

Aus dem Pathologischen Institut
Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Frederick Klauschen

**Molekulargenetische Untersuchungen an seltenen Subtypen
des Ovarialkarzinoms**

-

**Mikrosatellitentestung sowie BRAF- und RAS-Analysen an
endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinomen**

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

vorgelegt von
Isabelle Beatrice Elisabeth Schnabel, geb. Markus

aus
Frankfurt am Main

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Doris Mayr
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Fabian Trillsch PD Dr. B. Ataseven Prof. Dr. Artur Mayerhofer
Mitbearbeitung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. Elisa Schmoeckel
Dekan:	Prof. Dr. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	30.03.2023

Meinen Eltern
Angelika und Bernd Markus

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
1.1	Epidemiologie des Ovarialkarzinoms	9
1.1.1	Ovarialkarzinome im weltweiten Vergleich	10
1.1.2	Vergleich der relativen 5-Jahres Überlebensrate weltweit	11
1.2	Genetik	12
1.3	Risikofaktoren	14
1.3.1	Genetische Prädisposition	14
1.3.2	Ovulation, Menarche und Menopause	15
1.3.3	Schwangerschaften	15
1.3.4	Stillen	16
1.3.5	Infertilitätsbehandlung	16
1.3.6	Endometriose	16
1.3.7	Ernährung	17
1.3.8	Hormonersatztherapie nach der Menopause	18
1.3.9	Größe und Gewicht	18
1.3.10	Alkohol und Rauchen	18
1.4	Prävention	19
1.4.1	Ovulationshemmer	19
1.4.2	Tubenligatur	19
1.4.3	Pharmakologische Prophylaxe	19
1.4.4	Operative Prävention	19
1.5	Klinische Symptomatik	21
1.6	Screeningverfahren und Diagnostik	21
1.7	Zeitpunkt der Diagnose	22
1.8	Tumorklassifikation	22
1.9	Histopathologische Subtypen des Ovarialkarzinoms	24
1.9.1	Seröse Karzinome, High-grade (HGSC) und seröse Karzinome, Low-grade serös (LGSC)	25
1.9.2	Muzinöse Karzinome	26
1.9.3	Endometrioide Karzinome	26
1.9.4	Klarzellige Karzinome	29
1.10	Abschließende Diagnostik und Therapie des Ovarialkarzinoms	30
1.11	Prognose	31
1.12	Mikrosatelliten in der DNA	32
1.12.1	Vorkommen, Funktion, Bedeutung	32
1.12.2	MMR-System und dessen Bedeutung	33

1.12.3	MSI im Zusammenhang mit dem Lynch-Syndrom und dem Ovarialkarzinom	34
1.12.4	MSI-Analysen	35
1.13	RAS-Gene und Onkogene	37
2	MATERIAL UND METHODEN	40
2.1	Studienkollektiv	40
2.2	Gewinnung von tumorhaltigem und tumorfreiem Material	45
2.2.1	Mikrodissektion (Abtragung)	45
2.2.2	Lyse des Gewebes und DNA-Extraktion mithilfe des QIAamp DNA Micro Kit®	45
2.2.3	Binden der DNA	46
2.2.4	Waschen und Trocknen	46
2.2.5	Eluieren	46
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
2.2.7	MSI-Testung mit Fragmentlängenanalyse	48
2.2.8	Pyrosequenzierung für die BRAF-und RAS-Analyse	52
2.2.9	Auswertung der Ergebnisse	56
3	ERGEBNISSE	58
3.1	Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse	58
3.2	BRAF-Analyse	62
3.3	RAS-Analyse	62
4	DISKUSSION	65
4.1	Die Erkrankung	65
4.2	Ergebnisse	65
4.3	MSI Bethesda Panel	66
4.4	Limitationen der Arbeit und Auswertung	66
4.5	Vergleich IHC und molekulargenetische Analyse	68
4.6	MSI am Ovarialkarzinom in der Literatur	69
4.7	RAS und BRAF Testung	70
4.8	BRAF und RAS Ergebnisse	70
4.9	Therapieansätze des Ovarialkarzinoms	71
4.10	Fazit und Ausblick	73
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	LITERATUR	77
7	DANKSAGUNG	90

