersgruppen zeigte sich mit höherem Alter ein schlechteres Überleben. Ein hochsignifikantes Ergebnis ergab sich bei Einteilung in 2 Altersgruppen mit einem Cut-Off von 66 Jahren. Dies deckt sich mit den Literaturwerten (Kim J et al. 2019). Zu erklären ist dies am ehesten durch die höhere Prävalenz von Komorbiditäten und Multimorbidität mit steigendem Alter (Divo MJ et al. 2014). Diese stellen limitierende Faktoren bei der Therapie dar und verringern gesundheitliche Ressourcen. In der Literatur wird ein schlechteres Outcome bei älteren Patientinnen durch ein häufig höheres Tumorstadium und Grading bei Diagnose postuliert (Ezzati M. et al. 2014). Die Tendenz zu besserer Differenzierung und weniger invasiven Tumoren bei jüngeren Patientinnen konnte am vorliegenden Kollektiv nicht nachgewiesen werden.

4.5.2 FIGO-Stadium

Es wurde konsistent beschrieben, dass die Prognose vom Tumorstadium, eingeteilt nach FIGO-Klassifikation, abhängig ist. Dies wurde in mehreren Studien bewiesen und spiegelt sich auch in den aktuellen Leitlinien zur Therapie wider (Montavon Sartorius C et al. 2018). In niedrigeren Stadien ist deshalb ein weniger invasives operatives Vorgehen möglich und in gewissen Fällen kann auf eine adjuvante Chemotherapie verzichtet werden (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2020). Am Gesamtkollektiv konnte die schlechtere Prognose in höherem Tumorstadium mit hoher Signifikanz nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass sich hochsignifikante Unterschiede bezüglich des Überlebens bei Typ-I-Karzinomen in Abhängigkeit des FIGO-Stadiums zeigten, diese Tendenz bei Typ-II-Karzinomen jedoch nicht in signifikantem Ausmaß vorhanden war. Betrachtet man dies vor dem Hintergrund, dass Typ-I-Karzinome per definitionem ein geringeres malignes Potential, ein langsames Wachstum und eher eine lokale Begrenzung aufweisen, scheint es möglich, dass dem Tumorstadium hier eine größere Bedeutung zukommt, da sich die Prognose bei höherer Tumorlast verschlechtert. Typ-II-Karzinome sind von hohem malignem Potential, wachsen schneller und aggressiver (Kurman RJ und Shih IeM 2016). Es ist möglich, dass diese Tumorentität bereits bei geringer Ausbreitung und damit niedrigem Tumorstadium eine so schlechte Prognose aufweist, dass das FIGO-Stadium an prädiktiver Aussagekraft verliert. In anderen Worten würde dies bedeuten, dass Typ-II-Ovarialkarzinome per se ein kürzeres Überleben aufweisen und der Grad der Ausbreitung bei Stellung der Diagnose hierauf einen geringeren Einfluss hat.

4.5.3 Differenzierungsgrad und histologischer Subtyp

Die verschiedenen Subgruppen des Ovarialkarzinoms werden jeweils nach spezifischen Kriterien bezüglich ihres Differenzierungsgrades in jeweils bis zu 3 Klassen eingeteilt. Je höher das Grading ausfällt, desto schlechter ist der Tumor differenziert. Dies beinhaltet unter anderem die Beurteilung histomorphologischer Aspekte, der Invasivität und der mitotischen Aktivität. Allgemein ist dies ein Indikator für das maligne Potential des jeweiligen Karzinoms. Dies zeigte sich auch in den Überlebensraten, welche bei höherem Grading abnahmen (Cho KR und Shih leM 2009). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, wenn man alle auswertbaren Fälle einbezog, ein signifikant schlechteres Überleben für G3-Karzinome. Langfristig zeigte sich jedoch für das Grading G1 ein schlechteres Outcome als für G2. Dies scheint zunächst verwunderlich. Ein möglicher Faktor, der dies beeinflussen kann, ist, dass alle Karzinomgruppen in diese Analyse einbezogen wurden. Die Graduierung wird unter konkreten Gesichtspunkten für den jeweiligen Tumor festgelegt, was nicht bedeutet, dass ein G1 graduiertes seröses Karzinom dasselbe maligne Potential wie ein G1 graduiertes endometrioides Karzinom hat. Was wiederum dazu führt, dass sich das Überleben beider G1-Tumoren unterscheiden würde. Weiterhin wurde dieses Ergebnis von der Gruppe der serösen Ovarialkarzinome verfälscht, für welche das Grading G2 nicht zulässig ist. Diese Gruppe wies deshalb nur eine geringe Fallzahl auf. In der zusammengefassten Analyse zeigte sich am Gesamtkollektiv ein signifikant besseres Überleben für die Fälle mit Grading G1/G2, sodass der Differenzierungsgrad G3 klar als Marker für ein schlechteres Überleben zu konstatieren war.

Die Subgruppenanalyse der nicht serösen Ovarialkarzinome im Hinblick auf das Grading lieferte ein signifikantes, konklusives Ergebnis mit gutem, intermediärem und schlechtem Outcome für Karzinome mit Grading G1, G2 und G3. Was die These bestärkt, dass das 2-Gruppen-System der serösen Karzinome die Analyse des Gesamtkollektivs verzerrt.

Die binäre Einteilung der serösen Ovarialkarzinome erfolgt aufgrund molekularpathologischer Erkenntnisse, welche eine unterschiedliche Tumorigenese vermuten lässt. Weiterhin zeigten mehrere Studien eine signifikant bessere Prognose für low-grade seröse Karzinome (Malpica A 2008) (Kaldawy A et al. 2016). Diese publizierten und anerkannten Daten konnten am ausgewerteten Kollektiv nicht bestätigt werden. Es zeigte sich ein annähernd identisches langfristiges Überleben beider Gruppen. Als limitierender Faktor ist die geringe Fallzahl an low-grade Karzinomen (n = 24) zu nennen. Für eine fundierte Aussage müsste diese wesentlich höher sein. Eine Verzerrung des Ergebnisses durch fehlerhafte Zuordnung ist aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit ebenfalls möglich (Köbel M et al. 2014).

Kurman und Shih empfehlen die Klassifizierung epithelialer Ovarialkarzinome in Typ-I und Typ-II. Ausschlaggebend hierfür sind klinische, morphologische und molekulare Eigenschaften. Der

wohl wichtigste klinische Aspekt ist die bessere Prognose von Typ-I-Karzinomen (Kurman RJ und Shih IeM 2016). Am vorliegenden Kollektiv konnte dieser Trend bestätigt werden, erreichte jedoch nicht das Niveau statistischer Signifikanz. Eingeschlossen in die Überlebensanalyse waren 297 Fälle, 67 (22,6%) als Typ-I und 230 (77,4%) als Typ-II klassifiziert. Die Verteilung stimmte mit den publizierten Daten überein (Kurman RJ et al. 2014). Es ist möglich, dass bei höherer Fallzahl statistische Signifikanz erreicht worden wäre.

4.6 Biomarker und deren prognostische Bedeutung

4.6.1 ER

Die Expression des Östrogenrezeptors zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit den histologischen Subtypen. Dies wurde unter anderem auch durch die WHO in der Empfehlung zur Klassifikation von Tumoren der weiblichen Reproduktionsorgane publiziert. Das Expressionsmuster am vorliegenden Kollektiv stimmte größtenteils mit den Literaturdaten überein. (Kurman RJ et al. 2014) Lediglich bei Subtypen, von welchen weniger als 20 Fälle ausgewertet werden konnten, zeigten sich deutliche Abweichungen. Dies ist bei der geringen Fallzahl pro Tumorklasse jedoch erklärbar.

Die ER α exprimierende Gruppe zeigte am vorliegenden Kollektiv einen Trend zur positiveren Prognose ohne statistische Signifikanz. Das Signifikanzniveau wurde jedoch in der Subgruppenanalyse der Typ-II-Karzinome erreicht. Es zeigte sich ein schlechteres Outcome mit einem kürzeren Überleben bei negativem ER α -Status. Dies deckt sich mit den Daten, welche in einer Meta-Analyse im Jahr 2017 veröffentlicht wurden. Hierbei wurde in der Auswertung von 35 Studien und mehr als 5500 eingeschlossenen Patientinnen ebenfalls eine schlechtere Prognose bei negativem Rezeptorstatus beobachtet (Shen Z. et al 2017). Nach den Erläuterungen in Punkt 1.9.1 sind diese Ergebnisse schwer nachvollziehbar, da Östrogen allgemein als Wachstums- und Proliferationsfaktor fungiert. Es wird postuliert, dass diese Funktion hauptsächlich in der frühen Tumorigenese von Bedeutung ist. Es wurde eine Herabregulierung der ER-Expression bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen beschrieben. Dieser Prozess wird auf Transkriptionsrepressoren und Methylierung der Promoterregion der Östrogenrezeptorgene bei fortgeschrittenen Karzinomen zurückgeführt (Borges A et al. 2009). Unter Berücksichtigung dieses Aspektes ist die schlechtere Prognose bei ER α -Negativität nachvollziehbar, da ein fortgeschrittenes Karzinom, welches folglich weniger ER exprimiert, ein erhöhtes Risiko für einen tumorassoziierten Tod aufweist.

Die Therapie des Mammakarzinoms wurde durch die Einführung der antihormonellen Behandlung (beispielsweise mit Tamoxifen) bei positivem ER-Status revolutioniert. Die spezifische Blockade dieses Signalweges führte zu einer dramatischen Verbesserung der Prognose dieser Untergruppe (Lumachi F et al. 2013). Bei der Therapie des ER-positiven Ovarialkarzinoms zeigte die Antiöstrogentherapie bisher ernüchternde Ergebnisse. Ein wesentlicher Überlebensvorteil bei positivem ER-Status konnte bisher nicht reproduzierbar nachgewiesen werden (Modugno F et al 2012). Zur Erklärung dieses Phänomens existieren mehrere Modelle.

In einer Expressionsanalyse der verschiedenen Östrogenrezeptoren beschrieben *Chan et al.* eine bessere Prognose bei Tumoren mit cytoplasmatischer Expression von ER β 1. ER β 1 wurde deshalb als Tumorsuppressor deklariert. Wachstums- und Proliferationsfaktoren werden größtenteils von ER α vermittelt. Tamoxifen blockiert unselektiv ER α und ER β 1, also den Tumorpromotor und den -suppressor, was den klinischen Vorteil dieser Therapie schmälert. Es ist denkbar, dass der Einsatz selektiver ER α -Blocker den positiven Effekt von ER β 1 nicht aufhebt und so die Prognose ER α -positiver Karzinome verbessert (Chan KL et al. 2017).

Ein weiterer Faktor der mangelnden Wirksamkeit sind Resistenzen gegenüber antihormonellen Medikamenten. Beispielsweise postulieren *Simpkins et al.*, dass Östrogen kurzzeitig die Tyrosinkinase Src aktiviert und es zur ER-Src Co-Translokation in den Nukleus kommt. Diese Aktivität führt wiederum zur Transkription von ER-gesteuerten Genen und damit zum Tumorprogress. Durch die Blockade der Tyrosinkinase mittels Saracatinib zeigten sich einige ER-abhängige Gene herabreguliert. Bei der dualen Therapie mit dem Antiöstrogen Fluvestrant und Saracatinib zeigte sich in vitro ein Arrest des Zellzyklus sowie die Einleitung von Apoptose und Autophagie (Simpkins F et al. 2012) (Simpkins F et al. 2013). Dies lässt erkennen, dass die Transkription ER-gesteuerter Gene nicht allein ER α abhängig ist. Um die Östrogenwirkung aufzuheben, müssten zusätzlich Resistenzmechanismen identifiziert und gezielt adressiert werden.

In einer retrospektiven Studie mit low-grade serösen Ovarial- und Peritonealkarzinomen zeigte sich ein längeres progressionsfreies Intervall sowie ein verbessertes Gesamtüberleben der Patientinnen, bei welchen nach primärer Tumorresektion und folgender platinbasierter Chemotherapie eine antihormonelle Erhaltungstherapie initiiert wurde. Jedoch erfolgte die Selektion unabhängig vom Hormonrezeptorstatus. Informationen zur ER-Expression lagen nur in 37% der eingeschlossenen Fälle vor (Gershenson DM et al. 2017). Abgesehen von den formalen Einschränkungen der Studie könnten auch diese Erkenntnisse richtungsweisend für den Einsatz antihormoneller Medikamente in der Erhaltungstherapie bei low-grade serösen Karzinomen sein.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die alleinige immunhistochemische Bestimmung des ER α -Status nicht suffizient ist, um Patientinnen zu selektieren, welche für eine antihormonelle Therapie qualifizieren. Weiterhin bleibt fraglich, ob der Einsatz von Antiöstrogenen ohne Berücksichtigung der Resistenzmechanismen sinnvoll ist. Ansätze für eine gezielte Therapie wären einerseits die selektive Blockade von ER α und der damit verbundenen Gentranskription, andererseits die kombinierte Inhibition des Hormonrezeptors und der Resistenzmechanismen. Als prognostischer Marker in der Subgruppe der Typ-II-Karzinome scheint ER α von Bedeutung. Die Aussagekraft erhöht sich jedoch in Kombination mit weiteren Merkmalen. Dies wird in Punkt 4.7.3 ausführlich erläutert.

4.6.2 PR

Die Auswertung der Expression des Progesteronrezeptors zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit den histologischen Subtypen. Es zeigte sich aber, dass ER α und PR häufig gemeinsam exprimiert werden. Analyierte man allein den PR-Status in Bezug auf das Überleben, bestand weder am Gesamtkollektiv noch in den Subgruppen ein signifikanter Unterschied.

In mehreren Studien wurde ein besseres Outcome bei PR-positiven Ovarialkarzinomen beschrieben (Luo H et al. 2017). Insbesondere scheint dies beim endometrioiden Subtyp der Fall zu sein (Hollis RL et al. 2019). Am vorliegenden Kollektiv war die Fallzahl an endometrioiden Karzinomen zu gering ($n = 23$), um eine entsprechende Aussage zu widerlegen oder zu unterstützen.

Klinische Studien zeigten die protektive Wirkung progesteronhaltiger oraler Kontrazeptiva im Hinblick auf die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms (Hunn J 2012). Die Aktivierung von PR durch Progesteron führt im normalen Ovar und auch im Ovarialkarzinom zur Transkription tumorsuppressiver Gene. Weiterhin wurde in vitro und an Xenografts mit Gewebe von Ovarialkarzinomen eine verstärkte Apoptose unter platinhaltiger Chemotherapie bei zusätzlicher Verabreichung von Progesteron beschrieben (Murdoch WJ et al. 2008).

Dass eine protektive Wirkung durch Progesteron vermittelt wird, wurde bereits vor längerem beschrieben. Die genaue Wirkungsweise von Progesteron und des Progesteronrezeptors ist aber noch wenig bekannt, weshalb es schwierig ist, den positiven Einfluss detailliert zu nachzuvollziehen. Insbesondere ist unzureichend erforscht, welche Gene durch den klassischen Progesteronrezeptor gesteuert werden und welche Gene auf anderem Wege progesteronabhängig sind (Lau KM et al. 1999).

Wie auch für die Expression des Östrogenrezeptors zeigt sich eine Abnahme der Expression von PR mit höherem Tumorgrading. Dies lässt vermuten, dass die Verabreichung von

Progesteron bei diesen Tumoren keinen Effekt zeigt. Jedoch scheint dieser nicht nur abhängig vom klassischen Progesteronrezeptorstatus zu sein. *Charles et al.* beschrieben Membranrezeptorkomplexe, welche Progesteron binden und antiproliferative Zellprozesse und die Apoptose in Tumorzellen fördern. Die membranständigen Progesteronrezeptoren (mPR) scheinen den proapoptotischen MAP-Kinase-Weg (mitogen-activated protein kinase, MAPK) zu aktivieren (Charles NJ et al. 2010). Bei erhöhter MAPK-Aktivität wurde wiederum eine bessere Prognose unter Chemotherapie aufgrund erhöhter cytotoxischer Wirkung von Paclitaxel und Cisplatin beschrieben (Mansouri A et al. 2003) (Lee LF et al. 1998).

Unterstützt werden diese Annahmen unter anderem durch klinische Studien, in welchen eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens für PR+ Status beschrieben wurde. Hier zeigte sich bei höherer PR-Expression ein größerer Einfluss (Niwa K et al. 2008) (Modugno F et al. 2012).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Expression von PR nach aktuellem Wissensstand, insbesondere in der Subgruppe der endometrioiden Ovarialkarzinome, ein positiver Prädiktor ist. Weiterhin könnte konstatiert werden, dass die Therapie mit Progesteron oder Progesteronanaloga in Kombination mit einer konventionellen Chemotherapie möglicherweise ein besseres Ansprechen mit konsekutiv verbesserter Prognose darstellt. Jedoch scheint auch hier die allein immunhistochemische Bestimmung des PR-Status nicht als adäquates Mittel, Patientinnen für eine derartige Therapie zu selektieren. Um geeignete Marker für die Selektion zu identifizieren, sind weitere Untersuchungen erforderlich, welche den positiven Effekt von Progesteron auch unabhängig von PR genauer identifizieren. Am vorliegenden Untersuchungskollektiv konnten prädiktive Aussagen nur in Kombination mit weiteren Biomarkern getroffen werden.

4.6.3 WT1

Die statistische Auswertung des WT1-Status zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit den histomorphologischen Subtypen. *Hwang et al.* konnten bereits 2004 einen relevanten Unterschied in der WT1-Expression in den einzelnen Untergruppen des Ovarialkarzinoms beschreiben. Es zeigte sich eine über 90%ige Expressionsrate in serösen high- und low-grade Karzinomen. Bei den übrigen Differenzierungen ist dieser Biomarker kaum nachweisbar. Aufgrund des spezifischen Expressionsmusters, wurde WT1 im Rahmen dieser Dissertation unter anderem zur Verifizierung der histologischen Subtypen ausgewertet (Hwang H et al. 2004). Insbesondere bei high-grade Tumoren weisen die verschiedenen Tumorunterarten morphologische Ähnlichkeiten auf, welche eine hierauf basierende Bestimmung der Subgruppe nicht immer reproduzierbar zulassen.