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC-Gen:	Adenomatous Polyposis Coli Gene, deutsch: Adenomatöses Polyposis Coli Gen
ARID1A:	AT-Rich Interaction Domain 1A
BOT:	Borderlinetumor
BRCA1:	Breast cancer gene 1
BRCA2:	Breast cancer gene 2
BSO:	bilaterale Salpingo-Oophorektomie
CrC:	kolorektales Karzinom
CT:	Computertomographie
DNA/ DNS:	Desoxyribonukleinsäure
EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor
FIGO:	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GEF:	Guanin Nukleotide Exchange Factor, deutsch: GTP-Austauschfaktor
HBOC:	Hereditary breast ovarian cancer syndrome, deutsch: familiäres Brust- und Eierstockkrebsyndrom
HE:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGST:	High-grade seröses Karzinom
HNPCC:	Hereditäres Non-Polyposis Kolorektales Karzinom
IHC:	Immunhistochemie
LGSC:	Low-grade seröses Ovarialkarzinom
LOH:	loss of heterozygosity, deutsch: Verlust der Heterozygotie
MMR-System:	Mismatch-Reparatursystem
MRT:	Magnetresonanztomographie
MSI:	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H (high):	mindestens zwei MSI-Marker instabil von dem NCI/Bethesda Panel
MSI-L (low):	ein MSI-Marker instabil von dem NCI/Bethesda Panel
NSCLC:	non-small cell lung cancer, deutsch: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PARP-Inhibitor:	Poly-Adenosin-Diphosphat-Ribose-Polymerase-Inhibitor
PCR:	Polymerase-Ketten-Reaktion
PET:	Positronen-Emissions-Tomographie
RAS:	Rat sarcoma, ein Protoonkogen
Rpm:	rounds per minute, deutsch: Runden pro Minute
STIC:	High-grade serous tubal intraepithelial karzinoma, deutsch: intraepitheliales Karzinom der Tube
STRs:	Short tandem repeats
TP 53:	TP53-Tumorsuppressor-Gen
UICC:	Union internationale contre le cancer
VDR:	Vitamin D Rezeptor

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom stellt auch heute noch in Zeiten der fortgeschrittenen individuellen Therapien einen klinisch schwer zu behandelnden Tumor und weiterhin eine häufige Krebstodesursache der Frau dar. Im Jahr 2016 erkrankten 7350 Frauen in Deutschland an einem Tumor der Eierstöcke. 5486 Frauen verstarben in dem gleichen Jahr an der Krankheit (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019)). Das Ovarialkarzinom ist verantwortlich für etwa 50% der gynäkologischen Sterbefälle (s. Abb.1.1) und vertritt somit den vordersten Platz als tödlichste gynäkologische Erkrankung der Frau (Buttmann-Schweiger et al., 2019). Für das Jahr 2020 liegen dem Krebsdatenregister noch keine Zahlen vor, es wird mit einer Neuerkrankungsanzahl von etwa 7000 Frauen gerechnet (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019)).

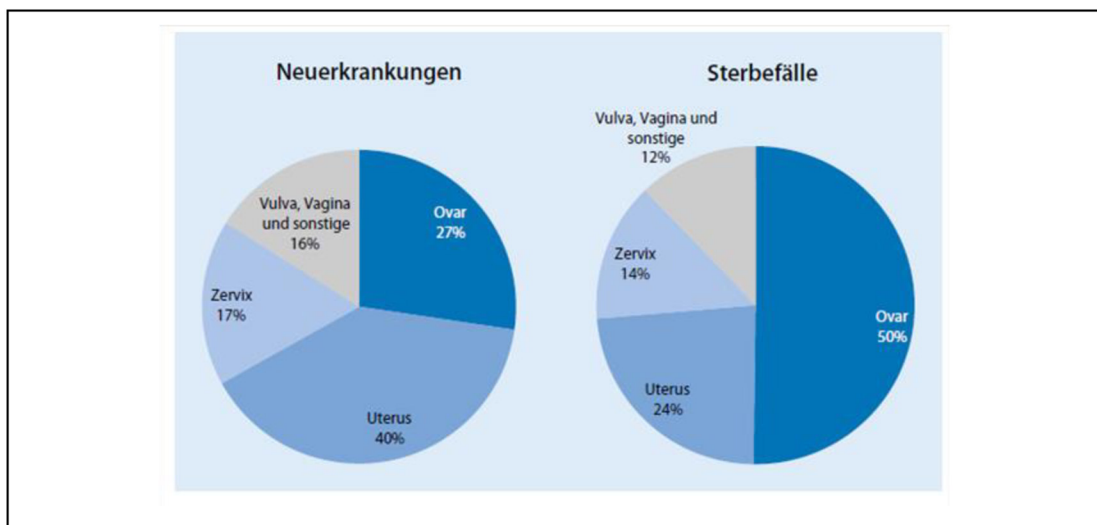


Abb.1.1: Verteilung der Neuerkrankungen (links) und Sterbefälle (rechts) an bösartigen Tumoren der weiblichen Geschlechtsorgane im Jahr 2013/2014 (Buttmann-Schweiger et al., 2019).

Statistisch gesehen ist etwa eine von 75 Frauen in ihrem Leben von der Krankheit betroffen. Bis zum 85. Lebensjahr steigen die Erkrankungsraten stetig an, zeigen sich danach aber wieder abfallend (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019)).

Tritt ein Ovarialtumor schon bei Kindern oder jungen Frauen auf, handelt es sich oft um eine seltenere Form, z. B. einen Keimzelltumor (Robert Koch-Institut (Hrsg) und

die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019)). Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter um die 45 Jahre und somit in der Summe niedriger als bei den epithelialen Ovarialkarzinomen (Buttmann-Schweiger et al., 2019).

Als genetische Vorbelastungen mit möglicher familiärer Häufung erhöhen Mutationen in *BRCA 1/2* Gen (Breast cancer gene 1/2) das Risiko, an einem Mamma- oder Ovarialkarzinom zu erkranken (Hall et al., 1990; Webb et al., 2017; Wooster et al., 1995; Yoshida, 2020). Jedoch können diese Mutationen auch bei Frauen ohne eine positive Familien- oder Eigenanamnese für Brust- oder Eierstockkrebs gefunden werden (ca. 44%) (Alsop et al., 2012). Etwa bei jeder 10. Frau spielen *BRCA1* und 2 bei der Entstehung eines Ovarialkarzinoms eine Rolle (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019)). Eine weitere vererbte Prädisposition zur Entwicklung von Tumoren stellt das Lynch-Syndrom dar. Hierbei kommt es zu Mutationen in den Genen des Mismatch-Reparatursystems (MMR-System), die in gesunder Form Replikationsfehler in der DNA bei der Zellteilung erkennen und reparieren können. Dies führt neben dem häufigen Auftreten von Darm- und Endometrium-Karzinomen ebenfalls zu einer Risikosteigerung für ein Ovarialkarzinom (Aarnio et al., 1999; Barrow et al., 2009; Boyd, 1998; Helder-Woolderink et al., 2016; Lynch et al., 1998). Auf diese beiden Tumorsyndrome wird in einem späteren Abschnitt genauer eingegangen. Teil dieser Arbeit ist es herauszufinden, wie groß der Anteil dieser durch ein defektes Mismatch-Reparatursystem verursachten Ovarialkarzinome bei den endometrioiden und klarzelligem Ovarialkarzinomen ist.

1.1.1 Ovarialkarzinome im weltweiten Vergleich

Weltweit betrachtet erkrankten im Jahr 2012 schätzungsweise 238.719 Frauen an Eierstockkrebs (Allemani et al., 2018). Verschiedene Länder und Regionen weisen dabei unterschiedliche Erkrankungszahlen auf, wie in Abbildung 1.2 (A) dargestellt. Am häufigsten tritt das Ovarialkarzinom in Nord- Zentral- und Osteuropa auf, etwas seltener in Australien, Nordamerika und Westeuropa. Dagegen verzeichnet man in einigen Regionen Asiens und auch Afrikas die niedrigsten Erkrankungsraten. In vielen Ländern mit einem hohen Durchschnittseinkommen der Bevölkerung fallen die Erkrankungszahlen in den letzten Jahren kontinuierlich ab (s. Abb. 1.2 (B), Abb. 1.3.). Im Gegensatz dazu vermerken gerade die ärmeren Länder einen Anstieg an Fällen mit Ovarialkarzinomen (Webb et al., 2017). Das höchste Risiko scheinen vor allem hellhäutige Frauen zu haben, die mit 11,3 pro 100.000 Frauen am häufigsten erkranken, gefolgt von Hispanoamerikanerinnen (9,8), Asiatinnen (9,0) und Afroamerikanerinnen mit 8,5 pro 100.000 (Stewart et al., 2019). So

erkranken in den USA hellhäutige Frauen 30 % häufiger an Ovarialkarzinomen als Afroamerikanerinnen oder asiatische Frauen und 12 % häufiger als Hispanoamerikanerinnen (Webb et al., 2017).