Anteilig war ein positiver WT1-Status innerhalb der Subgruppen (n = Gesamtzahl der Untergruppe) folgendermaßen vorhanden: low-grade serös 100% (n = 21), high-grade serös 95,8% (n = 214), endometrioid 18,2% (n = 22), muzinös 11,1% (n = 9), klarzellig 25,0% (n = 4), undifferenziert 75,0% (n = 8), seromuzinös 66,7% (n = 3). Die Anteile für low-grade und high-grade seröse Karzinome waren sehr nahe an den publizierten Daten. Bei den restlichen Untergruppen war die Expression von WT1 deutlich höher als allgemein beschrieben. Bei geringen Fallzahlen ist von einer gewissen Verfälschung auszugehen, da einzelne positive Fälle einen hohen Einfluss auf den Gesamtanteil haben. Die WT1-positiven, nicht serösen Tumorproben wurden nochmals kritisch beurteilt. Lag ein zweifelhafter Befund vor, welcher auch mit einem serösen Karzinom in Einklang gebracht werden konnte, erfolgte die Änderung der Subgruppe. War der Tumortyp nach histomorphologischen Kriterien eindeutig nicht serös, wurde keine nachträgliche Änderung vorgenommen, da WT1-Positivität in geringer Frequenz auch bei nicht-serösen Karzinomen beschrieben wurde (Acs G et al. 2004) (Waldstrøm M und Grove A. 2005). Ein Ausschluss dieser Fälle erschien wenig sinnvoll, da angenommen wurde, dass sich bei höherer Fallzahl die Anteile den in der Literatur beschriebenen Werten annähern würden (Kurman RJ et al. 2014).

In Studien, welche die prognostische Aussagekraft des WT1-Status überprüften, zeigte sich ein schlechteres Outcome für WT1 exprimierende Tumoren (Qi XW et al. 2015). Diese Erkenntnisse sind jedoch nicht unumstritten. Høgdall et al. zeigten in einer Studie mit 560 eingeschlossenen Fällen ebenfalls einen Trend zum besseren Outcome bei WT1-Negativität, konnten diese Eigenschaft jedoch nicht als unabhängigen prognostischen Faktor bestätigen (Høgdall EVS et al. 2007a). Die Überlebensanalyse im Hinblick auf die WT1-Expression zeigte, mit diesen Daten übereinstimmend, am Gesamtkollektiv und in den jeweiligen Subgruppen eine Tendenz einer besseren Prognose bei negativem WT1-Status, das statistische Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht.

In frühen Publikationen wurde WT1 als Tumorsuppressor bezeichnet (Call KM et al. 1990). Jedoch belegen neuere Studien die onkogene Wirkung des Proteins als Transkriptionsfaktor zur Steuerung von Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Sugiyama H 2001).

2009 erstellte das US-amerikanische National Cancer Institute (NCI) eine Liste mit Antigenen für mögliche Angriffspunkte einer Immuntherapie bei Tumoren. Die Priorisierung erfolgte unter anderem nach Immunogenität, onkogenem Potential und dem Anteil der exprimierenden Tumorzellen. WT1 war nach diesen Kriterien der Biomarker, welchem das höchste therapeutische Potential zugesprochen wurde (Cheever MA et al. 2009) (Hylander B et al. 2006). In einer klinischen Phase-I-Studie zur Immuntherapie mit Induktion einer T-Zell vermittelten Reaktion bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML),

myelodysplastischem Syndrom, einem Lungen- oder Mammakarzinom mit positivem WT1-Status, wurde in mehreren Fällen eine Verringerung der Blastenzahl bzw. der Tumormasse beschrieben (Oka Y et al. 2004). Diese Daten wurden durch die Phase-II-Studie an AML-Patienten unterstützt (Maslak PG et al. 2018). Derartige Studien existieren bislang für das Ovarialkarzinom nicht.

Untersuchungen an Adenokarzinomen der Lunge bzw. Lungenmetastasen bei bekanntem Tumorleiden der Brust, des Ovars, der Niere, der Schilddrüse und der Prostata evaluierte die Bedeutung des WT1-Status zur Identifikation eines Primärtumors bei „Cancer of unknown primary“ (CUP-Syndrom). Hierbei zeigten sich ausschließlich Karzinome ovariellen Ursprungs WT1-positiv (Ordóñez NG 2000).

In Zusammenschau stellt die immunhistochemische Bestimmung des WT1-Status ein gutes Kriterium zur Identifikation seröser Ovarialkarzinome, sowohl in der Subgruppenbestimmung bei primärem Tumor der Ovarien als auch bei einem CUP-Syndrom dar. Als prognostischer Faktor ist die Aussagekraft eingeschränkt. Auch die Beurteilung in Kombination mit anderen Biomarkern konnte im Rahmen dieser Arbeit keine statistisch signifikanten Prognosen generieren. Aufgrund der hohen Expressionsrate und der Immunogenität wäre eine T-Zell vermittelte Immuntherapie ein möglicher Ansatz für eine zielgerichtete Tumorthherapie. Dieser Ansatz wurde bisher jedoch ausschließlich an anderen Tumorentitäten evaluiert. Hier sind klinische Studien an WT1-positiven Ovarialkarzinomen erforderlich, um das immunvermittelte Therapiepotential zu eruieren, da WT1 bisher nicht als sicherer Marker zur Beurteilung der Immunreaktivität beschrieben wurde.

4.6.4 ARID1A

Die Auswertung des ARID1A-Status zeigte weder mit dem Subtyp noch mit dem Überleben statistisch signifikante Zusammenhänge. Der Verlust der ARID1A-Expression wurde an einem low-grade serösen (4% der Subgruppe, n = 24), acht high-grade serösen (4% der Subgruppe, n = 223), vier endometrioiden (17% der Subgruppe, n = 23) und einem klarzelligen (25% der Subgruppe, n = 4) Karzinomen beobachtet. In der Literatur wird vor allem ein Zusammenhang mit den beiden letzteren Typen beschrieben. Bei klarzelligen Karzinomen wird eine Mutationsrate von 46-57%, bei endometrioiden von 30% beschrieben (Jones S et al. 2010) (Wiegand KC et al. 2010).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine immunhistochemische Expressionsanalyse von ARID1A durchgeführt. In der Literatur wurde gezeigt, dass der Verlust der ARID1A-Expression einen relativ verlässlichen immunhistochemischen Marker für eine loss-of-function-Mutation darstellt (Yachida N et al. 2020).

Die Abweichung der Subgruppenverteilung bei Expressionsverlust von ARID1A in dieser Arbeit ist am ehesten auf die geringe Fallzahl der jeweiligen Karzinome zurückzuführen. Die Tendenz zu höheren Mutationsraten bei endometrioidem und klarzelligem Subtyp ist am Untersuchungskollektiv durch vermehrten Expressionsverlust jedoch erkennbar.

ARID1A wurde als Tumorsuppressor identifiziert, welcher den Zellzyklus unter anderem durch p53 regulierte Gene beeinflusst. Es wurde eine gemeinsame Wirkung beider Biomarker im Komplex bei der Transkription von Tumorsuppressorgenen postuliert. Untersuchungen zeigten, dass im Falle einer ARID1A-Mutation meist eine Wildtyp-Expression von p53 und umgekehrt vorlag. Dies legt nahe, dass, falls einer der beiden Tumorsuppressoren nicht exprimiert wird, die Wirkung im Komplex als Tumorsuppressor aufgehoben wird, was die Entstehung eines Karzinoms begünstigt (Guan B et al. 2011). Dies war auch am untersuchten Kollektiv nachvollziehbar. Eine gemeinsame Alteration des Expressionsmusters für p53 und ARID1A wurde nur bei sechs Fällen (2,4% aller Fälle mit alterierter Expression von p53 und/oder ARID1A) nachgewiesen.

Das Überleben der ARID1A-negativen Fälle unterschied sich nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe. Auch in den Subgruppen war ARID1A nicht als prädiktiver Marker zu identifizieren. Dies steht im Einklang mit klinischen Studien, die ebenfalls keinen Unterschied im Überleben oder progressionsfreien Intervall beschreiben konnten, wenn alle Subgruppen des Ovarialkarzinoms untersucht wurden (Yokoyama Y et al. 2014). Um die postulierte schlechtere Prognose und Assoziation zu höherem Tumorstadium an ARID1A-negativen, klarzelligen und endometrioiden Ovarialkarzinomen zu unterstützen oder zu widerlegen, war die Fallzahl dieser Subtypen zu klein (Heckl M. et al 2018).

Da der Expressionsverlust von ARID1A zum Verlust eines Tumorsuppressors führt, stellt dieses Merkmal per se keinen sinnvollen Ansatz für eine zielgerichtete Therapie dar. Vielmehr sind es Veränderungen in Folge dieser Mutation, welche einen möglichen Angriffspunkt bieten.

Der BAF-Komplex ist ein humaner Proteinkomplex mit Bedeutung im Vorgang des Chromatin-Remodelings und gehört zur SWI/SNF-Familie. Die Umorganisation der Chromatinstruktur stellt einen eminent wichtigen Schritt in der Zellproliferation dar. ARID1B und ARID1A gleichen sich zu 60% und können jeweils als Untereinheit des BAF-Komplexes fungieren. In ARID1A-negativen Zellen wurde eine vermehrte Expression von ARID1B beobachtet. *Helming et al.* beschrieben in vitro ein supprimiertes Wachstum von ARID1A-negativen Karzinomzellen nach ARID1B-Depletion. Dies wurde deshalb als möglicher Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie deklariert (Helming KC et al. 2014). Jedoch wurde dies durch den Nachweis ARID1A/ARID1B co-defizienter Tumoren ohne Einschränkung in Wachstum und Disseminierung relativiert (Coatham M et al 2016).

Weiter wird bei ARID1A defizienten Karzinomen häufig die Aktivierung des PIK3CA Onkogens oder die Inaktivierung des Tumorsuppressors PTEN beobachtet. Beides sind Bestandteile des proliferationsfördernden PI3K/AKT-Signalweges. Zu erklären ist dies durch die ARID1A-Abhängigkeit der diesen Signalweg regulierenden Faktoren. Die ARID1A-Mutation scheint also Teil einer Kaskade der Tumorentstehung zu sein. mTOR stellt als Protein des PI3K/AKT-Signalweges ein mögliches Ziel der Inhibition der onkogenen Wirkung dar (Bitler BG et al. 2015a). Jedoch konnten Phase-II-Studien keine Verbesserung der Prognose durch den Einsatz der mTOR-Inhibitoren Everolimus und Temsirolimus nachweisen (Emons G et al. 2016) (Tew WP et al. 2018).

Die Histon-Methyltransferase EZH2 und ARID1A wurden als Antagonisten in der Regulation des PI3K/AKT-Signalweges beschrieben. EZH2 zeigte eine inverse Korrelation mit dem PI3K/AKT-Inhibitor PIK3IP1. Für den Einsatz von EZH2-Inhibitoren wurde bei ARID1A-mutierten Karzinomzellen eine vermehrte Expression von PIK3IP1 beschrieben und eine hierdurch vermittelte proapoptotische Wirkung festgestellt. Jedoch existieren für diesen Ansatz aktuell keine klinischen Studien, welche die Bedeutung bei Ovarialkarzinomen evaluieren. Insbesondere in der Therapie von Lymphomen zeigten EZH2-Inhibitoren bisher vielversprechende Ergebnisse (Jones BA et al. 2018) (Bitler BG et al. 2015b).

Zusammenfassend stellt die Mutation von ARID1A mit großer Wahrscheinlichkeit einen Faktor in der frühen Genese des klarzelligen und des endometrioiden Ovarialkarzinoms dar. Für diesen Ausfall wurden mehrere zelluläre und nukleäre Folgen beschrieben. Jedoch besteht für therapeutische Ansätze dieser Folgeerscheinungen unzureichende Evidenz eines verbesserten Outcomes, weshalb diese im klinischen Alltag noch keine Anwendung finden. Es bleibt fraglich, ob die Modulation der beschriebenen Angriffspunkte in der singulären Therapie zur Hemmung des Wachstums oder sogar zum Rückgang des Tumors führen können. Wahrscheinlicher ist eine verbesserte Prognose im Rahmen einer speziell augmentierten und kombinierten Chemotherapie. Die Evaluation eines klinischen Nutzens erfordert Studien mit ausreichender Fallzahl, fokussiert auf die Subgruppe der klarzelligen und endometrioiden Karzinome. Die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten lassen keine eindeutigen Rückschlüsse auf die prognostische Aussagekraft zu.

4.6.5 BRCA1 und BRCA2

Weder für BRCA1 noch für BRCA2 konnte am Untersuchungskollektiv ein signifikanter Zusammenhang des Expressionsstatus mit dem histologischen Subtyp nachgewiesen werden. Jedoch lag bei Expressionsverlust von BRCA1 bzw. BRCA2 in 78,7% bzw. 80,0% der Fälle ein

high-grade seröses Ovarialkarzinom vor. Insgesamt wurde eine fehlende Expression von BRCA1 oder BRCA2 am Gesamtkollektiv in 86 (29%) von 297 Fällen beobachtet.

Ein wichtiger Punkt im Hinblick auf die Bestimmung des BRCA1/2-Mutationsstatus ist die technische Ausführung. Die Auswertung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte immunhistochemisch. In den meisten Studien erfolgte die Erhebung des Mutationsstatus mittels direkter Genanalyse. Fraglich ist, ob eine fehlende BRCA1- oder BRCA2-Expression in der IHC gleichbedeutend mit einer Genmutation ist. Für BRCA1 wurde dies in mehreren Studien untersucht und beschrieben, dass, nach festgelegten Kriterien, der IHC-Status mit der Genfunktion übereinstimmt, also im Falle einer Mutation meist die Expression fehlt (Meisel JL et al. 2014) (Garg K et al. 2013). Die Aussagekraft der immunhistochemischen Bestimmung von BRCA2 wurde bisher nicht extensiv untersucht, jedoch zeigten Studien mit geringen Fallzahlen eher eine geringe Aussagekraft der alleinigen IHC (Vaz FH et al. 2007) (Teixeira LA und Candido dos Reis FJ 2019). Vergleicht man jedoch die Ergebnisse der IHC für BRCA2 am vorliegenden Kollektiv mit den in der Literatur beschriebenen Daten für eine Genmutation, zeigte sich im Hinblick auf die zu erwartende Frequenz eine weitgehende Übereinstimmung (Mafficini A et al. 2016).

Für BRCA1 konnte am untersuchten Kollektiv kein signifikanter Unterschied des Überlebens in Abhängigkeit der Expressionsmusters nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung für BRCA2 zeigte sich für Fälle mit Expressionsverlust, ein Trend zu einem besseren Gesamtüberleben, jedoch ohne statistische Signifikanz. In der Literatur wurde ein besseres Outcome bei BRCA1 oder BRCA2-mutierten Ovarialkarzinomen beschrieben. Dies wurde durch das bessere Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapien erklärt (Cass I et al. 2003).

Für BRCA1 und BRCA2 wurden mehrere, hauptsächlich tumorsuppressive Funktionen nachgewiesen. Beiden Proteinen ist die Beteiligung an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination gemein. Dies legt nahe, dass der Verlust von eben dieser Fähigkeit die Karzinomentstehung durch Kumulation von Mutationen begünstigt (Roy R et al. 2011). Man bezeichnet diese Einschränkung der DNA-Reparatur als „homologous recombination deficiency“ (HRD).

Nach den Literaturdaten stellen die Mutationen von BRCA1 und BRCA2 prognostische Faktoren dar, welche hauptsächlich über das gute Ansprechen auf Chemotherapien apparent werden (Roy R et al. 2011). Diese Tendenz zeigte sich bei den Expressionsanalysen am vorliegenden Kollektiv nur geringfügig. Setzt man voraus, dass der die fehlende Expression von BRCA1 bzw. BRCA2 ein Marker für eine HRD ist, lässt sich vermuten, dass der Trend zu einem besseren Outcome auf eine höhere Chemosensitivität zurückzuführen ist. Durch den defizienten Reparaturmechanismus könnten chemotherapieinduzierte DNA-Schäden in Tumorzellen nicht

suffizient behoben werden, was wiederum zu Apoptose und damit zum Therapieerfolg mit konsekutiver Verbesserung der Prognose führt.

Insbesondere bei Patientinnen mit Familienmitgliedern ersten Grades mit frühem Brustkrebs oder einem invasiven Ovarialkarzinom wurde die genetische Testung auf eine BRCA-Mutation empfohlen. Aufgrund der hohen Prävalenz der weiblichen Gesamtbevölkerung, welche mit bis zu 8% beschrieben wurde, gaben *Zhang et al.* die Empfehlung zur Testung aller Patientinnen mit invasivem Ovarialkarzinom ab. Bei diesen Studien erfolgte die Erhebung des Mutationsstatus jeweils an DNA aus peripherem Blut. So konnten Keimbahnmutationen zur Bestimmung des familiären Karzinomrisikos erfasst werden (Zhang S et al. 2011).