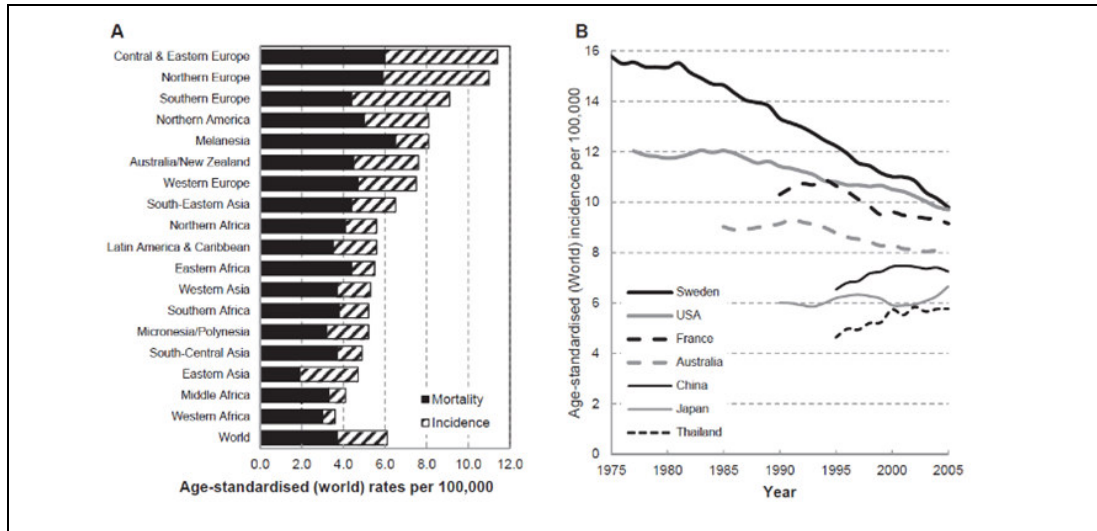


Abb. 1.2: Inzidenz und Mortalitätsrate des Ovarialkarzinoms in verschiedenen Regionen im Jahr 2012 (A) und Ländern seit 1975 (B) (Webb et al., 2017).

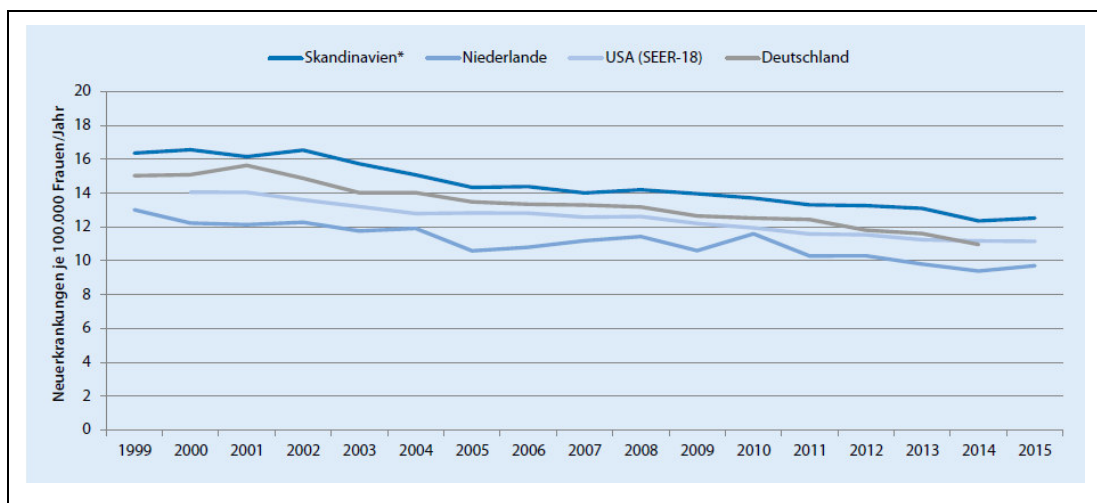


Abb. 1.3: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten des Eierstockkrebses (*inklusive bösartige Neubildungen der Tuben) im internationalen Vergleich von 1999/2000 bis 2014/2015 (Buttmann-Schweiger et al., 2019).

1.1.2 Vergleich der relativen 5-Jahres Überlebensrate weltweit

In einer ausführlichen Studie vom März 2018 (CONCORD-3) wurden Erkrankungsdaten von 865.501 Frauen aus 61 verschiedenen Ländern gesammelt.

Weltweit lagen die relativen 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 30-50 %, wobei sich Deutschland leicht über dem weltweiten Mittelwert präsentierte (Allemani et al., 2018).

Ein 5-Jahres-Überleben zwischen 40-49 % fand sich in 24 Ländern, darunter Canada und die USA, sieben Länder in Asien und 14 europäische Länder wie z. B. Deutschland, Frankreich, Schweden, Belgien und Spanien (Allemani et al., 2018). Etwas kürzer überlebten Frauen in Ländern wie beispielsweise Südamerika (Argentinien und Brasilien), aber auch in europäischen Ländern wie Italien, Kroatien, Polen und den Niederlanden (5-Jahres-Überleben 30-39 %). Die schlechteste Prognose nach Diagnosestellung verzeichneten Frauen in Malta (weniger als 30 %) und in Indien (weniger als 20 % nach 5 Jahren). In den meisten Ländern, außer Japan, veränderten sich die Überlebensraten seit 1995 kaum. Auch in Deutschland konnte zwischen den Jahren 2010-2014 keine nennenswerte Verbesserung festgestellt werden (Allemani et al., 2018).

1.2 Genetik

Das Ovarialkarzinom betreffend sind heute vor allem zwei genetische Prädispositionen oder Tumorsyndrome bekannt, die im Zusammenhang mit einer erblichen Tumorentstehung zu nennen sind. Dazu gehören das familiäre Brust- und Eierstockkrebsyndrom („hereditary breast ovarian cancer syndrome“, HBOC) und das Lynch-Syndrom, auch als familiäres nichtpolypöses Kolonkarzinomsyndrom bekannt (HNPCC- Syndrom, Hereditäres Non-Polyposis Kolorektales Karzinom Syndrom) (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Ursächlich ist hier ein Defekt der Mismatch-Reparaturgene *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6* sowie *MSH3* (De' Angelis et al., 2018; Helder-Woolderink et al., 2016; Miyaki et al., 1997; Rhyu, 1996). Laut Angaben in der Literatur finden sich vermehrt Karzinome vom nicht serösen Subtyp beim Lynch-Syndrom (Webb et al., 2017).

Je nachdem, welches Reparaturgen betroffen ist, zeigen sich Unterschiede in der Erkrankungswahrscheinlichkeit. Bei Frauen mit einem Defekt des Reparaturgens *MLH1* besteht ein Risiko von 41 %, bis zum Alter von 70 Jahren an Darmkrebs (Kolorektales Karzinom- CrC) zu erkranken und ein 20 %iges Risiko für das Auftreten eines Ovarialkarzinoms. Die hereditäre *MSH2* Mutation geht mit einem 48%igen Risiko für ein CrC und 24%igem Risiko für den Eierstocktumor einher. Das geringste Erkrankungsrisiko zeigten in der Studie *MSH6*-Träger sowohl beim Darmkrebs (12 %) als auch beim Ovarialkarzinom (ca. 1 %) (Bonadona et al., 2011; Moller, 2020). Dowty et al. berichtet dagegen von einem 13 %igen Risiko bei *MLH1* Mutation bis 70 Jahre an Eierstockkrebs zu erkranken und 10 % bei pathologischer *MSH2* Anlage (Dowty et al., 2013). Eine weitere