Ein weiterer Mechanismus der Reparatur von DNA-Schäden wird durch die Familie der PARP-Enzyme vermittelt. Wird in Karzinomen mit HRD durch den Einsatz von PARP-Inhibitoren ein weiterer Weg der DNA-Reparatur gehemmt, wurde die Akkumulation von DNA-Schäden und konsekutiv die Apoptose beschrieben. 2014 erfolgte die Zulassung des PARP-Inhibitors Olaparib für die Therapie bei Rezidiv eines platin sensitiven, high-grade serösen Ovarialkarzinoms mit BRCA1- oder BRCA2-Mutation, da hier eine signifikante Verbesserung der Prognose beschrieben wurde. Ob es sich um eine Keimbahnmutation oder eine somatische Mutation handelte, hatte keinen Einfluss auf das Ansprechen. Zwischenzeitlich konnte für neuere Medikamente dieser Klasse auch ein verbessertes Outcome bei platin sensitiven Ovarialkarzinomen ohne BRCA1/2-Mutation nachgewiesen werden. Die Autoren der ARIEL2-Studie beschrieben, mit der Analyse des genomischen „loss of heterozygosity“ (LOH), DNA-Konfigurationen, die auf eine HRD bei BRCA1/2-Wildtyp-Karzinomen hindeuten. LOH beschreibt in diesem Kontext die Mutation eines heterozygoten Allels, welche zum Verlust eines Tumorsuppressors führt und somit die Tumorentstehung begünstigt. Insbesondere diese Gruppe zeigte ein ähnlich gutes Ansprechen auf PARP-Inhibition wie die Gruppe mit BRCA1- oder BRCA2-Mutation. Dies lässt vermuten, dass, neben dem BRCA-Status, weitere Faktoren eine HRD verursachen und somit ein Ansprechen auf PARP-Inhibition vermitteln können (Swisher EM et al. 2017) (Musella A et al. 2018) (Tomao F et al. 2019).

Zum einen ist die Bestimmung des BRCA-Status beim Ovarialkarzinom Grundlage für bestimmte therapeutische Maßnahmen. Zum anderen lässt sich anhand des BRCA1/2-Mutationsstatus aber auch das Lebenszeitrisiko für diverse Karzinome abschätzen, sodass in gewissen Fällen primärprophylaktische Maßnahmen ergriffen werden können. BRCA stellt zwischenzeitlich für das high-grade seröse Ovarialkarzinom einen wichtigen, in den Leitlinien verankerten Biomarker dar, welcher für die Initiation einer individualisierten Therapie genutzt wird. Konsistent zeigt sich unter Therapie mit PARP-Inhibitoren eine verbesserte Prognose bei BRCA1/2-Mutation. Das Kollektiv der Patientinnen, welche von einer Therapie mit PARP-

Inhibitoren profitieren, scheint jedoch noch deutlich größer zu sein. Ausschlaggebend ist die HRD, welche auch von weiteren Faktoren beeinflusst wird. Mit der Bestimmung der LOH und dem davon abhängigen Ansprechen auf eine PARP-Inhibitor-Therapie, konnte ein weiterer Ansatz zur Selektion von Patientinnen aufgezeigt werden, welche von einer Therapie mit PARP-Inhibitoren profitieren. Die Wirksamkeit und die konsekutive Verbesserung der Prognose ist jedoch nicht nur auf das seröse high-grade Ovarialkarzinom beschränkt. Klinische Studien bestätigten den Vorteil der Therapie mit PARP-Inhibitoren bei jeglichen Subtypen mit HRD, wobei hier auch die Wirksamkeit in der First-line-Therapie gezeigt werden konnte (Mirza MR et al. 2020).

Zum aktuellen Zeitpunkt lässt sich durch die IHC eine BRCA1- oder BRCA2-Genmutation nur unzureichend abbilden, sodass hierfür weiterhin Genanalysen erforderlich sind.

Sollte es in Zukunft möglich sein den BRCA1- und BRCA2-Mutationsstatus immunhistochemisch zu ermitteln, könnte hierdurch effizient ein Teil der Patientinnen selektiert werden, welche für eine Therapie mit PARP-Inhibitoren qualifizieren.

4.6.6 EP3

Das Verteilungsmuster der EP3-Expression zeigte im Hinblick auf die histologischen Subtypen keine signifikante Abhängigkeit. Weiter wurde eine Korrelation des IRS mit dem FIGO-Stadium und dem Grading analysiert. Für das FIGO-Stadium zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang. Interessanterweise zeichnete sich eine inverse Korrelation des EP3-IRS mit dem Grading ab, welche jedoch ebenfalls keine statistische Signifikanz erreichte. EP3 wurde bisher noch wenig im Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom analysiert. *Czogalla et al.* beschrieben eine signifikante Unterscheidung der subgruppenbezogenen immunreaktiven Scores, mit höchster Expression beim klarzelligen Ovarialkarzinom (Czogalla B. et al. 2019). Zwar lagen alle klarzelligen Karzinome bei dieser Arbeit über dem Cut-Off und wurden als EP3-positiv klassifiziert, die individuellen IRS unterschieden sich jedoch nicht signifikant vom Gesamtkollektiv. Eine Korrelation der Expression mit fortschreitender Karzinomerkrankung wurde am Ovarialkarzinom noch nicht nachgewiesen. Im Mausmodell des Kolonkarzinoms zeigte sich jedoch eine Herabregulierung der EP3-Expression mit fortschreitendem Tumorleiden. Daraus schlossen *Shoji et al.*, dass EP3 als Gegenspieler der übrigen proliferationsfördernden Prostaglandin-E2-Rezeptoren (PGE2-Rezeptoren) fungiert (Shoji Y et al. 2004). Folgt man dieser These, ist die Tendenz einer inversen Korrelation des IRS mit dem Grading nachvollziehbar.

In den Überlebensanalysen konnte kein signifikanter Einfluss der EP3-Expression nachgewiesen werden. Dies steht in Einklang mit den bisherigen Literaturdaten. Lediglich in

bestimmten Konstellationen wurde eine prognostische Aussagekraft konstatiert (Czogalla B. et al. 2019). Die COX2-Überexpression und die damit verbundene Erhöhung von PGE2 ist ein negativer prognostischer Marker bei ovariellen Karzinomen. Untersuchungen an anderen Tumorarten zeigten vielversprechende Ergebnisse bei der selektiven Inhibition von COX2 (Harris RE 2009). Im Zusammenhang damit wurde vor allem die Bedeutung von Prostaglandin-E2 als onkogener und entzündungsassoziiertes Mediator betont. Die PGE2-Rezeptoren EP1-4 weisen verschiedene Bindungsaffinitäten auf und initiieren zelluläre Vorgänge durch verschiedene Signalwege (Sun H et al. 2017).

Für den EP3-Rezeptor werden mehrere Eigenschaften beschrieben, welche möglicherweise durch die Expression der unterschiedlichen Isoformen zu erklären sind. Zum einen wurde die G-Protein-gekoppelte Steuerung der cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) - Konzentration durch Stimulation und Inhibition der Adenylylcyclase, zum anderen die Fähigkeit zur Stimulation der intrazellulären Kalzium-Mobilisation beschrieben. Die Auswirkungen auf Tumorgewebe wurden durch gezielte EP3-Depletion oder Inhibition in verschiedenen Ansätzen aufgezeichnet. Bei Mammakarzinomzellen zeigte sich kein Einfluss der EP3-Expression auf die Metastasierung (Ma X et al. 2006). Eine generell verminderte Expression wurde bei fortgeschrittenen malignen Hauttumoren sowie an Kolon- und Mammakarzinomen beobachtet (Lee JL et al. 2005) (Chang SH et al. 2003) (Shoji Y et al. 2004). Für die EP3-Suppression zeigten sich bei Tumoren im Xenograft-Mausmodell Wachstum, Metastasierung und Neoangiogenese vermindert (Ogawa Y et al. 2009). Dies steht im Widerspruch zu den Beobachtungen von *Shoji et al.*

Für die Inhibition der Rezeptoren EP1, EP2 und EP4 wurde in präklinischen Studien eine Tumorsuppression und eine wachstumshemmende Wirkung beschrieben (O'Callaghan G und Houston A 2015). Untersuchungen für die Modulation der einzelnen Isoformen spezifisch für das Ovarialkarzinom existieren bisher nicht. Ebenso sind auch die präklinischen Daten, wie voran beschrieben, widersprüchlich.

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und der aktuellen Literatur sind eindeutige Aussagen zum PGE2-Rezeptor EP3 kaum möglich. Die COX2/PGE2-Kaskade scheint, auch beim Ovarialkarzinom, einen wesentlichen Einfluss auf Prognose und Tumorigenese zu haben. Eine prognostische Aussage allein abhängig vom EP3-Status kann jedoch, bezogen auf das Gesamtkollektiv oder die Untergruppen, nach aktuellem Stand nicht postuliert werden. Dies könnte sich jedoch in Kombination mit anderen Parametern anders präsentieren. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte der EP3-Status in Kombination mit dem p53-Mutationsstatus eine Tendenz als prognostischer Faktor bei Typ-II-Karzinomen. Hierauf wird in Punkt 4.7.1 noch genauer eingegangen. Da die Funktion von EP3 in der Tumorigenese bzw. im -progress noch nicht

ausreichend geklärt ist, scheint eine Modulation dieses Rezeptors im Sinne einer zielgerichteten Therapie zum aktuellen Zeitpunkt wenig erfolgversprechend. Aussichtsreicher scheint die Blockade der gesamten COX2/PGE2-Kaskade. Dies erfordert jedoch auf das Ovarialkarzinom fokussierte Studien zur Abschätzung der Wirksamkeit und gegebenenfalls Festlegung der Selektionskriterien für profitierende Patientinnen.

4.6.7 Her2

Die Bestimmung des Her2-Status erfolgte nach Empfehlung mittels IHC und FISH. In der Auswertung der IHC zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang der Her2-Expression und dem histologischen Subtyp. Weiter wurde überprüft, ob eine Korrelation mit dem Grading oder dem FIGO-Stadium besteht, was sich ebenfalls nicht nachweisen ließ. Auffällig ist, dass in der IHC 44 Fälle (14,7%) als unklar und nur 3 Fälle (1%) als stark positiv klassifiziert wurden. Bei Beurteilung mittels FISH war ein statistisch signifikanter Zusammenhang der positiven, respektive amplifizierten Fälle mit dem histologischen Subtyp gegeben. Insgesamt konnte ein positiver Her2-Status bei 12 Fällen (4,1%) gezeigt werden (Gesamtkollektiv, n = 295). Alle Fälle mit Her2-Amplifikation waren G3-Karzinome (10 high-grade seröse, 2 undifferenzierte). Die diesbezüglichen Häufigkeiten unterscheiden sich stark in der Literatur und reichen von 2% bis 66%. Weiterhin wurde für Her2-positive Karzinome ein höheres Alter bei Diagnose, höheres Tumorstadium und schlechtere Differenzierung beschrieben (Teplinsky E und Muggia F 2014). Eine Her2-Amplifikation wurde bisher vor allem beim muzinösen Subtyp beschrieben (McCaughan H et al. 2012). Das mittlere Erkrankungsalter bei positivem Her2-Status betrug 64,5 Jahre (Standardabweichung 13,6) und lag damit nur wenig über dem des Gesamtkollektivs. 11 Her2-positive Fälle (91,7% aller Positiven) wurden in FIGO-Stadium III oder IV diagnostiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung von IHC und FISH. Alle in der FISH amplifizierten Fälle wurden in der IHC als mäßig oder stark exprimierend klassifiziert. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer vergleichender Studien überein, unterstreicht jedoch auch, dass eine alleinige immunhistochemische Bestimmung zur endgültigen Klassifikation insuffizient ist (Mayr D et al. 2006) (Pauletti G et al. 2000).

In den Überlebensanalysen zeigte sich weder für die Bestimmung durch IHC noch für die Bestimmung durch FISH ein signifikanter Unterschied des Überlebens im Hinblick auf den Her2-Status. Frühere Studien zeigten sich diesbezüglich diskrepant. Während mehrere Ansätze keinen Zusammenhang mit dem Outcome herstellen konnten, wurde in anderen eine schlechtere Prognose bei Her2-Überexpression bzw. -Amplifikation beschrieben (Verri E et al. 2005) (Lassus H et al. 2004). Die Daten mit der größten Aussagekraft stammen aus der

prospektiven randomisierten GERCOR-AGO-OVAR9-Studie, in welcher sich bei 320 ausgewerteten Fällen kein signifikanter Einfluss auf die Prognose zeigte (Tuefferd M et al. 2007).

Her2 ist Teil einer Familie von Rezeptortyrosinkinasen, welche unter anderem EGFR, Her3 und Her4 einschließt. Diese wiederum wurden als Modulatoren des PI3K/AKT-Signalweges beschrieben, welcher bei vermehrter Aktivierung eine onkogene Wirkung zeigte. An Mammakarzinomgewebe wurde postuliert, dass bei Überexpression bzw. Amplifikation von Her2 eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges stattfindet, welche zur Tumorentstehung bzw. zum -progress führt und durch den Her2-Antikörper Trastuzumab unterbunden werden kann (Ruiz-Saenz A et al. 2018).

Da die Therapie mit Trastuzumab beim Ovarialkarzinom keinen durchschlagenden Erfolg zeigte, scheinen unter Berücksichtigung der Ergebnisse am Mammakarzinom, weitere Mechanismen onkogen zu wirken oder Antikörperresistenzen zu vermitteln. Beispielsweise wurde die Überexpression von MUC4 (Mucin 4) in diversen Karzinomen beobachtet und an fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen mit einem Anteil von bis zu 88% angegeben (Chauhan SC et al. 2006). Für das membranassoziierte Glykoprotein wurde durch Antigenmaskierung eine Antikörperresistenz beschrieben (Fizman GL und Jasniss MA 2011). *Ponnusamy et al.* zeigten an MUC4 exprimierenden Zellen eine vermehrte Expression von Her2 und die Interaktion der beiden Proteine, welche in einer Aktivierung des Her2 vermittelten Signalweges mündet (Ponnusamy MP et al. 2011). In Gewebe von Mammakarzinomen wurde die Expressionsrate von MUC4 deutlich niedriger mit ca. 58% beschrieben, was die bessere Wirkung der Antikörpertherapie zu einem gewissen Grad erklären kann (Workman HC et al. 2009). Bei 20% der Ovarialkarzinome wurden zudem wesentliche intratumorale Heterogenitäten bezüglich der HER2-Expression beschrieben, was ebenfalls ein geringes Ansprechen auf die Antikörpertherapie erklären könnte (English DP et al. 2013) (Tuefferd M et al. 2007).

Fasst man die bisherigen Erkenntnisse zum Her2-Status an Ovarialkarzinomen zusammen, lässt sich konstatieren, dass dieser Biomarker sowohl im Hinblick auf die Genese als auch die Prognose eher einen geringen Stellenwert zu haben scheint. Die Methode der zunächst immunhistochemischen Bestimmung und Verifizierung durch FISH bei unklarem Status ist eine kostensparende, schnelle und zuverlässige Untersuchungsmethode. Falls jedoch der These der intratumoralen Heterogenität bezüglich des Her2-Status gefolgt wird, ist es möglich, dass die Bestimmung an nur einem Teil des Tumors nicht repräsentativ und somit insuffizient ist. Da sich das Outcome des Kollektivs, unterteilt nach Her2-Status, nicht wesentlich voneinander unterscheidet, bleibt fraglich, ob Her2 überhaupt einen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf

der Erkrankung ausübt. Diesbezüglich ist insbesondere die Aktivität der Downstream-Signalwege in zukünftigen Studien von Interesse. Zur Klärung der Frage, ob Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom von einer Antikörpertherapie mit Trastuzumab profitieren können, sind Studien erforderlich, welche den Stellenwert von Resistenzmechanismen evaluieren und diese in einer Kombinationstherapie mit den jeweiligen Antikörpern gezielt inhibieren. Möglich ist auch, dass durch die intratumorale Heterogenität nur ein Teil der Zellen durch die Therapie gegen Her2 adressiert wird und das Ovarialkarzinom für diesen Ansatz nicht geeignet ist. In diesem Sinne scheint es aussichtsreicher, Modulatoren der Downstream-Signalwege für eine zielgerichtete Therapie zu untersuchen.

4.6.8 Lef1 und β -Catenin

Lef1 zeigte nach definierten Kriterien eine erhöhte Expression in 9,7% der Fälle des Gesamtkollektivs. Dieses Verteilungsmuster wies einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit den histologischen Subtypen auf. Im Hinblick auf die histologischen Subtypen war eine Positivität am häufigsten bei endometrioider, seromuzinöser und low-grade seröser Differenzierung vorhanden. Hier ist jedoch zu bemerken, dass insgesamt nur 4 Fälle des seromuzinösen Karzinoms vorlagen. Die Ausprägung der Expression korrelierte weder mit dem Grading noch mit dem FIGO-Stadium.

Die Auswertung der Lokalisation von β -Catenin in den Tumorzellen zeigte ein kernpositives Ergebnis in 6,0% des Gesamtkollektivs, wobei die nukleäre Expression von β -Catenin Ausdruck des aktivierten Wnt-Signalweges ist. Hierbei bestand ebenfalls ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit den histologischen Subtypen. Die Differenzierung bei nukleärer Expression war am häufigsten endometrioid und seromuzinös. Wobei auch hier die geringe Fallzahl des letzteren Typen zu beachten ist.

Betrachtete man die gemeinsame Überexpression von Lef1 mit nukleärer Reaktion für β -Catenin, ergaben sich 10 Fälle (3,4% des Gesamtkollektivs) mit dieser Konfiguration. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang mit den histologischen Typen. Am häufigsten war diese Konfiguration bei endometrioider Differenzierung zu beobachten.

Insbesondere für β -Catenin ist eine vermehrte Expression beim endometrioiden Subtyp beschrieben, was sich mit den am Kollektiv erhobenen Daten deckt (Arend RC et al. 2013). Für die Expression von Lef1 in Gewebe von Ovarialkarzinomen existieren bisher kaum valide Daten. In den Überlebensanalysen bestand weder für die alleinige noch für die gemeinsame Klassifizierung nach β -Catenin- und Lef1-Status, ein Unterschied im Gesamtüberleben. In früheren Untersuchungen zeigte sich insbesondere beim endometrioiden und klarzelligen Subtyp eine schlechtere Prognose bei nukleärer β -Catenin-Expression (Heckl M. et al 2018).