Studie folgerte ein kumulatives Auftreten eines Ovarialkarzinoms bis zum Alter von 75 Jahren um die 10 % bei *MLH1* Trägerinnen, 17 % bei *MSH2* und 13 % bei *MSH6* Trägerinnen (Moller et al., 2018). Weitere Studien zur Bedeutung der Lynch-Syndrom- assoziierten Gene sollten noch angeschlossen werden, da die Studienlage zu den Reparaturgenen und der Erkrankungswahrscheinlichkeit bei Dysfunktion dieser noch nicht ganz eindeutig ist. Laut Bonadona et al. kann besonders bei defekter *MLH1* und *MSH2* Anlage eine prophylaktische Adnexektomie in Erwägung gezogen werden, um das Eierstockkrebsrisiko zu senken. Hierbei muss jedoch der Zeitpunkt der Operation bedacht werden, da eine Risikoerhöhung nicht pauschal, sondern vor allem ab dem 40. Lebensjahr auftritt (Bonadona et al., 2011). Ein Großteil der Ovarialkarzinome beim Lynch-Syndrom werden jedoch in einem früheren Stadium diagnostiziert und weisen eine bessere Prognose auf (Helder-Woolderink et al., 2016; Ketabi et al., 2011).

Bei dem familiären Brust- und Eierstockkrebsyndrom werden vor allem *BRCA1* und *BRCA2* Mutationen detektiert (Hall et al., 1990; Webb et al., 2017; Wooster et al., 1995; Yoshida, 2020), welche physiologisch als Tumorsuppressorgene agieren. Die meisten mit *BRCA1/2* assoziierten Karzinome sind high-grade seröse Tumoren (Webb et al., 2017). Andere Risikogene, wie z. B. *RAD51C* oder *BRIP1* können ebenfalls ursächlich sein, zeigen aber im Allgemeinen eine moderate Risikosteigerung (Ramus et al., 2015; Song et al., 2015; Webb et al., 2017). *CHECK2*, *WNT4*, *TERT* und *ABO* sind weitere Beispiele für Genloci, die allesamt mit einer geringen Risikoerhöhung verbunden sind (Webb et al., 2017).

Frauen mit einer *BRCA1* Mutation erkranken bis zu einem Alter von 80 Jahren zu 72 % an Brustkrebs und zu 44 % an Eierstockkrebs. *BRCA2* Trägerinnen hingegen entwickeln meist einige Jahre später ein Mammakarzinom (in 69 %). Ovarialkarzinome treten bei *BRCA2* mit einer Wahrscheinlichkeit von 17 % auf und sind somit weniger häufig als bei *BRCA1* (Kuchenbaecker et al., 2017).

In einer Studie von Harter et al., auf die mehrfach in der Leitlinie Bezug genommen wird, wurde in einem Kollektiv von Ovarialkarzinomen das Vorhandensein von deletären Keimbahnmutationen in *BRCA 1/2* sowie 25 weiteren Genen untersucht. 16 Gene davon wurden als „Krebs-Risiko-Gene“ weiter spezifiziert (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NBN*, *PMS2*, *PTEN*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53*). Eingeschlossen waren in diese Untersuchungen auch die mit dem Lynch-Syndrom assoziierten Gene (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) (Harter et al., 2017).

In 27,9 % konnte mindestens eine Mutation in den untersuchten 25 Genen und in 26,4 % in den 16 „Krebs-Risiko-Genen“ festgestellt werden. Am häufigsten wurden

Mutationen in den Hochrisiko-Genen *BRCA1* (15,5 %), sowie *BRCA2* (5,5 %), *RAD51C* (2,5 %) und *PALB2* (1,1 %) nachgewiesen. Bei Erkrankung vor dem 60. Lebensjahr fanden sich *BRCA 1/2* Mutationen mit 30,2 %, sowie auch familiäre Belastung mit 31,6 % deutlich häufiger. Drei Patientinnen von über 599 Fällen konnten positiv auf ein Lynch-Syndrom getestet werden (0,6%). Harter et al. fordert anschließend, dass prinzipiell allen Patientinnen mit der Diagnose Ovarialkarzinom eine genetische Testung angeboten werden sollte (Harter et al., 2017). Dies wurde auch in die Leitlinie aufgenommen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es empfohlen, Patientinnen mit dem Verdacht auf ein Lynch-Syndrom über eine genetische Testung zu informieren (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Durch die Diagnose von Frauen mit einem Risikoprofil ergeben sich neue Möglichkeiten der Krebsverhinderung z. B. durch eine frühzeitige prophylaktische Operation.