Lef1 und β -Catenin sind essentielle Bestandteile des Wnt-Signalweges. Die Zielgene lassen sich im Wesentlichen in zwei Gruppen teilen: Zum einen diejenigen, welche stammzellähnliche Eigenschaften und Reize zur Proliferation vermitteln, zum anderen die, welche die Dissemination und Metastasierung vorantreiben. Physiologischerweise ist die Konzentration von β -Catenin im Zytoplasma relativ gering, da β -Catenin einem ständigen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System unterliegt. Zur Aktivierung des Signalweges kommt es durch Substratbindung der Oberflächenrezeptoren, welche die Degradation von β -Catenin hemmen, zum Anstieg der Zytoplasmakonzentration. Die rezeptorgesteuerte Aktivierung wird über die Bindung des Wnt-Liganden an den Rezeptor Frizzled und einen Co-Rezeptor der LRP-Familie (Low-density lipoprotein receptor-related protein) vermittelt. β -Catenin bildet im Zellkern einen Komplex mit den Transkriptionsfaktoren (Proteine der Lef-Familie) und Coaktivatoren, was die Transkription der Zielgene initiiert (Arend RC et al. 2013).

Analysen von Ovarialkarzinomen führten zur Annahme, dass stammzellähnliche Tumorzellen den Ausgangspunkt der Neoplasien bilden. Diese Zelllinien zeichnen Eigenschaften wie Tumorigenität, Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Therapieresistenz aus. Der typische klinische Verlauf der Erkrankung wurde als Bestärkung dieses Modells interpretiert. So zeigt sich bei Ovarialkarzinomen oft ein gutes Ansprechen auf die primäre Chemotherapie. Jedoch kommt es häufig zum Rezidiv, welches dem primären Tumor in seinen Eigenschaften ähnelt. Es wurde postuliert, dass ein geringer Teil an resistenten Tumorzellen die Therapie überlebt und das erneute Wachstum initiiert. Mehrere Transkriptionsprodukte des Wnt/ β -Catenin-Signalweges wurden beim Ovarialkarzinom als Vermittler dieser Stammzeleigenschaften beschrieben (Kryczek I et al. 2011) (Shah MM und Landen CN 2014). Ein derartiger Effekt zeigte sich auch an hämatopoetischen Stammzellen (Yu S et al. 2016).

Weiterhin wurde für den Wnt-Signalweg eine maßgebliche Bedeutung im reversiblen Prozess der epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT) beschrieben. Während dieses Prozesses werden interzelluläre Adhäsionen gelockert und die Zellen ändern ihre Polarität, sodass epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften erhalten. Dies bedeutet eine erhöhte Zellmotilität und Invasivität (Sun J et al. 2017). Im Modell für die intraperitoneale Metastasierung wurde gezeigt, dass es durch die Blockade von Lymphbahnen und Freisetzung vasoaktiver Substanzen zur Bildung von Aszites kommt. Die Zellen durchlaufen eine EMT, schilfern vom Tumor ab und bilden in der flüssigen Phase multizelluläre Aggregate, sogenannte Spherioide. Diese lagern sich an das Peritoneum an, die EMT wird rückwärts durchlaufen und es entstehen metastatische Tumorherde (Teeuwssen M und Fodde R 2019).

Bei diversen malignen Neoplasien wurde eine Tumorentstehung durch unkontrollierte Wnt-Aktivierung beschrieben. Ein Beispiel hierfür ist der APC-Defekt beim FAP- (familiäre

adenomatöse Polyposis) assoziierten Kolonkarzinom, bei welchem der Defekt des APC-Gens den Funktionsverlust des Degradationskomplexes für β -Catenin vermittelt (Morin PJ et al 1997).

Für das Ovarialkarzinom wurden ebenfalls mehrere Wege der Wnt-Aktivierung beschrieben. Insbesondere die intrazelluläre Akkumulation von β -Catenin führt zum vermehrten Vorkommen im Zellkern und zur Transkription der Zielgene. Für die Initiierung der Transkription benötigt β -Catenin immer den Partner Lef1. Beim endometrioiden Subtyp erfolgte der Nachweis gehäufter Mutationen des β -Catenin codierenden Gens CTNNB1. Zum einen wurden aktivierende Mutationen beobachtet, welche zur vermehrten Expression führen; zum anderen wurden Missense-Mutationen mit alteriertem N-Terminus des Proteins beschrieben. Im Falle eines veränderten N-Terminus wurde postuliert, dass die Markierung zur Einleitung der Degradation gestört ist. Weiter wurden, analog zum Kolonkarzinom, Mutationen für die Gene der Degradationsproteine nachgewiesen (Nguyen VHL et al. 2019). Überdies wurde eine durch andere Signalwege vermittelte Inhibition der Degradation von β -Catenin beschrieben. Besonders nennenswert ist in dem Kontext dieser Arbeit die Inaktivierung von GSK3 β , einem Teil des Degradationskomplexes, durch den PI3K-Signalweg (Arend RC et al. 2013). Im Zytoskelett ist β -Catenin an E-Cadherin gebunden und stabilisiert so die Form der Zelle. Beim Vorgang der Metastasierung binden Integrine der Tumorzelloberfläche interstitielles Kollagen des Peritoneums. Hierbei wurde eine Internalisierung von E-Cadherin und eine Dissoziation von β -Catenin beschrieben. Während dieses Prozesses wurde ebenfalls ein erhöhtes Vorkommen nukleären β -Catenins beobachtet (Burkhalter RJ et al. 2011).

Im Kontrast zu β -Catenin wurde für Lef1 eine vom übrigen Signalweg unabhängig eingeleitete EMT beschrieben. Dies zeigte sich an Tumorzellen mit mutiertem Lef1 ohne Bindungsstellen für Reaktionspartner (Kobayashi W und Ozawa M 2013). Die Überexpression von Lef1 wurde an diversen Karzinomen beschrieben und geht mit vermehrter Invasion, Metastasierung und Vermittlung von stammzellähnlichen Eigenschaften einher (Hovanes K et al 2001) (Huang C und Qin D 2010) (Reya T und Clevers H 2005). Als Downstream-Faktor im Wnt-Signalweg konnte durch Inhibition von Lef1 eine verminderte Invasivität von Glioblastomzellen beobachtet werden (Liu Y et al. 2012). Auch an Gewebe von Kolonkarzinomen zeigte sich ein analoger Effekt (Wang WJ et al. 2013). Dies unterstreicht die Funktion als Schlüsselfaktor in der Transkription und damit ebenfalls im Tumorprogress.

Ein weiterer Mechanismus der Überaktivierung ist die vermehrte rezeptorvermittelte Signaltransduktion. Sowohl eine Überexpression von Rezeptoren der Frizzled- als auch der LRP-Familie wurde im Zusammenhang mit Wnt-Aktivierung und schlechterem Outcome bei Ovarialkarzinomen beschrieben (Badiglian FL et al. 2009). Als mögliche Ursache der

vermehrten LRP-Expression wurden zelluläre Prozesse bei der Interaktion der Tumorzellintegrine mit Kollagenen bei der Metastasierung genannt (Arend RC et al. 2013).

Betrachtet man den Wnt-Signalweg im Ganzen, zeigt sich eine sehr komplexe Steuerung der Transkription von Zielgenen, welche onkogene Eigenschaften vermitteln. Zweifelsfrei sind die Komponenten β -Catenin und Lef1 zentrale Bestandteile. Immunhistochemisch zeigt sich eine Aktivierung entweder durch Überexpression von Lef1 oder durch ein vermehrtes Vorkommen von nukleärem β -Catenin. Obwohl CTNNB1-Mutationen hauptsächlich bei endometrioider Differenzierung vorkommen, zeigen auch andere Subtypen eine Aktivierung des Wnt-Signalweges (Arend RC et al. 2013). Die aktuelle Studienlage legt nahe, dass die beiden klinischen Hauptprobleme in der Therapie des Ovarialkarzinoms, nämlich die hohe Rezidivrate und die Disseminierung des Tumors, maßgeblich durch den Wnt-Signalweg beeinflusst werden. Zwar sind die verschiedenen Mechanismen der β -Catenin-Akkumulation ausgiebig beschrieben, die Adressierung der jeweiligen Mechanismen scheint jedoch im Hinblick auf eine zielgerichtete Therapie aufgrund der Vielfalt wenig erfolgversprechend. Fraglich bleibt auch, ob die Blockade der Oberflächenrezeptoren eine effektive Wnt-Signalweg-Inhibierung vermitteln kann, da nur bei einem Teil der Ovarialkarzinome eine rezeptorvermittelte Überaktivität vorhanden ist. Lef1 wird obligat zur Initiierung der Transkription durch den Wnt-Signalwege benötigt. Weiterhin ist eine unabhängige onkogene Aktivität bei Mutation beschrieben. Lef1 ist deshalb ein möglicher Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie, der auch die aktivierenden Upstream-Elemente beeinflussen kann. Durch die Elimination dieses Faktors kann in der Theorie die Wnt-gesteuerte Transkription inhibiert werden. Als Folge wäre von einem Verlust stammzellähnlicher Eigenschaften der therapierefraktären Karzinomzellen auszugehen, was wiederum bedeuten würde, dass diese durch eine Chemotherapie wahrscheinlicher eliminiert werden könnten. Auch die intraperitoneale Metastasierung könnte möglicherweise durch Inhibition der EMT unterdrückt werden. Die Lef1-Inhibition scheint im theoretischen Gesamtkontext als Teil einer Kombinationstherapie mit einer herkömmlichen Chemotherapie sinnvoll. In vitro konnte durch gezielte Lef1-Inhibition an diversen Tumorzellreihen eine verminderte Proliferation und eine gesteigerte Apoptoserate beschrieben werden (Gandhirajan RK et al. 2010). Studien an Zellen von Ovarialkarzinomen zeigten eine vielversprechende zytotoxische Wirkung des Antihelminthikums Niclosamid. Zum einen verändert diese Substanz den bioenergetischen Stoffwechsel ungünstig für Tumorzellen, zum anderen werden diverse Signalwege inhibiert. Einer dieser supprimierten Wege ist der Wnt-Signalweg. Es zeigte sich nicht nur eine zytotoxische Wirkung an Zellen aus dem Haupttumor, sondern auch an chemoresistenten Zellverbänden (tumoröse Spheroide), welche aus Aszitespunktaten isoliert wurden. Weitere Studien werden jedoch benötigt, um den genauen Wirkmechanismus zu identifizieren und den Wirkstoff in vivo zu testen (Walters

Haygood CL et al. 2015) (Shangguan F et al. 2020). Unklar ist weiterhin, inwiefern dieser antitumoröse Effekt auf die Modulation des Wnt-Signalweges zurückzuführen ist. Auch in nicht neoplastischem Gewebe ist der Wnt-Signalweg an der Zellerhaltung und -homöostase maßgeblich beteiligt. Aus diesem Grund ist es notwendig, systemische Nebenwirkungen der Modulation dieses Signalweges zu analysieren.

Die immunhistochemische Bestimmung des β -Catenin- und Lef1-Status scheint aktuell kein wesentlicher prognostischer Marker im Hinblick auf das Gesamtüberleben zu sein. In gewissen Konstellationen könnte die Prognose jedoch hiervon beeinflusst werden. Die Aussagekraft zu Metastasierung und Rezidiv ist aktuell ebenfalls noch nicht ausreichend geklärt. Bei Einführung wirksamer Inhibitoren mit den erhofften Auswirkungen könnte sich dies jedoch ändern und sich die Prognose unter Therapie verbessern.

4.6.9 p53

Bei den Analysen der p53-Expression zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang mit den histologischen Subtypen, dem Grading und dem FIGO-Stadium. Hier wurde gezeigt, dass ein aberrantes Expressionsmuster von p53 mit einem höheren FIGO-Stadium und einer schlechten Differenzierung, sprich G3, einherging. 87,9% aller serösen high-grade Karzinome und 85,3% aller Typ-II-Ovarialkarzinome zeigten immunhistochemisch eine vom wildtyp abweichende Expression für p53. Dieser Anteil war innerhalb der Subgruppe der Typ-I-Karzinome mit 51,5% deutlich geringer. 10 (41,7%) von 24 low-grade serösen Karzinomen zeigten ebenfalls ein mutationstypisches Expressionsmuster. Die Ergebnisse für high-grade seröse und Typ-II-Karzinome im Allgemeinen sind im Einklang mit der Literatur und wurden bisweilen mit noch höheren Anteilen beschrieben. Für die Klasse der Typ-II-Ovarialkarzinome wurde ebenfalls ein invasiveres und aggressiveres Wachstumsmuster beschrieben, was sich auch in den Ergebnissen am Kollektiv dieser Arbeit widerspiegelt. Der Anteil an p53-positiven low-grade Karzinomen liegt jedoch deutlich über den in der Vergangenheit publizierten Werten (Kurman RJ und Shih IeM 2016) (Kurman RJ et al. 2014). Ein möglicher Grund für diese Abweichung ist die eingeschränkte Beurteilbarkeit des Expressionsmusters oder aber die erschwerte Zuordnung zum histologischen Subtyp bei Auswertung von TMAs. Weiterhin ist eine Abweichung im Rahmen der angepassten Kriterien für ein mutationstypisches Expressionsmuster (s. oben, Punkt 2.5.1.8) denkbar. Durch das Herabsetzen des Cut-Offs ist es möglich, dass Tumorproben als falsch-positiv selektiert wurden. Diese Anpassung des Cut-Offs war den technischen Gegebenheiten geschuldet und stellt eine Limitation in der Beurteilbarkeit des Teilergebnisses dar.

Verglichen mit der Wildtyp-Expression konnte für ein aberrantes p53-Expressionsmuster kein signifikanter Unterschied im Überleben gezeigt werden. Langfristig wurde jedoch eine Tendenz des schlechteren Überlebens bei mutationstypischer Expression von p53 beobachtet. Auch frühere Untersuchungen lieferten kontroverse Ergebnisse bezüglich der prognostischen Aussagekraft des Biomarkers p53 (Brachova P et al. 2014) (Khandakar B et al. 2014).

p53 hat multiple Funktionen in gesunden Zellen. Das Protein reguliert durch seine Bindung an DNA die Transkription hunderter Gene, initiiert Reparaturmechanismen bei DNA-Schäden, führt zum Arrest des Zellzyklus und leitet bei schwerwiegenden Schäden die Apoptose ein (Cole AJ et al. 2016). Aufgrund dieser Eigenschaften stellt p53 einen der wichtigsten Tumorsuppressoren des Menschen dar. Die somatische Mutation des p53-Gens wurde als Schlüsselprozess in der Entstehung des high-grade serösen Ovarialkarzinoms postuliert (Chien J et al. 2015).

Mehrere Studien evaluierten, ob die IHC für p53 eine zuverlässige Aussage zum Mutationsstatus zulässt. Es zeigte sich, dass bei abnormer p53-Expression mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit von einer p53-Mutation auszugehen ist. Jedoch wurden auch Fälle beschrieben, welche bei Wildtyp-Expressionsmuster eine Mutation aufwiesen. Insbesondere bei Grenzfällen nahe des Cut-Offs wurde eine gewisse Unsicherheit beschrieben. Aus diesem Grund wurde bei fraglichem Expressionsmuster oder histomorphologischen Anzeichen eines high-grade Karzinoms mit Wildtyp-Expression eine ergänzende Gensequenzierung empfohlen (Köbel M et al 2016) (Cole AJ et al. 2016).

Sequenzanalysen konnten eine Vielzahl an genomischen Alterationen beschreiben. Hiervon führen einige zum Funktions- und Expressionsverlust des Proteins. Andere führen durch Missense-Mutationen zu strukturell alteriertem p53. Durch den Wegfall des physiologischen negativen Feedbacks und verminderter Degradation des mutierten, strukturell veränderten p53 (Mp53) kommt es hierbei zur intrazellulären Akkumulierung des funktionslosen Proteins. Weiter wurde bei Missense-Mutationen die Bildung von Heterotetrameren von Mp53 und Wildtyp-p53 (Wtp53) beobachtet, was zum Funktionsverlust des noch vorhandenen Wtp53 führt. Somit ist in diesem Fall die tumorsuppressive Wirkung von p53 zum größten Teil aufgehoben. Neben diesen Mutationen, welche die Aktivität des Proteins herabsetzen, wurden Missense-Mutationen an anderen Stellen des codierenden Gens, so genannte Hot-Spot-Mutationen, beschrieben. Die Produkte dieser mutierten Gene zeigten eine onkogene Wirkung. Es wurde beobachtet, dass diese eine vermehrte Proliferation, Metastasierung und Chemoresistenz vermitteln. Im Mausmodell zeigte sich bei Hot-Spot-Mutation mit Expression von Mp53 eine höhere Tumorratenrate als bei p53-Expressionsverlust (Liu G et al. 2000) (Zhang Y et al. 2016). Am Untersuchungskollektiv dieser Arbeit zeigte sich diese Tendenz ebenfalls, wenn

man das Überleben im Hinblick auf p53-Überexpression und p53-Expressionsverlust analysierte. Statistische Signifikanz wurde nicht erreicht.

Expressionsanalysen an Zellreihen mit Expression von Mp53 wiesen diverse Unterschiede im Vergleich mit Wtp53 Zellen auf. Bei Vorhandensein einer Hot-Spot-Mutation wurde eine Überexpression diverser onkogener Proteine beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit ist besonders der wesentliche Einfluss auf die erhöhte Expression von β -Catenin erwähnenswert. Weiter zeigte sich bei Hot-Spot-Mutationen ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapeutika als bei den übrigen Nicht-Hot-Spot-Mutationen. Das erhöhte onkogene Potential bei p53-Mutation ist wahrscheinlich gemischter Genese. Neben dem Funktionsverlust als Tumorsuppressor scheint auch die Modulation onkogener Signalwege von Bedeutung zu sein. Diese Aktivierung wurde zum einen auf die direkte Interaktion von Mp53 mit Proteinen der Signalwege, zum anderen auf die Initiierung der Transkription der Zielgene dieser zurückgeführt (Brachova P et al. 2014).

p53 stellt einen zentralen humanen Tumorsuppressor dar. Unterstrichen wird dies von der immens hohen Mutationsrate auch beim Ovarialkarzinom. Einerseits ist der Verlust des tumorsupprimierenden Effekts von Bedeutung in der Tumorigenese, andererseits wird bei gewissen Mutationen ein rapider Tumorprogress durch Mp53 vermittelt. Eine p53-Mutation kann in den meisten Fällen zuverlässig durch IHC bestimmt werden, lediglich bei fraglichen Ergebnissen scheint selten eine Gensequenzierung erforderlich. Aufgrund der verschiedenartigen Mutationen konnte p53 bei alleiniger Beurteilung nicht als prognostischer Marker identifiziert werden. Im Hinblick auf die Differenzierung zwischen high-grade und low-grade serösen Karzinomen kann die IHC für p53 aufgrund des unterschiedlichen Expressionsmusters als wegweisender Faktor verwendet werden.

Insbesondere in den ersten 2 Jahren nach Diagnose zeigte sich kein wesentlicher Unterschied im Überleben der p53-wildtyp und p53-alterierten Fälle. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Typ-II-Karzinome allgemein häufig chemosensibel sind und deshalb auf die Primärtherapie in ähnlichem Maß, wie Typ-I-Karzinome, ansprechen. Rezidive der Typ-II-Karzinome weisen häufig Chemoresistenzen auf. Diese sind, wie bereits erwähnt, häufig im Rahmen von p53-Mutationen zu vermuten, was sich wiederum in einem schlechteren langfristigen Überleben äußert (Kurman RJ und Shih leM 2016).

In chemoresistenten Zellreihen konnte eine vermehrte Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges beobachtet werden. Durch die Inhibition dieses Signalweges zeigte sich bei Wtp53-Zellen, im Gegensatz zu Mp53-Zellen, eine erhöhte Chemosensibilität (Kobayashi N et al. 2013). Dies unterstützt die These, dass Mp53 sowohl Signalwege beeinflussen als auch die signalwegunabhängige Transkription initiieren kann.

Diese Ergebnisse implizieren, dass eine Wiederherstellung der p53-Wildtyp-Funktion einen möglichen Ansatz für eine zielgerichtete Therapie darstellt. PRIMA1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) konnte in Zellen mit Mp53 eine Antitumorwirkung durch direkte Bindung an Mp53 und Induktion der Apoptose etablieren. Aus diesem Grund ging man davon aus, dass PRIMA1 abhängig von Mp53 sein muss und eine Wildtyp-Funktion reetabliert. In klinischen Studien konnte bei Patienten mit Prostatakarzinom eine Aktivierung des p53-Weges mit Induktion der Apoptose und Zellzyklusarrest unter Therapie mit PRIMA1 gezeigt werden. Zudem wurde eine vermehrte Expression von p53 regulierten Proteinen beschrieben. Inwiefern andere zelluläre Prozesse durch das Therapeutikum beeinflusst werden, ist jedoch nicht geklärt, da sich ähnliche Effekte auch bei Wtp53-Status zeigten (Lehmann S et al. 2012) (Duffy MJ et al. 2014). Andere zielgerichtete Therapieansätze lieferten bisher ernüchternde Ergebnisse. Daten klinischer Studien zur Evaluation der p53-abhängigen Therapien wurden für das Ovarialkarzinom bisher nicht publiziert. Um die einzelnen p53-Mutationen gezielt zu therapieren, müssten die hierdurch induzierten zellulären Prozesse genauer nachvollzogen werden. Dies würde auch die Selektionskriterien für qualifizierende Patientinnen weiter klären. Die Aussagekraft als prognostischer Marker mittels immunhistochemischer Bestimmung des p53-Status scheint nach aktueller Datenlage eingeschränkt. Zur Differenzierung zwischen high-grade serösen und low-grade serösen bzw. Typ-II- und Typ-I-Karzinomen stellt die IHC für p53 ein praktisches und kostengünstiges Mittel zur sichereren Differenzierung dar.

4.6.10 p16

Im Hinblick auf eine aberrante p16 Expression zeigte sich am Untersuchungskollektiv ein signifikanter Zusammenhang mit den histologischen Subtypen. Unter Berücksichtigung der Fallzahlen war ein positiver p16-Status am häufigsten beim Subtyp des high-grade serösen (49,1% aller serösen high-grade Karzinome, n-gesamt = 222) und des undifferenzierten Karzinoms (50% aller undifferenzierten Karzinome, n-gesamt = 8). Diese beiden Subtypen sind Bestandteil der Klasse der Typ-II-Karzinome, sodass es nicht verwunderlich ist, dass die Signifikanz bei Unterscheidung in das 2-Klassen-System noch höher ausfiel. Ebenfalls zeigte sich eine Assoziation zwischen dem Grading und dem p16-Status. Je höher das Grading war, desto höher war auch der Anteil an p16-positiven Tumoren. Im Hinblick auf das FIGO-Stadium zeigte sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang. Die Abhängigkeit vom histologischen Subtyp konnte auch durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden. Diese Untersuchungen beschrieben das häufigste Vorkommen von p16-Alterationen bei high-grade serösen und undifferenzierten Ovarialkarzinomen mit jedoch noch größerem Anteil von bis zu 80%. Untersuchungen an den übrigen Subkategorien der epithelialen Ovarialkarzinome wurden nur an geringen Fallzahlen durchgeführt. Diese sind deshalb nur mit Einschränkungen zum

Vergleich geeignet und erklären die Abweichungen am vorliegenden Kollektiv von den Literaturdaten (O'Neill CJ et al 2007) (Phillips V et al. 2009).

Ein Zusammenhang zwischen dem p16-Status und dem Überleben konnte bei dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich aber ein Trend zu einem schlechteren Outcome bei p16-Positivität in der Subgruppe der Typ-I-Karzinome. Dies deckt sich mit den publizierten Daten von *Rambau et al.*, welche in der Subgruppe der Typ-I-Karzinome, mit Ausnahme der muzinösen Differenzierung, ein schlechteres Gesamtüberleben bei p16-positiven Fällen aufzeichneten (Rambau PF et al. 2018).

p16 ist ein Checkpoint-Regulator des Zellzyklus am Übergang der G1- zur S-Phase, indem es den CDK4/6-Komplex inhibiert und so einen Arrest des Zellzyklus initiieren kann. Normale Zellen weisen ein heterogenes Verteilungsmuster von p16 auf; das Protein ist hier sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus nachweisbar. Es bestehen zwei Möglichkeiten einer alterierten Expression: der komplette Expressionsverlust oder das so genannte block-staining.

Für den Verlust der Expression wurden diverse Mechanismen beschrieben; zu nennen sind hier Genmutationen, Promoter-Hypermethylation und Suppression der Translation. Der Expressionsverlust wird jedoch nur als selten beobachtetes Merkmal bei Ovarialkarzinomen beschrieben (Merlo A et al. 1995).

Häufiger ist das p16-block-staining zu beobachten. Dieses Phänomen wurde als kompensatorische Überexpression zur Inhibierung eines alterierten Übergangs der Zelle von der G1- zur S-Phase beschrieben. Dieses block-staining ist typischerweise bei HPV-assoziierten (humane Papillomviren) Neoplasien der Cervix uteri vorhanden, da die HP-Viren die G1/S-Transition begünstigen. Die IHC gibt in diesem Fall Auskunft über die kompensatorische Akkumulation von p16 (Klaes R et al. 2001). Zwar wurde für das Ovarialkarzinom kein Zusammenhang mit HPV beschrieben, jedoch konnten andere Alterationen, welche den Übergang der G1- in die S-Phase fördern, beschrieben werden (The Cancer Genome Atlas Research Network 2012).

Rambau et al. konnten ein schlechteres Outcome bei low-grade Ovarialkarzinomen mit p16-Expressionsverlust beschreiben (Rambau PF et al. 2018). Im Rahmen dieser Dissertation war die Anzahl an Fällen mit p16-Expressionsverlust in der Subgruppe der low-grade Karzinome zu gering, um diesbezüglich eine valide Aussage treffen zu können.

In Vitro konnte bei Ovarialkarzinomzellen mit fehlender p16-Expression ein Ansprechen auf CDK4-Inhibition nachgewiesen werden. Dies wäre ein möglicher Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie bei Tumoren mit p16-Expressionsverlust (Konecny GE et al. 2011). Klinische Studien sind hierzu bislang jedoch nicht publiziert.

Bei Tumoren mit block-staining für p16 scheint es schwierig, einen zielgerichteten Therapieansatz zu entwickeln. Die Überexpression ist Ausdruck des unkontrollierten Übergangs des Zellzyklus aus der G1- in die S-Phase, welcher durch p16 nicht unterdrückt werden kann. Somit scheiden CDK4-Inhibitoren aus, da die p16-Überexpression bereits eine übermäßige intrinsische CDK4/6-Inhibition vermittelt. Um diese Fälle zu adressieren, sind genaue Analysen der zugrundeliegenden Mechanismen erforderlich. Diese existieren aktuell nur unzureichend für Zellreihen des Ovarialkarzinoms.

Die Tendenz für ein schlechteres Outcome in der Subgruppe der Typ-I-Karzinome könnte jedoch als prognostischer Faktor von klinischer Relevanz sein. Bei diesen wenig malignen Tumoren ist es in niedrigem Tumorstadium möglich, eine weniger aggressive Therapie einzuleiten. Sollten weitere Studien bestätigen, dass bei p16-block-staining in dieser Klasse eine schlechtere Prognose besteht, ist gegebenenfalls bereits in niedrigem Tumorstadium eine maximale Therapie einzuleiten.

4.7 Biomarkerkombinationen als prognostischer Faktor

4.7.1 p53 und EP3 Co-Expression

Betrachtete man den Expressionsstatus von p53 und EP3, so zeigte sich sowohl im Log-Rank-Test der Kaplan-Meier-Kurven als auch im Cox-Modell ein Trend für ein schlechteres Outcome bei p53+/EP3+ Konstellation. Jedoch wurde weder am Gesamtkollektiv noch in den Subgruppen das statistische Signifikanzniveau erreicht. Es werden weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen benötigt, um nachzuvollziehen, ob es sich bei dem beobachteten Trend tatsächlich um ein prognostisch relevantes Phänomen handelt. In der Literatur ist dies bislang nicht beschrieben.

4.7.2 p53 und p16 Co-Alteration bei Typ-I-Karzinomen

In der Subgruppe der Typ-I-Ovarialkarzinome unterschieden sich die Überlebenskurven der Kategorien doppelt positiv und nicht doppelt positiv mit statistischer Signifikanz. Es zeigte sich eine schlechtere Prognose bei Status p53+/p16+. Diese Tendenz zeigte sich ebenfalls im Cox-Modell; das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht.

Bewertet man dieses Ergebnis, muss zunächst die Zuteilung der Subtypen nochmals beleuchtet werden. 23 der 64 Typ-I-Karzinome wurden als low-grade seröse Karzinome klassifiziert. Diese 23 low-grade serösen Karzinome wiesen folgende p53/p16-Status auf: 13 p53-/p16-, 4 p53+/p16-, 1 p53-/p16+, 5 p53+/p16+. In der Literatur wurde für diesen Karzinomtyp in den meisten Fällen eine Wildtyp-Expression von p53 und p16 beschrieben. *Köbel et al.* zeigten, dass

sich die Unterscheidung von high-grade und low-grade serösen Karzinomen anhand histomorphologischer Kriterien gelegentlich schwierig gestalten kann. In diesen Fällen wird die Berücksichtigung der Immunhistochemie für p53 und p16 empfohlen. Bei 10 Fällen bestand eine Alteration von p53 und/oder p16, weshalb es möglich ist, dass diese Fälle nach histomorphologischen Aspekten falsch klassifiziert wurden und richtigerweise zu den high-grade serösen Karzinomen gezählt werden müssten (Kurman RJ et al. 2014) (Köbel M et al. 2014). High-grade seröse Karzinome werden als Typ-II-Ovarialkarzinome klassifiziert, welche, wie in Punkt 3.2.3 erwähnt, ein schlechteres Gesamtüberleben aufwiesen. Aus diesem Grund ist es denkbar, dass die statistische Auswertung des p53/p16-Status verfälscht ist und deshalb keine Schlüsse von klinischer Relevanz gezogen werden können.

Die Co-Alteration von p53 und p16 ist in der Subgruppe der Typ-I-Karzinome, insbesondere bei low-grade serösen Ovarialkarzinomen, sehr selten. Es bleibt fraglich, ob sich eine Aussage zur Prognose in Abhängigkeit des Expressionsstatus treffen lässt. Jedoch zeigt sich, dass die histomorphologische Einordnung in die Subgruppen nicht immer eindeutig ist und zusätzliche, immunhistochemische Untersuchungen die Kategorisierung erleichtern können. In diesem Kontext scheint die von Köbel *et al.* vorgeschlagene Vorgehensweise zur zusätzlichen Differenzierung der Subgruppen sinnvoll.

4.7.3 ER, PR und Her2 bei Typ-II-Karzinomen

In den Überlebensanalysen konnte bei Hormonrezeptor-negativen Typ-II-Karzinomen ein signifikant schlechteres Outcome beobachtet werden. Wie in Punkt 4.6.1 und 4.6.2 konnte in höherem Tumorstadium häufig ein Expressionsverlust beider Hormonrezeptoren beschrieben werden. Vergleichend betrachtet zeigte sich jedoch bei allen Rezeptorkonfigurationen ein ähnliches Verteilungsmuster der FIGO-Stadien. 85% aller Typ-II-Karzinome wurden im Stadium III oder IV diagnostiziert. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die Unterschiede im Überleben maßgeblich durch das Tumorstadium beeinflusst werden. Diese Daten stehen in Einklang mit den Daten der MALOVA-Studie, in welcher Høgdall *et al.* zeigten, dass die Expression von ER, PR und beiden Rezeptoren kombiniert mit einer verbesserten Prognose einhergeht (Høgdall EVS et al. 2007b).

Ein größerer Einfluss zeigte sich bei kombinierter Analyse von ER, PR und Her2. Dass eine statistisch signifikante Reduktion des Risikos für den Tod nur bei der Gruppe mit Status Hormonrezeptor+(HR+)/Her2- vorhanden war, liegt mit großer Wahrscheinlichkeit an den geringen Fallzahlen der übrigen Kombinationen. Jedoch zeigte sich auch bei diesen ein deutlicher Trend zu einer besseren Prognose. Es ist davon auszugehen, dass statistische Signifikanz bei größerer Fallzahl erreicht worden wäre. Ob ein triplenegativer Status beim

Ovarialkarzinom (auch triple negative epithelial ovarian cancer, TNEOC) von prognostischer Relevanz ist, wurde noch nicht endgültig geklärt. Die Datenlage hierzu ist kontrovers. *De Toledo et al.* konnten an einem Kollektiv mit 152 unselektierten Ovarialkarzinomen keine prognostischen Unterschiede in TNEOC und nicht-TNEOC Fällen nachweisen (De Toledo MCS et al. 2014). *Liu N et al.* hingegen beschrieben ein schlechteres Outcome bei TNEOC-Fällen und zeigten Parallelen zum triplenegativen Mammakarzinom auf. Bei triplenegativen Mammakarzinomen wurden diverse maligne Alterationen beobachtet. Gehäuft wurde die Aktivierung des tumorfördernden PI3K/AKT/mTor-Signalweges beschrieben (Liu N et al. 2011). Weiter wurden bei diesem Tumortyp auch Angiogenesefaktoren und Androgenrezeptoren vermehrt nachgewiesen (Schneeweiss A et al. 2019). Beim Ovarialkarzinom scheinen diese Faktoren den Tumorprogress und die Prognose ebenfalls zu beeinflussen (Ludwig AH et al. 2009). Diesbezügliche Studien im Zusammenhang mit TNEOC existieren jedoch bislang nicht.

Zusammenfassend kann man konstatieren, dass der triplenegative Rezeptorstatus beim Ovarialkarzinom in gewissen Konstellationen einen negativen prognostischen Marker darstellt. Am vorliegenden Kollektiv konnte dies bei Typ-II-Karzinomen beschrieben werden. Welche molekularen Veränderungen dem aggressiveren Verhalten zugrunde liegen, ist bislang unzureichend bekannt. Es scheinen gewisse Parallelen zum triplenegativen Mammakarzinom vorhanden zu sein. Bei dieser Tumorgruppe wurden multiple Alterationen verschiedener Signalwege beschrieben. Überträgt man diese Erkenntnisse auf die Gruppe des triplenegativen epithelialen Ovarialkarzinoms, so scheint die alleinige Bestimmung des ER-, PR- und Her2-Status nach konventionellen Methoden insuffizient, da diese keine Rückschlüsse auf molekularpathologische Veränderungen zulassen. Jedoch könnte die Identifikation der TNEOC-Subgruppe als Selektionskriterium für weiterführende Untersuchungen verwendet werden. Können in der Gruppe der TNEOC-Alterationen bestimmter Signalwege nachgewiesen werden, wären diese möglicher Angriffspunkt für eine individualisierte Therapie. In diesem Sinne sind Studien wünschenswert, welche die Signaltransduktion in TNEOC analysieren.

5 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist eine häufige Neoplasie, mit in den meisten Fällen schlechter langfristiger Prognose. Die hohe Mortalität begründet sich auf begrenzten Screeningmöglichkeiten, Diagnose in hohem Stadium, schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie, Rezidiven und frühzeitig peritonealer Metastasierung.

Durch die Identifikation der BRCA1- und BRCA2-Mutation sowie des Lynch-Syndroms als erbliche Risikofaktoren konnte eine Bevölkerungsgruppe mit erheblich größeren Inzidenzraten abgegrenzt werden. Diese Risikopatientinnen profitieren in der Primärprävention von einer genetischen Testung und Beratung zu prophylaktischen chirurgischen Eingriffen. Bei der restlichen Bevölkerung gestaltet sich die Prävention aufgrund mangelnder Screeningmarker schwierig. Die anatomische Lage der Ovarien führt dazu, dass raumfordernde Prozesse im Rahmen eines Ovarialkarzinoms häufig erst spät durch sekundäre Symptome klinisch apparent werden. Dies hat zur Folge, dass die Diagnosestellung in frühem Stadium meist auf einem Zufallsbefund beruht. Aktuell bestehen kaum Möglichkeiten, eine Diagnose im Vorläuferstadium oder bei begrenzter Karzinomausdehnung zu stellen.