1.3 Risikofaktoren

Die Symptome des Ovarialkarzinoms sind unspezifisch und werden oft erst in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium diagnostiziert (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019)). Umso wichtiger ist es, die Risikofaktoren dieser Krankheit zu kennen, um möglichst auf der präventiven Seite agieren zu können. Des Weiteren bestehen für Risikopersonen das Angebot zur Beratung und genetischen Testung (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020).

1.3.1 Genetische Prädisposition

Wie bereits erwähnt, liegen in der Gynäkologie insbesondere die Tumorsyndrome HBOC (Hereditary breast and ovarian cancer syndrome) sowie das Lynch-Syndrom (HNPCC - hereditary non-polyposis colorectal cancer) zugrunde, welche auf einer genetischen Prädisposition beruhen (s. Kapitel 1.2). Eine hohe Zahl der hereditären Karzinome wird, soweit man heute weiß, im Zusammenhang mit *BRCA 1/2* verursacht. Von allen Ovarialkarzinomen zeigen sich etwa 13-15 % *BRCA1/2* mutiert (Pal et al., 2005; S. Zhang et al., 2011), besonders häufig die high-grade serösen Karzinome (23 %) (Alsop et al., 2012). Bei hereditären Ovarialkarzinomen sind in etwa 65-85% der Fälle *BRCA* Mutationen zu finden, in etwa 10-15 % ist das Lynch-Syndrom ursächlich (Ketabi et al., 2011; Webb et al., 2017).

1.3.2 Ovulation, Menarche und Menopause

Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl an Ovulationen, die eine Frau in ihrem Leben durchläuft und dem Risiko, an einem Eierstockkrebs zu erkranken. Ursächlich ist wahrscheinlich eine proinflammatorische Reaktion des Eileiter nach jeder Ovulation, welche als Ursprungsort der Krebsentstehung für einige Ovarialkarzinome vermutet wird (Stewart et al., 2019).

Bei Frauen mit positivem *BRCA* Status wurden vor allem in den Tuben nach prophylaktischer Operation Vorstufen seröser Karzinome gefunden, sogenannte STIC (high-grade serous tubal intraepithelial carcinoma; intraepitheliales Karzinom der Tube). Es konnte in einer Studie gezeigt werden, dass STIC in bis zu 71 % der untersuchten Ovarialkarzinome zu finden war (Kindelberger et al., 2007). Somit wurden weitere Hinweise gefunden für einen potenziellen kausalen Zusammenhang in der Krebsentwicklung zwischen Ovarial- und Tubenkarzinom. Folglich stellt das intraepitheliale Karzinom der Tube eine relevante Vorläuferläsion des Ovarialkarzinoms dar (Kindelberger et al., 2007).

Inwiefern das Alter bei Beginn der Regelblutung Auswirkungen auf das Krebsrisiko hat, konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden. Nur bei dem klarzelligem Tumortyp vermag ein später Beginn das Risiko zu senken. Entscheidend wirkt sich das Alter bei Beginn der Menopause aus. Eine fünf Jahre später einsetzende Menopause soll mit einer Risikoerhöhung von 6 % einhergehen. Zusätzlich wurde dabei vermehrt das Auftreten von endometrioiden und klarzelligem Ovarialkarzinomen detektiert (19 % und 37 %). Eine Assoziation für den muzinösen Tumortyp konnte nicht gefunden werden (Webb et al., 2017).

1.3.3 Schwangerschaften

Viele Schwangerschaften vermindern die Rate an Ovulationen und wirken somit protektiv. Demzufolge haben Frauen, die keine Kinder geboren haben, ein erhöhtes Risiko zu erkranken. Jede weitere Schwangerschaft soll eine Risikoreduktion von ca. 10-20 % bewirken. Besonders stark soll sich dies auf endometrioide und klarzellige Tumoren auswirken, im Allgemeinen aber für alle epithelialen Ovarialkarzinome gültig sein (Webb et al., 2017). Unvollendete Schwangerschaften durch eine Fehlgeburt oder Abtreibung sollen ebenfalls eine Risikoreduktion von 14 % bei der ersten bis 20 % bei zwei unvollständigen Schwangerschaften bewirken (A. W. Lee et al., 2020).

Weiterhin gibt es Unstimmigkeiten über die Auswirkung des Alters der Mutter bei Geburt. Eine Schwangerschaft mit Zwillingen vermag im Vergleich zu einem Kind das

Risiko stärker senken. In der Zukunft sind hier weitere Beobachtungen vonnöten (Webb et al., 2017).