Unter Berücksichtigung dieses Aspektes zeigt sich, dass der optimalen Therapie eine große Bedeutung zur Senkung der Mortalität zukommt. In anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Mammakarzinom, ist eine Ausrichtung der Therapie nach Biomarkern in den Leitlinien verankert, was die Prognose dieser Tumorerkrankung in bestimmten Konstellationen maßgeblich verbessern konnte (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2020). Eine Individualisierung der Therapie findet beim Ovarialkarzinom, abgesehen von der Therapie mit PARP-Inhibitoren bei BRCA-mutierten high-grade serösen Karzinomen, in der aktuellen Leitlinie keine Anwendung. Um eine Anpassung der Therapie zu ermöglichen, müssen zunächst Subgruppen identifiziert werden, welche ein Merkmal als Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass das Ovarialkarzinom weniger eine Malignität, sondern viel mehr Überbegriff für eine heterogene Karzinomerkrankung ovarieller Lokalisation ist. Das Ursprungsgewebe, die Wege der Tumorigenese, die exprimierten Biomarker, das klinische Verhalten und auch die Prognose differieren innerhalb der Erkrankung stark. Aus diesem Grund scheint auch die Therapie nach einem Schema beim Ovarialkarzinom als nicht optimal, was die Notwendigkeit Individualisierung der Therapie nochmals unterstreicht. Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Frage, ob sich Subgruppen mit immunhistochemischen Mitteln bestimmen lassen, die eine derartige Herangehensweise ermöglichen.

Zunächst zeigte sich, dass gewisse Merkmale bei einzelnen Subgruppen gehäuft auftreten, was zum einen Rückschlüsse auf die Tumorigenese zulässt, zum anderen aber auch in der Diagnostik von Bedeutung sein kann. Ein Zusammenhang mit den histologischen Subtypen wurde bei ER α , WT1, Her2, Lef1/ β -Catenin, p53 und p16 beobachtet. Daher wird die Einbeziehung der Biomarkerkonstellationen zur Validierung der Subgruppenklassifikation empfohlen, was durch die Daten dieser Arbeit unterstützt wird. Auch bei Karzinomen außerhalb des Ovars kann dies zur Identifizierung des Ursprungs von Metastasen hilfreich sein. Die folgende Grafik zeigt einen möglichen Algorithmus zur Verifizierung der histomorphologischen Zuordnung der häufigsten Ovarialkarzinomtypen mittels IHC.

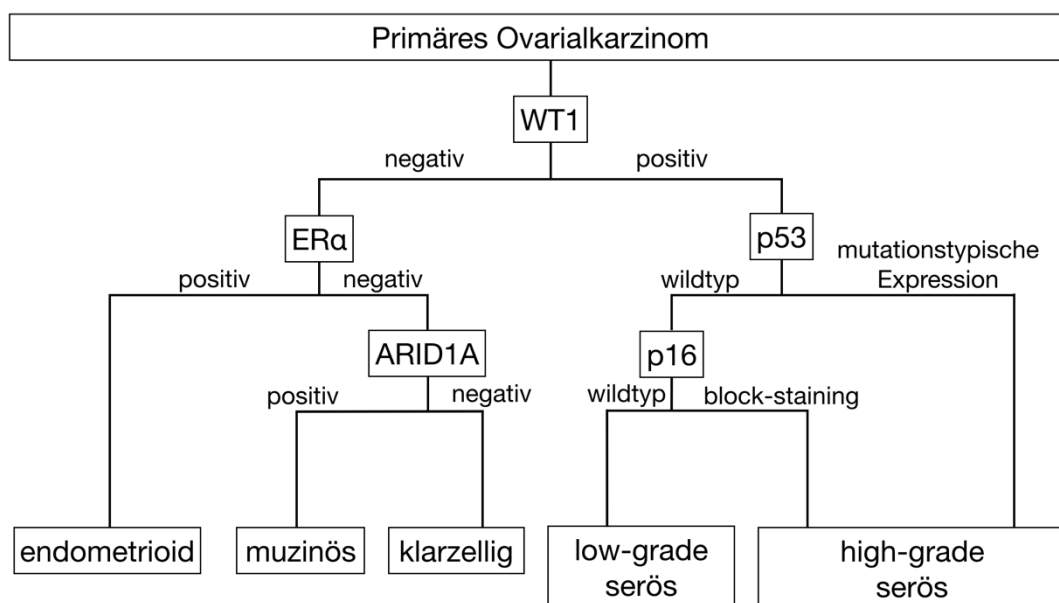


Abb. 45 Diagnostischer Algorithmus zur Klassifikation des Ovarialkarzinoms mittels IHC, modifiziert nach Köbel et al., 2014

Weiter zeigte sich eine Assoziation gewisser Aspekte mit dem Überleben. Alter, FIGO-Stadium und Differenzierungsgrad konnten als prognostische Faktoren bestätigt werden. Für die Gruppe der Typ-II-Karzinome zeigte sich zudem ER α sowie die Kombinationen ER/PR und ER/PR/Her2 als prognostische Marker. Als negativer Prädiktor wurde jeweils der Expressionsverlust der Rezeptoren beobachtet, was es schwierig macht, diese Eigenschaften therapeutisch zu adressieren. Vielmehr ist es die alterierte intra- und interzelluläre Signaltransduktion, welche als möglicher Angriffspunkt für eine Therapie herangezogen werden könnte. Jedoch sind diese Veränderungen noch unzureichend bekannt. Besonders interessant ist die triplenegative Konstellation seröser high-grade Karzinome. Hier ist zu klären, inwiefern sich Erkenntnisse vom triplenegativen Mammakarzinom auf das Ovarialkarzinom übertragen lassen und ob therapeutische Ansätze analog eingesetzt werden können.

Die hohe Rezidivrate und die frühe Metastasierung sind zentrale Probleme in der Therapie des Ovarialkarzinoms. Eine Erklärung für das häufige Rezidiv ist das Modell einer Stammzellpopulation innerhalb des Karzinoms, welche sich unter anderem durch Chemoresistenz definiert. Nach erfolgter Chemotherapie wird diese Population als Ausgangspunkt des erneuten Tumorwachstums vermutet. Die spezielle Art der intraperitonealen Metastasierung setzt ebenfalls gewisse stammzellartige Eigenschaften voraus: das Lösen aus dem Zellverband, die Änderung der Zellpolarität, die Migration und nach Adhäsion im Ort der Metastasierung das Durchlaufen dieses Prozesses in umgekehrter Reihenfolge. Mehrere Studien deuteten darauf hin, dass diese Prozesse durch den Wnt/Lef1/ β -Catenin-Signalweg vermittelt werden. Zwar konnte im Rahmen dieser Arbeit kein wesentlicher Einfluss der Biomarker Lef1 und β -Catenin auf die Prognose nachgewiesen werden, jedoch stellt der Signalweg aufgrund der Assoziation zu den klinischen Hauptproblemen des Ovarialkarzinoms einen vielversprechenden Angriffspunkt zur Therapie dar. Hier werden jedoch Studien benötigt, welche die Auswirkungen der Modulation dieses Signalweges auf die Tumorerkrankung und den Gesamtorganismus evaluieren.

Ein ebenfalls zentraler Signalweg in der Tumorigenese und im Tumorprogress ist der PI3K/AKT/mTor-Signalweg. Die vermehrte Aktivierung dieses Signalweges wurde im Rahmen mehrerer Alterationen von Biomarkern beschrieben. Durch Wegfall des Inhibitors ARID1A oder die Aktivierung durch die Tyrosinkinase Her2 zeigte sich ein Progress der Tumoren. Weiterhin wurde die Vermittlung von Chemoresistenzen bei Karzinomen mit p53-Mutation beobachtet. Auch das triplenegative Mammakarzinom weist gehäuft eine Aktivierung dieses Signalweges auf. Die Inhibition des PI3K/AKT/mTor-Signalweges hat deshalb das Potential zur Verlangsamung des Tumorprogresses und Wiederherstellung der Chemosensibilität. Inwiefern sich dies beim Ovarialkarzinom klinisch umsetzen lässt, ist bisher noch kaum in Studien untersucht. Weiterhin werden Selektionskriterien für Patientinnen benötigt, welche von einer Inhibition des Signalweges profitieren können. Es bleibt zu ermitteln, ob Patientinnen mit oben genannten Mutationen auf eine entsprechende Signalwegsmodulation ein klinisches Ansprechen zeigen.

WT1 wird bei einem Großteil aller serösen Ovarialkarzinome exprimiert und wäre deshalb ein idealer Angriffspunkt für eine zielgerichtete Immuntherapie. Bei anderen Tumorentitäten, wie dem malignen Melanom, wird eine Immuntherapie bereits erfolgreich eingesetzt (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2019). Auch beim Ovarialkarzinom zeigten sich hierzu vielversprechende Ergebnisse in präklinischen Studien (Chester C et al. 2015). Diesbezüglich werden Studien benötigt, ob WT1 tatsächlich ein geeignetes Antigen für eine Immuntherapie darstellt.

Zentrales Problem in der Therapie des Ovarialkarzinoms ist die Heterogenität der Erkrankung und die damit einhergehende Vielzahl an onkogenen Prozessen. Diese lassen sich nur bedingt mit immunhistochemischen Mitteln abbilden. Jedoch weist die aktuelle Literatur und auch diese Arbeit darauf hin, dass sich mittels Immunhistochemie Subgruppen bestimmen lassen, an welchen Untersuchungen, insbesondere zu Signalwegsalterationen, sinnvoll sind. Diesbezüglich scheinen insbesondere klinische Studien zur Evaluation der Modulation des PI3K/AKT/mTor- und des Wnt/Lef1/ β -Catenin- Signalweges an den identifizierten Subgruppen wegweisend (Konstantinopoulos PA et al. 2019).

Untersuchungen bezüglich des PI3K/AKT/mTor-Signalweges scheinen, wie oben gezeigt, an Tumoren mit mutationstypischem Expressionsmuster von ARID1A, Her2 und p53 sinnvoll. Tumoren zur Modulation des Wnt/Lef1/ β -Catenin- Signalweges könnten durch die immunhistochemischen Biomarker Lef1 und β -Catenin selektiert werden.

Ob diese Marker zur Entwicklung einer „care for the rare“ Therapie geeignet sind, muss in zukünftigen Studien evaluiert werden.

6 Bibliographie

1. Acs G et al. 2004. WT1 is Differentially Expressed in Serous, Endometrioid, Clear Cell, and Mucinous Carcinomas of the Peritoneum, Fallopian Tube, Ovary, and Endometrium. *International Journal of Gynecological Pathology* 23(2):110–118.
2. Aghajanian C et al. 2015. Final overall survival and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 139(1):10–6.
3. Alsop K et al. 2012. BRCA Mutation Frequency and Patterns of Treatment Response in BRCA Mutation–Positive Women With Ovarian Cancer: A Report From the Australian Ovarian Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology* 30(21):2654–2663.
4. Antoniou AC. 2005. Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA and BRCA2 mutations: a combined analysis of 22 population based studies. *Journal of Medical Genetics* 42(7):602–603.
5. Arend RC et al. 2013. The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: A review. *Gynecologic Oncology* 131(3):772–779.
6. Badiglian FL et al. 2009. Canonical and noncanonical Wnt pathway: a comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. *Oncology reports* 21(2):313–20.
7. Bankhead CR et al. 2005. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *British journal of obstetrics and gynaecology* 112(7):857–65.
8. Bashashati A et al. 2013. Distinct evolutionary trajectories of primary high-grade serous ovarian cancers revealed through spatial mutational profiling. *The Journal of Pathology* 231(1):21–34.
9. Beatson GT. 1896. On the Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma: Suggestions for a New Method of Treatment, with Illustrative Cases. *The Lancet* 148:162–65.
10. Bitler BG et al. 2015a. Potential therapeutic targets in ARID1A-mutated cancers. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 19(11):1419–1422.
11. Bitler BG et al. 2015b. Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nature Medicine* 21(3):231–238.
12. Bodnar L et al. 2014. Wnt/ β -catenin pathway as a potential prognostic and predictive marker in patients with advanced ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research* 7(1):16.
13. Brachova P et al. 2014. TP53 oncomorphic mutations predict resistance to platinum- and taxane-based standard chemotherapy in patients diagnosed with advanced serous ovarian carcinoma. *International Journal of Oncology* 46(2):607–618.
14. Brett MR et al. R. 2017. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biology & Medicine* 14(1):9–32.

15. Burges A et al. 2009. Prognostic significance of estrogen receptor alpha and beta expression in human serous carcinomas of the ovary. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 281(3):511–517.
16. Burkhalter RJ et al. 2011. Integrin Regulation of β -Catenin Signaling in Ovarian Carcinoma. *Journal of Biological Chemistry* 286(26):23467–23475.
17. Burstein HJ. 2005. The Distinctive Nature of HER2-Positive Breast Cancers. *New England Journal of Medicine* 353(16):1652-1654.
18. Buys et al. 2011. Effect of Screening on Ovarian Cancer Mortality: The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *Journal of the American Medical Association* 305(22):2295–303.
19. Call KM et al. 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Trends in Genetics* 6:107.
20. Carter JH et al. 2018. Transcription factors WT1 and p53 combined: a prognostic biomarker in ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 119:462–470.
21. Cass I et al. 2003. Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer* 97(9):2187–2195.
22. Chan KL et al. 2017. Differential expression of estrogen receptor subtypes and variants in ovarian cancer: effects on cell invasion, proliferation and prognosis. *BMC Cancer* 17(1).
23. Chang SH et al. 2003. Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(2):591–596.
24. Charles NJ et al. 2010. Expression of Membrane Progesterone Receptors (mPR/PAQR) in Ovarian Cancer Cells: Implications for Progesterone-Induced Signaling Events. *Hormones and Cancer* 1(4):167–176.
25. Chauhan SC et al. 2006. Aberrant expression of MUC4 in ovarian carcinoma: diagnostic significance alone and in combination with MUC1 and MUC16 (CA125). *Modern Pathology* 19(10):1386–1394.
26. Cheever MA et al. 2009. The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. *Clinical Cancer Research* 15(17):5323–5337.
27. Chester C et al. 2015. Immunotherapeutic approaches to ovarian cancer treatment. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 3(1).
28. Chien J et al. 2015. TP53 mutations, tetraploidy and homologous recombination repair defects in early stage high-grade serous ovarian cancer. *Nucleic Acids Research* 43(14):6945–6958.
29. Cho KR, Shih IeM. 2009. Ovarian Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 4(1):287–313.
30. Clinton LK et al. 2015. The LAST Guidelines in Clinical Practice. *American Journal of Clinical Pathology* 144 (6):844–849.

31. Coatham M et al. 2016. Concurrent ARID1A and ARID1B inactivation in endometrial and ovarian dedifferentiated carcinomas. *Modern Pathology* 29(12):1586–1593.
32. Cole AJ et al. 2016. Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. *Scientific Reports* 6(1).
33. Cortez AJ et al. 2018. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 81(1):17–38.
34. Cuatrecasas M et al. 2009. Transitional cell tumors of the ovary: a comparative clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic analysis of Brenner tumors and transitional cell carcinomas. *The American journal of surgical pathology* 33(4):556–67.
35. Czogalla B. et al. 2019. EP3 receptor is a prognostic factor in TA-MUC1-negative ovarian cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 145(10):2519–2527.
36. Danforth KN et al. 2007. Breastfeeding and risk of ovarian cancer in two prospective cohorts. *Cancer causes & control : CCC* 18(5):517–23.
37. Daniilidis A, Karagiannis V. 2007. Epithelial ovarian cancer. Risk factors, screening and the role of prophylactic oophorectomy. *Hippokratia* 1(2):63–66.
38. De Toledo MCS et al. 2014. Analysis of the contribution of immunologically-detectable HER2, steroid receptors and of the “triple-negative” tumor status to disease-free and overall survival of women with epithelial ovarian cancer. *Acta Histochemica* 116(3):440–447.
39. Ditto A et al. 2015. Long-term safety of fertility sparing surgery in early stage ovarian cancer: comparison to standard radical surgical procedures. *Gynecologic oncology* 138(1):78–82.
40. Divo MJ et al. 2014. Ageing and the epidemiology of multimorbidity. *European Respiratory Journal* 44(4):1055–1068.
41. du Bois A et al. 2009. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d’Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l’Ovaire (GINECO). *Cancer* 115(6):1234–44.
42. Duffy MJ et al. 2014. p53 as a target for the treatment of cancer. *Cancer Treatment Reviews* 40(10):1153–1160.
43. Emons G et al. 2016. Temsirolimus in women with platinum-refractory/resistant ovarian cancer or advanced/recurrent endometrial carcinoma. A phase II study of the AGO-study group (AGO-GYN8). *Gynecologic Oncology* 140(3):450–456.
44. English DP et al. 2013. HER2 Expression Beyond Breast Cancer: Therapeutic Implications for Gynecologic Malignancies. *Molecular Diagnosis & Therapy* 17(2):85–99.
45. Ezzati M. et a. 2014. Recent Advancements in Prognostic Factors of Epithelial Ovarian Carcinoma. *International Scholarly Research Notices* 2014:1–10.

46. Fiszman GL, Jasnis MA. 2011. Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancer. *International Journal of Breast Cancer* 2011:1–11.
47. Frumovitz M et al. 2010. Unmasking the complexities of mucinous ovarian carcinoma. *Gynecologic oncology* 117(3):491–496.
48. Fujii H et al. 2000. Frequent genetic heterogeneity in the clonal evolution of gynecological carcinosarcoma and its influence on phenotypic diversity. *Cancer research* 60(1):114–20.
49. Gandhirajan RK et al. 2010. Small Molecule Inhibitors of Wnt/ β -Catenin/Lef-1 Signaling Induces Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells In Vitro and In Vivo. *Neoplasia* 12(4):326-IN6.
50. Garg K et al. 2013. BRCA1 Immunohistochemistry in a Molecularly Characterized Cohort of Ovarian High-Grade Serous Carcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology* 37(1):138–146.
51. Gershenson DM et al. 2017. Hormonal Maintenance Therapy for Women With Low-Grade Serous Cancer of the Ovary or Peritoneum. *Journal of Clinical Oncology* 35(10):1103–1111.
52. Grabowski JP et al. 2012. Re-operation outcome in patients referred to a gynecologic oncology center with presumed ovarian cancer FIGO I-IIIa after sub-standard initial surgery. *Surgical oncology* 21(1):31–5.
53. Guan B et al. 2011. ARID1A, a Factor That Promotes Formation of SWI/SNF-Mediated Chromatin Remodeling, Is a Tumor Suppressor in Gynecologic Cancers. *Cancer Research* 71(21):6718–6727.
54. Harris RE. 2009. Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology* 17(2):55–67.
55. Hecht JL et al. 2008. Validation of Tissue Microarray Technology in Ovarian Cancer: Results from the Nurses' Health Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17(11):3043–3050.
56. Heckl M. et al. 2018. The ARID1A, p53 and β -Catenin statuses are strong prognosticators in clear cell and endometrioid carcinoma of the ovary and the endometrium. *PLOS ONE* 13(2):e0192881.
57. Helming KC et al. 2014. ARID1B is a specific vulnerability in ARID1A-mutant cancers. *Nature Medicine* 20(3):251–254.
58. Henderson JT et al. 2018. Screening for Ovarian Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *Journal of the American Medical Association* 319(6):595–606.
59. Hildreth NG et al. 1981. An epidemiologic study of epithelial carcinoma of the ovary. *American journal of epidemiology* 114(3):398–405.
60. Høgdall EVS et al. 2007a. Expression level of Wilms tumor 1 (WT1) protein has limited prognostic value in epithelial ovarian cancer From the Danish "MALOVA" Ovarian Cancer Study. *Gynecologic Oncology* 106(2):318–324.

61. Høgdall EVS et al. 2007b. Prognostic value of estrogen receptor and progesterone receptor tumor expression in Danish ovarian cancer patients: From the 'MALOVA' Ovarian Cancer Study. *Oncology Reports*.
62. Hollis RL et al. 2019. Hormone receptor expression patterns define clinically meaningful subgroups of endometrioid ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* 155(2):318–323.
63. Hovanes K et al. 2001. β -catenin–sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nature Genetics* 28(1):53–57.
64. Huang C, Qin D. 2010. Role of Lef1 in sustaining self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Journal of Genetics and Genomics* 37(7):441–449.
65. Hudis CA. 2007. Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *New England Journal of Medicine* 357(1):39–51.
66. Hunn J. 2012. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clinical obstetrics and gynecology* 55(1):3–23.
67. Hwang H et al. 2004. Wilms Tumor Gene Product. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 12(2):122–126.
68. Hylander B et al. 2006. Expression of Wilms tumor gene (WT1) in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 101(1):12–17.
69. Jacobsen B, Horwitz K. 2012. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Molecular and Cellular Endocrinology* 357(1–2):18–29.
70. Jones BA et al. 2018. Histone Methyltransferase EZH2: A Therapeutic Target for Ovarian Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 17(3):591–602.
71. Jones S et al. 2010. Frequent Mutations of Chromatin Remodeling Gene ARID1A in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Science* 330(6001):228–231.
72. Kaldawy A et al. A. 2016. Low-grade serous ovarian cancer: A review. *Gynecologic Oncology* 143(2):433–438.
73. Kehoe S et al. 2015. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet* 386(9990):249–57.
74. Khandakar B et al. 2014. Tissue Biomarkers in Prognostication of Serous Ovarian Cancer following Neoadjuvant Chemotherapy. *BioMed Research International* 2014:1–9.
75. Kim A et al. 2014. Prognostic significance of WT1 expression in soft tissue sarcoma. *World Journal of Surgical Oncology* 12:214.
76. Kim J et al. 2019. Optimal cutoff age for predicting prognosis associated with serous epithelial ovarian cancer: what is the best age cutoff? *Journal of Gynecologic Oncology* 30(1).
77. Klaes R et al. 2001. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International Journal of Cancer* 92(2):276–284.
78. Kobayashi N et al. 2013. PRIMA-1 increases cisplatin sensitivity in chemoresistant ovarian cancer cells with p53 mutation: a requirement for Akt down-regulation. *Journal of Ovarian Research* 6(1):7.

79. Kobayashi W, Ozawa M. 2013. The transcription factor LEF-1 induces an epithelial–mesenchymal transition in MDCK cells independent of β -catenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 442(1–2):133–138.
80. Köbel M et al. 2014. Ovarian carcinoma histotype determination is highly reproducible, and is improved through the use of immunohistochemistry. *Histopathology* 64(7):1004–1013.
81. Köbel M et al. 2016. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. *The Journal of Pathology: Clinical Research* 2(4):247–258.
82. Konecny GE et al. 2011. Expression of p16 and Retinoblastoma Determines Response to CDK4/6 Inhibition in Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research* 17(6):1591–1602.
83. Koo YJ et al. 2014. Comparison of laparoscopy and laparotomy for the management of early-stage ovarian cancer: surgical and oncological outcomes. *Journal of gynecologic oncology* 25(2):111–7.
84. Konstantinopoulos PA et al. 2019. Olaparib and α -specific PI3K inhibitor alpelisib for patients with epithelial ovarian cancer: a dose-escalation and dose-expansion phase 1b trial. *The Lancet Oncology* 20(4):570–580.
85. Kryczek I et al. 2011. Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *International Journal of Cancer* 130(1):29–39.
86. Kuchenbaecker KB et al. 2017. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Journal of the American Medical Association* 317(23):2402–2416.
87. Kunkel J et al. 2012. Presence of a Sarcomatous Component Outside the Ovary Is an Adverse Prognostic Factor for Primary Ovarian Malignant Mixed Mesodermal/Mullerian Tumors. *The American Journal of Surgical Pathology* 36(6):831–837.
88. Kurman RJ, Shih IeM. 2016. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *The American journal of pathology* 186(4):733–47.
89. Kurman RJ, Shih IeM. 2016. Seromucinous Tumors of the Ovary. What’s in a Name? *International Journal of Gynecological Pathology* 35(1):78–81.
90. Kurman RJ et al. 2014. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs (IARC, Hrsg)., Lyon: World Health Organization.
91. Kyrgiou M et al. 2006. Survival Benefits With Diverse Chemotherapy Regimens for Ovarian Cancer: Meta-analysis of Multiple Treatments. *Journal of the National Cancer Institute* 98(22):1655–1663.
92. Lang SM et al. 2017. Malignant Brenner tumor of the ovary: Review and case report. *Gynecologic oncology reports* 22:26–31.
93. Lassus H et al. 2004. ERBB2 amplification is superior to protein expression status in predicting patient outcome in serous ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* 92(1):31–39.

94. Lau KM et al. 1999. Expression of human estrogen receptor- and - , progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(10):5722–5727.
95. Lax SF. 2019. Fallstricke und Probleme bei der Differenzialdiagnose epithelialer Ovarialtumoren. *Der Pathologe* 40(1):46–60.
96. Ledermann J et al. 2014. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 15(8):852–861.
97. Lee JL et al. 2005. Differential Expression of E Prostanoid Receptors in Murine and Human Non-Melanoma Skin Cancer. *Journal of Investigative Dermatology* 125(4):818–825.
98. Lee LF et al. 1998. Paclitaxel (Taxol)-induced Gene Expression and Cell Death Are Both Mediated by the Activation of c-Jun NH2-terminal Kinase (JNK/SAPK). *Journal of Biological Chemistry* 273(43):28253–28260.
99. Lee P et al. 2005. Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 96(3):671–677.
100. Lehmann S et al. 2012. Targeting p53 in Vivo: A First-in-Human Study With p53-Targeting Compound APR-246 in Refractory Hematologic Malignancies and Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 30(29):3633–3639.
101. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF. 2020. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren.
102. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF. 2019. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms.
103. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF. 2020. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.
104. Levin ER. 2005. Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *Molecular Endocrinology* 19(8):1951–1959.
105. Liu G et al. 2000. High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(8):4174–4179.
106. Liu N et al. 2011. ‘Triple negative’ epithelial ovarian cancer and pathologic markers for prognosis. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 23(1):19–23.
107. Liu Y et al. 2012. MiR-218 reverses high invasiveness of glioblastoma cells by targeting the oncogenic transcription factor LEF1. *Oncology Reports* 28(3):1013–1021.
108. Ludwig AH et al. 2009. Androgen, progesterone, and FSH receptor polymorphisms in ovarian cancer risk and outcome. *Endocrine-Related Cancer* 16(3):1005–1016.
109. Lumachi F et al. 2013. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Current medicinal chemistry* 20(5):596–604.
110. Luo H et al. 2017. Prognostic value of progesterone receptor expression in ovarian cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 8(22).

111. Ma X et al. 2006. Prostaglandin E Receptor EP4 Antagonism Inhibits Breast Cancer Metastasis. *Cancer Research* 66(6):2923–2927.
112. Mabuchi S et al. 2016. Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives. *Journal of gynecologic oncology* 27(3):e31.
113. Mafficini A et al. 2016. BRCA somatic and germline mutation detection in paraffin embedded ovarian cancers by next-generation sequencing. *Oncotarget* 7(2).
114. Malpica A. 2008. Grading of Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Pathology PAP*.
115. Malpica A et al. 2007. Interobserver and intraobserver variability of a two-tier system for grading ovarian serous carcinoma. *The American journal of surgical pathology* 31(8):1168–74.
116. Mansouri A et al. 2003. Sustained Activation of JNK/p38 MAPK Pathways in Response to Cisplatin Leads to Fas Ligand Induction and Cell Death in Ovarian Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278(21):19245–19256.
117. Mao T, Shih leM. 2013. The roles of ARID1A in gynecologic cancer. *Journal of Gynecologic Oncology* 24(4)(4):376–381.
118. Maslak PG et al. 2018. Phase 2 trial of a multivalent WT1 peptide vaccine (galinpepimut-S) in acute myeloid leukemia. *Blood Advances* 2(3):224–234.
119. Mayr D et al. 2006. HER-2/neu gene amplification in ovarian tumours: a comprehensive immunohistochemical and FISH analysis on tissue microarrays. *Histopathology* 48(2):149–156.
120. McCaughan H et al. 2012. HER2 expression in ovarian carcinoma: caution and complexity in biomarker analysis. *Journal of Clinical Pathology* 65(7):670–671.
121. McCluggage WG et al. 2015. Data set for reporting of ovary, fallopian tube and primary peritoneal carcinoma: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Modern pathology* 28(8):1101–22.
122. Meisel JL et al. 2014. The performance of BRCA1 immunohistochemistry for detecting germline, somatic, and epigenetic BRCA1 loss in high-grade serous ovarian cancer. *Annals of Oncology* 25(12):2372–2378.
123. Menter T et al. 2017. Diagnostic Utility of Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 Immunohistochemistry in Small B-Cell Lymphomas. *American journal of clinical pathology* 147(3):292–300.
124. Merlo A et al. 1995. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Medicine* 1(7):686–692.
125. Mersch J et al. 2015. Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer* 12(14):2474–5.
126. Mirza MR et al. 2020. The forefront of ovarian cancer therapy: update on PARP inhibitors. *Annals of Oncology* 31(9):1148–1159.
127. Modugno F et al. 2012. Hormone response in ovarian cancer: time to reconsider as a clinical target? *Endocrine-Related Cancer* 19(6):R255–R279.

128. Montavon Sartorius C et al. C. 2018. Impact of the new FIGO 2013 classification on prognosis of stage I epithelial ovarian cancers. *Cancer Management and Research* 10:4709–4718.
129. Moore K et al. 2018. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine* 379(26):2495–2505.
130. Moreno-Bueno G et al. 2001. beta-Catenin expression pattern, beta-catenin gene mutations, and microsatellite instability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial carcinomas. *Diagnostic molecular pathology* 10(2):116–122.
131. Morin PJ et al. 1997. Activation of beta -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in beta -Catenin or APC. *Science* 275(5307):1787–1790.
132. Murdoch WJ et al. 2008. Progesterone facilitates cisplatin toxicity in epithelial ovarian cancer cells and xenografts. *Gynecologic Oncology* 110(2):251–255.
133. Musella A et al. 2018. Rucaparib: An emerging parp inhibitor for treatment of recurrent ovarian cancer. *Cancer Treatment Reviews* 66:7–14.
134. Nam EJ et al. 2010. Diagnosis and staging of primary ovarian cancer: correlation between PET/CT, Doppler US, and CT or MRI. *Gynecologic oncology* 116(3):389–94.
135. Netinatsunthorn W et al. 2006. WT1 gene expression as a prognostic marker in advanced serous epithelial ovarian carcinoma: an immunohistochemical study. *BMC Cancer* 6(1):90.
136. Nguyen VHL et al. 2019. Wnt/ β -catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis. *Journal of Ovarian Research* 12(1):122.
137. Niwa K et al. 2008. Clinical implication of medroxyprogesterone acetate against advanced ovarian carcinoma: a pilot study. *European journal of gynaecological oncology*. 29(3):252–5.
138. O’Callaghan G, Houston A. 2015. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: possible therapeutic targets? *British Journal of Pharmacology* 172(22):5239–5250.
139. Ogawa Y et al. 2009. Bone marrow-derived EP3-expressing stromal cells enhance tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382(4):720–725.
140. Oka Y et al. 2004. Induction of WT1 (Wilms’ tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(38):13885–13890.
141. Olsen CM et al. 2007. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer* 43(4):690–709.
142. O’Neill CJ et al. 2007. High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour. *Histopathology* 50(6):773–779.
143. Ordóñez NG. 2000. Value of Thyroid Transcription Factor-1, E-Cadherin, BG8, WT1, and CD44S Immunostaining in Distinguishing Epithelial Pleural Mesothelioma From

- Pulmonary and Nonpulmonary Adenocarcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 24(4):598–606.
144. Ozaki T, Nakagawara A. 2011. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers* 3(1):994–1013.
145. Parmar MK et al. 2003. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet* 361(9375):2099–106.
146. Pauletti G et al. 2000. Assessment of Methods for Tissue-Based Detection of the HER-2/neu Alteration in Human Breast Cancer: A Direct Comparison of Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology* 18(21):3651–3664.
147. Pfisterer J et al. 2006. Gemcitabine Plus Carboplatin Compared With Carboplatin in Patients With Platinum-Sensitive Recurrent Ovarian Cancer: An Intergroup Trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG. *Journal of Clinical Oncology* 24(29):4699–4707.
148. Phillips V et al. 2009. Increased p16 Expression in High-grade Serous and Undifferentiated Carcinoma Compared With Other Morphologic Types of Ovarian Carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology* 28(2):179–186.
149. Ponnusamy MP et al. 2011. MUC4 stabilizes HER2 expression and maintains the cancer stem cell population in ovarian cancer cells. *Journal of Ovarian Research* 4(1):7.
150. Pujade-Lauraine E et al. 2010. Pegylated Liposomal Doxorubicin and Carboplatin Compared With Paclitaxel and Carboplatin for Patients With Platinum-Sensitive Ovarian Cancer in Late Relapse. *Journal of Clinical Oncology* 28(20):3323–3329.
151. Pujade-Lauraine E et al. 2012. AURELIA: A randomized phase III trial evaluating bevacizumab (BEV) plus chemotherapy (CT) for platinum (PT)-resistant recurrent ovarian cancer (OC). *Journal of Clinical Oncology* 30(18):LBA5002–LBA5002.
152. Qi XW et al. 2015. Wilms' tumor 1 (WT1) expression and prognosis in solid cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* 5(1).
153. Rambau PF et al. 2018. Association of p16 expression with prognosis varies across ovarian carcinoma histotypes: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *The Journal of Pathology: Clinical Research* 4(4):250–261.
154. Rask K et al. 2003. Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: increased expression of β -catenin and GSK3 β . *British Journal of Cancer* 89(7):1298–1304.
155. Rauscher J et al. 2014. WT1 expression increases with malignancy and indicates unfavourable outcome in astrocytoma. *Journal of Clinical Pathology* 67(7):556–561.
156. Rayess H et al. 2011. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer* 130(8):1715–1725.
157. Remmele W, Stegner HE. 1987. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe* 8:138–140.

158. Reya T, Clevers H. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434(7035):843–850.
159. Robert Koch-Institut. 2004. Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe.
160. Robert Koch-Institut. 2017. Krebs in Deutschland | 2013/2014.
161. Rodriguez C et al. 2001. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. *Journal of the American Medical Association* 285(11):1460–5.
162. Rodriguez C et al. 2002. Progesterin-induced apoptosis in the Macaque ovarian epithelium: differential regulation of transforming growth factor-beta. *Journal of the National Cancer Institute* 94(1):50–60.
163. Rosen DG. 2004. Validation of tissue microarray technology in ovarian carcinoma. *Modern Pathology* 17(7):790–797.
164. Roy R et al. 2011. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer* 12(1):68–78.
165. Ruiz-Saenz A et al. 2018. HER2 amplification in tumors activates PI3K/Akt signaling independent of HER3. *Cancer Research*:canres.0430.2018.
166. Salmen J et al. 2011. Interaktion des Progesteronrezeptorstatus mit anderen prognostischen Faktoren beim primären Mammakarzinom. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* 8(2).
167. Santaballa A et al. 2016. SEOM Clinical Guideline in ovarian cancer (2016). *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 18.
168. Santiago L et al. 2017. Wnt signaling pathway protein LEF1 in cancer, as a biomarker for prognosis and a target for treatment. *American journal of cancer research* 7(6):1389–1406.
169. Schmoeckel E et al. 2017. LEF1 is preferentially expressed in the tubal-peritoneal junctions and is a reliable marker of tubal intraepithelial lesions. *Modern Pathology* 30(9):1241–1250.
170. Schneeweiss A et al. 2019. Diagnosis and Therapy of Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) – Recommendations for Daily Routine Practice. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 79(6):605–617.
171. Sehouli J et al. 2008. Nonplatinum Topotecan Combinations Versus Topotecan Alone for Recurrent Ovarian Cancer: Results of a Phase III Study of the North-Eastern German Society of Gynecological Oncology Ovarian Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology* 26(19):3176–3182.
172. Seidman JD, Kurman RJ. 2003. Pathology of ovarian carcinoma. *Hematology/oncology clinics of North America* 17(4):909–25.
173. Sen M et al. 2017. p16 controls epithelial cell growth and suppresses carcinogenesis through mechanisms that do not require RB1 function. *Oncogenesis* 6(4):e320–e320.

174. Shah MM, Landen CN. 2014. Ovarian cancer stem cells: Are they real and why are they important? *Gynecologic Oncology* 132(2):483–489.
175. Shangguan F et al. 2020. Niclosamide inhibits ovarian carcinoma growth by interrupting cellular bioenergetics. *Journal of Cancer* 11(12):3454–3466.
176. Shen Z. et al. 2017. Correlation between estrogen receptor expression and prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 8(37):62400–62413.
177. Shih IeM, Kurman RJ. 2004. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American journal of pathology* 164(5):1511–1518.
178. Shoji Y et al. 2004. Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development. *Gut* 53(8):1151–1158.
179. Silva E et al. 2006. Association of Low-Grade Endometrioid Carcinoma of the Uterus and Ovary With Undifferentiated Carcinoma: A New Type of Dedifferentiated Carcinoma? *International Journal of Gynecological Pathology* 25(1):52–58.
180. Silverberg SG. 2000. Histopathologic Grading of Ovarian Carcinoma: A Review and Proposal. *International Journal of Gynecological Pathology* 19(1):7–15.
181. Simpkins F et al. 2012. Src Inhibition with Saracatinib Reverses Fulvestrant Resistance in ER-Positive Ovarian Cancer Models In Vitro and In Vivo. *Clinical Cancer Research* 18(21):5911–5923.
182. Simpkins F et al. 2013. New insights on the role of hormonal therapy in ovarian cancer. *Steroids* 78(6):530–537.
183. Sisay M, Edessa D. 2017. PARP inhibitors as potential therapeutic agents for various cancers: focus on niraparib and its first global approval for maintenance therapy of gynecologic cancers. *Gynecologic Oncology Research and Practice* 4(1).
184. Staebler A, Mayr D. 2017. The 2016 update of the S3 guideline for malignant tumours of the ovary : Role of pathology in diagnosis, therapy and clinical management of epithelial tumours. *Der Pathologe* 38(4):331–344.
185. Sugimoto Y, Narumiya S. 2007. Prostaglandin E receptors. *The Journal of biological chemistry* 282(16):11613–7.
186. Sugiyama H. 2001. Wilms' Tumor Gene WT1: Its Oncogenic Function and Clinical Application. *International Journal of Hematology* 73(2):177–187.
187. Sun H et al. 2017. COX-2 expression in ovarian cancer: an updated meta-analysis. *Oncotarget* 8(50):88152-88162.
188. Sun J et al. 2017. GOLPH3 induces epithelial-mesenchymal transition via Wnt/ β -catenin signaling pathway in epithelial ovarian cancer. *Cancer Medicine* 6(4):834–844.
189. Swisher EM et al. 2017. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 18(1):75–87.
190. Taylor J, McCluggage WG. 2015. Ovarian seromucinous carcinoma: report of a series of a newly categorized and uncommon neoplasm. *The American journal of surgical pathology* 39(7):983–92.

191. Teeuwssen M, Fodde R. 2019. Wnt Signaling in Ovarian Cancer Stemness, EMT, and Therapy Resistance. *Journal of Clinical Medicine* 8(10):1658.
192. Teixeira LA, Candido dos Reis FJ. 2019. Immunohistochemistry for the detection of BRCA1 and BRCA2 proteins in patients with ovarian cancer: a systematic review. *Journal of Clinical Pathology*:jclinpath-2019-206276.
193. Teplinsky E, Muggia F. 2014. Targeting HER2 in ovarian and uterine cancers: Challenges and future directions. *Gynecologic Oncology* 135(2):364–370.
194. Testa U et al. 2018. Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Medicines* 5(1):16.
195. Tew WP et al. 2018. Randomized phase II trial of bevacizumab plus everolimus versus bevacizumab alone for recurrent or persistent ovarian, fallopian tube or peritoneal carcinoma: An NRG oncology/gynecologic oncology group study. *Gynecologic Oncology* 151(2):257–263.
196. Tewari D et al. 2015. Long-Term Survival Advantage and Prognostic Factors Associated With Intraperitoneal Chemotherapy Treatment in Advanced Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY* 33(13):1460–6.
197. Tewari K et al. 2019. Final Overall Survival of a Randomized Trial of Bevacizumab for Primary Treatment of Ovarian Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 37(26):2317–2328.
198. The Cancer Genome Atlas Research Network. 2012. Erratum: Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 490(7419):292–292.
199. Tomao F et al. 2019. Parp inhibitors as maintenance treatment in platinum sensitive recurrent ovarian cancer: An updated meta-analysis of randomized clinical trials according to BRCA mutational status. *Cancer Treatment Reviews* 80:101909.
200. Trimbos B et al. 2010. Surgical Staging and Treatment of Early Ovarian Cancer: Long-term Analysis From a Randomized Trial. *Journal of the National Cancer Institute* 102(13):982–987.
201. Tuefferd M et al. 2007. HER2 Status in Ovarian Carcinomas: A Multicenter GINECO Study of 320 Patients. *PLoS ONE* 2(11):e1138.
202. Vang R et al. 2005. Immunohistochemistry for estrogen and progesterone receptors in the distinction of primary and metastatic mucinous tumors in the ovary: an analysis of 124 cases. *Modern Pathology* 19(1):97–105.
203. Vaz FH et al. 2007. Familial Breast/Ovarian Cancer and BRCA1/2 Genetic Screening: The Role of Immunohistochemistry as an Additional Method in the Selection of Patients. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 55(11):1105–1113.
204. Verri E et al. 2005. HER2/neu Oncoprotein Overexpression in Epithelial Ovarian Cancer: Evaluation of its Prevalence and Prognostic Significance. *Oncology* 68(2–3):154–161.
205. Waldstrøm M, Grove A. 2005. Immunohistochemical Expression of Wilms Tumor Gene Protein in Different Histologic Subtypes of Ovarian Carcinomas. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 129(1):85–88.

206. Walsh T et al. 2011. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:18032–18037.
207. Walters Haygood CL et al. 2015. Niclosamide Analogs for Treatment of Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* 25(8):1377–1385.
208. Wang D., DuBois R. 2010. Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews Cancer* 10(3):181–193.
209. Wang WJ et al. 2013. Knockdown of Lymphoid Enhancer factor 1 Inhibits Colon Cancer Progression In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* 8(10):e76596.
210. WHO 2020. *Female Genital Tumours: WHO Classification of Tumours, 5th ed. IARC Volume 4.*
211. Wiegand KC et al. 2010. ARID1A Mutations in Endometriosis-Associated Ovarian Carcinomas. *New England Journal of Medicine* 363(16):1532–1543.
212. Willner J et al. 2007. Alternate molecular genetic pathways in ovarian carcinomas of common histological types. *Human pathology* 38(4):607–13.
213. Wolff A et al. 2013. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology* 31(31):3997–4013.
214. Wolff A et al. 2018. HER2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update Summary. *Journal of Oncology Practice* 14(7):437–441.
215. Workman HC et al. 2009. The membrane mucin MUC4 is elevated in breast tumor lymph node metastases relative to matched primary tumors and confers aggressive properties to breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 11(5).
216. Yachida N et al. 2020. ARID1A protein expression is retained in ovarian endometriosis with ARID1A loss-of-function mutations: implication for the two-hit hypothesis. *Scientific Reports* 10(1)
217. Yokoyama Y et al. 2014. Decreased ARID1A expression is correlated with chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Journal of Gynecologic Oncology* 25(1):58.
218. Yu S et al. 2016. Hematopoietic and Leukemic Stem Cells Have Distinct Dependence on Tcf1 and Lef1 Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry* 291(21):11148–11160.
219. Yuan Y et al. 2012. Computer tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography or positron emission tomography/computer tomography for detection of metastatic lymph nodes in patients with ovarian cancer: a meta-analysis. *European journal of radiology* 81(5):1002–6.
220. Zhang S et al. 2011. Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 121(2):353–357.

221. Zhang Y et al. 2016. TP53 mutations in epithelial ovarian cancer. *Translational Cancer Research* 5(6):650–663.
222. Zhong Q et al. 2014. Effects of BRCA1- and BRCA2-Related Mutations on Ovarian and Breast Cancer Survival: A Meta-analysis. *Clinical Cancer Research* 21(1):211–220.
223. Zilfou JT, Lowe SW. 2009. Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1(5):26.04.2020.17:23,a001883–a001883.

7 Abkürzungsverzeichnis

ABC	avidin biotin complex
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
BMI	Body Mass Index
BRCA	breast cancer antigen
CA 125	Cancer Antigen 125
cAMP	cyclisches Adenosinmonosphat
CDK	cyclin dependent kinase
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
CUP	Cancer of unknown primary
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidin-2-phenylindol
DNA	deoxyribonucleic acid
EMT	epithelial-mesenchymale-Transition
ER	Östrogenrezeptor
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FDG	Fluordesoxyglukose
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
HBOC	hereditary breast ovarian cancer syndrome
HE	Hämatoxylin-Eosin
Her2	human epidermal growth factor receptor 2
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome
HPF	high-power field, Haupt Gesichtsfeld

HPV	humane Papillomviren
HRD	homologous recombination deficiency
HRP	horseraddish peroxidase
ICD	International Classification of Diseases
IHC	Immunhistochemie
IRS	immunreaktiver Score
Lef1	Lymphoid-enhancer-binding factor 1
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LOH	loss of heterozygosity
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mp53	mutiertes / strukturell alteriertes p53
mPR	membranständige Progesteronrezeptoren
MRT	Magnetresonanztomographie
MUC4	Mucin 4
NCI	National Cancer Institute
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PET	Positronen-Emissionstomographie
PGE2	Prostaglandin-E2
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PR	Progesteronrezeptor
PRIMA1	p53 reactivation and induction of massive apoptosis
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Rb	Retinoblastom-Protein
RKI	Robert Koch Institut
RNA	ribonucleic acid
SET	solide pseudoendometrioid transitional

SSC	saline-sodium-citrate
STIC	serous tubal intraepithelial carcinoma
TMA	Tissue Micro Array
TNEOC	triple negative epithelial ovarian cancer
UICC	Union for International Cancer Control
USA	United States of America
WHO	World Health Organisation
WT1	Wilms-Tumorprotein1
WTp53	Wildtyp-p53

8 Abbildungsverzeichnis

1. **Abb. 1** Schematische Einteilung des Ovarialkarzinoms, modifiziert nach Kurman RJ und Shih M, 2016
2. **Abb. 2** Altersverteilung bei Diagnose
3. **Abb. 3** Überleben zum Zeitpunkt der Datenerhebung
4. **Abb. 4** Subgruppenverteilung des Gesamtkollektivs
5. **Abb. 5** Grading innerhalb der Subgruppen
6. **Abb. 6** links: TMA-Paraffin-Block, rechts: Gewebeproben auf Objektträger
7. **Abb. 7** TMA Lageplan
8. **Abb. 8** Methodik der IHC
9. **Abb. 9** Methodik der FISH
10. **Abb. 10** Flowchart Auswertung Her2 FISH
11. **Abb. 11** Färbeintensitäten Östrogenrezeptor 20fach vergrößert
12. **Abb. 12** Färbeintensitäten Progesteronrezeptor 20fach vergrößert
13. **Abb. 13** Farbreaktion WT1 20fach vergrößert
14. **Abb. 14** Farbreaktion ARID1A 20fach vergrößert
15. **Abb. 15** BRCA1 Expression 20fach vergrößert
16. **Abb. 16** Farbreaktion EP3 20fach vergrößert
17. **Abb. 17** Farbreaktion Her2 20fach vergrößert
18. **Abb. 18** Her2 FISH in polarisiertem Licht 400fach vergrößert, Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License; modifiziert nach Qiu MZ et al. Comparison between Biopsy and Surgical Resection Samples, Primary and Metastatic Samples of Gastric Cancer. *Journal of Cancer* 8(17):3531-3537. <http://dx.doi.org/10.7150/jca.19984> (24.01.2021)
19. **Abb. 19** Farbreaktion Lef1 20fach vergrößert
20. **Abb. 20** Farbreaktion β -Catenin 20fach vergrößert
21. **Abb. 21** Farbreaktion p53 20fach vergrößert
22. **Abb. 22** Farbreaktion p16 20fach vergrößert
23. **Abb. 23** Kaplan-Meier-Kurve Alter bei Diagnose
24. **Abb. 24** Kaplan-Meier-Kurve FIGO-Stadium
25. **Abb. 25** Kaplan-Meier-Kurve Grading Gesamtkollektiv
26. **Abb. 26** Kaplan-Meier-Kurve Grading zusammengefasst
27. **Abb. 27** Kaplan-Meier-Kurve Grading nicht seröse Karzinome
28. **Abb. 28** Kaplan-Meier-Kurve Typ-I- / Typ-II-Karzinome
29. **Abb. 29** Kaplan-Meier-Kurve ER α , Gesamtkollektiv

30. **Abb. 30** Kaplan-Meier-Kurve PR
31. **Abb. 31** Kaplan-Meier-Kurve WT1
32. **Abb. 32** Kaplan-Meier-Kurve ARID1A
33. **Abb. 33** Kaplan-Meier-Kurve BRCA1
34. **Abb. 34** Kaplan-Meier-Kurve BRCA2
35. **Abb. 35** Kaplan-Meier-Kurve EP3
36. **Abb. 36** Kaplan-Meier-Kurve Her2 FISH
37. **Abb. 37** Kaplan-Meier-Kurve Lef1
38. **Abb. 38** Kaplan-Meier-Kurve β -Catenin Verteilung
39. **Abb. 39** Kaplan-Meier-Kurve p53
40. **Abb. 40** Kaplan-Meier-Kurve p16
41. **Abb. 41** Kaplan-Meier-Kurve ER/PR, Typ-II-Karzinome
42. **Abb. 42** Kaplan-Meier-Kurve ER/PR/Her2, Typ-II-Karzinome
43. **Abb. 43** Kaplan Meier Kurve p53 / EP3 Co-Expression
44. **Abb. 44** Kaplan Meier Kurve p53 / p16 Co-Alteration, Typ-I-Karzinome
45. **Abb. 45** Diagnostischer Algorithmus zur Klassifikation des Ovarialkarzinoms mittels IHC, modifiziert nach Köbel et al., 2014

9 Tabellenverzeichnis

1. **Tab. 1** TNM- / FIGO-Klassifikation
2. **Tab. 2** UICC-Stadium / TNM-Klassifizierung
3. **Tab. 3** Verteilungsmuster ER α
4. **Tab. 4** Verteilungsmuster PR
5. **Tab. 5** Verteilungsmuster WT1
6. **Tab. 6** Verteilungsmuster ARID1A
7. **Tab. 7** Verteilungsmuster BRCA1
8. **Tab. 8** Verteilungsmuster BRCA2
9. **Tab. 9** Verteilungsmuster EP3
10. **Tab. 10** Verteilungsmuster Her2 IHC
11. **Tab. 11** Verteilungsmuster Her2 FISH
12. **Tab. 12** Verteilungsmuster Lef1
13. **Tab. 13** Verteilungsmuster β -Catenin
14. **Tab. 14** Kreuztabelle Lef1 und β -Catenin Co-Expression, histologische Subtypen
15. **Tab. 15** Verteilungsmuster p53
16. **Tab. 16** Verteilungsmuster p16

10 Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Doris Mayr, die vom ersten Tag an die Freude für das Projekt geweckt hat und mir sowohl fachlich als auch persönlich stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ebenso möchte ich mich bei PD Dr. Elisa Schmoeckel für die aufopferungsvolle Betreuung und unermüdliche Motivation bedanken. Mein Dank gilt ebenso den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts und der Frauenklinik der LMU, insbesondere Frau Beate Luthardt, Mona Melz und Christina Kuhn. Herzlich bedanke ich mich bei meiner Mitdotorandin Dr. Sophie Bühler, die mich mit ihrer lebensfrohen Art durch Studium und Promotion begleitete. Auch Dr. Michael Hame gilt für freundschaftliche Unterstützung und fachliche Beratung herzlicher Dank. Als bedingungslose moralische Stütze und Fels in der Brandung danke ich meinen Eltern und meinem Bruder Dr. Mathias Fromberger.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Daniel Sebastian Fromberger
Geburtsdatum	16.09.1992
Geburtsort	Altötting
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1999-2003	Grundschule Ampfing
2003-2011	Gymnasium Waldkraiburg
Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife

Studium

2011-2017	Studium der Humanmedizin, LMU München
-----------	---------------------------------------

Beruf

2018-2019	Assistenzarzt Orthopädische Chirurgie und Traumatologie des Bewegungsapparates, Spital Burgdorf, Schweiz
2019-2020	Assistenzarzt Orthopädische Chirurgie und Traumatologie des Bewegungsapparates, Sonnenhof Bern, Schweiz
2020-2021	Assistenzarzt Orthopädische Chirurgie und Traumatologie des Bewegungsapparates, Spital Burgdorf, Schweiz
Ab 2021	Assistenzarzt Orthopädische Chirurgie und Traumatologie des Bewegungsapparates, Sonnenhof Bern, Schweiz

Eidesstattliche Versicherung

Daniel Sebastian Fromberger

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Vier Jahrgänge Ovarialkarzinom an der LMU München: Auf der Suche nach pathogenetischen Faktoren sowie prognostischen Biomarkern

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

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

Ampfing, 30.05.2022

Daniel Sebastian Fromberger