1.3.4 Stillen

In einigen Studien wurde das Erkrankungsrisiko von Frauen, die ihr Kind stillen, mit dem von nicht stillenden Frauen verglichen. Es konnte eine Risikoreduktion für stillende Frauen von ca. 20-25 % gefolgert werden. Je länger ein Kind gestillt wurde, desto höher fiel die Reduktion aus. Diese Ergebnisse konnten von weitere Kohortenstudien vorerst nicht reproduziert werden (Webb et al., 2017).

1.3.5 Infertilitätsbehandlung

Aktuell besteht noch Uneinigkeit bezüglich der Auswirkungen von ovariellen Stimulationstherapien auf die Erkrankungsrate. Die meisten Studien zu dieser Thematik analysierten kleine Fallzahlen oder zeigten Schwächen bei der Nachverfolgung der Patientinnen. Eventuell vermag es zu einer erhöhten Rate an Borderlinetumoren kommen (Webb et al., 2017).

1.3.6 Endometriose

Endometriose ist eine häufige Erkrankung der Frau meist im reproduktionsfähigen Alter. Insgesamt sind etwa 8- 10 % der Frauen betroffen. Allerdings variieren die Zahlen in der Literatur, man geht von einer höheren Dunkelziffer aus. Deutlich häufiger ist die Endometriose bei Frauen mit Infertilität zu finden. Ein familiäres Auftreten wird beobachtet. Ursächlich ist ein Vorkommen von Endometrium-ähnlichen Zellen außerhalb der Gebärmutter. Endometrioseherde lassen sich intra- oder extragenital bis hin zu extraabdominell (z.B. im Gehirn) feststellen. Klinisch präsentiert sich die Endometriose vielfältig, unter anderem mit Dysmenorrhö, Dyspareunie, Unterleibsschmerzen bis hin zur Infertilität. Auch asymptomatische Verläufe sind möglich (Barbieri et al., 2002; Cramer et al., 2002; Farland et al., 2019; Wheeler, 1989).

Erstmals wurde die Endometriose 1860 beschrieben. Jedoch ist bis heute die genaue Ursache und Pathogenese der Endometriose noch nicht ausreichend geklärt. Als ursprüngliche und gängigste Hypothese gilt weiterhin, dass es während der Monatsblutung zu einer retrograden Menstruation kommt mit Verschleppung von Endometriumzellen über die Eileiter in den Bauchraum (Sampson, 1922). Im weiteren Verlauf heften sich die Endometriumzellen an das Peritoneum oder ein anderes Gewebe an, wachsen dort teils invasiv ein und etablieren eine eigene Blutversorgung. Durch eine fehlerhafte

Immunantwort bleiben die Endometrioseherde bestehen. Da es sich um hormonabhängige Zellen aus dem Uterus handelt, wachsen diese jeden Monat unter Östrogeneinfluss im Rahmen des weiblichen Zyklus weiter heran (Giudice et al., 2004).

Es gibt Hinweise, dass Endometriose ein erhöhtes Risiko für einige epitheliale Ovarialkarzinome bedingt, besonders endometrioide und klarzellige Karzinome. So können sich Endometrioseherde am Ovar über einen Zeitraum in invasive Ovarialkarzinome entwickeln. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar. Frauen, die erkranken, sind häufig jüngeren Alters, zeigen aber eine etwas bessere Prognose auf. Die Entfernung von Endometrioseherden konnte bisher in Studien keine Risikoreduktion erbringen (Anglesio et al., 2017; Bulun et al., 2019; Matias-Guiu et al., 2018; Stewart et al., 2019).

1.3.7 Ernährung

Eine ballaststoffreiche Ernährung ist allgemein als gesund bekannt. Auch für das Ovarialkarzinom gibt es Hinweise, dass eine ballaststoffreiche Ernährung im Vergleich zu einer ballaststoffarmen Kost die Wahrscheinlichkeit, am Ovarialkarzinom zu erkranken senkt (Huang et al., 2018). Auch dem erhöhten Konsum von Soja wird ein protektiver Effekt zugesprochen (Myung et al., 2009). Außerdem soll ein niedriger Spiegel an Vitamin D das Erkrankungsrisiko erhöhen, eventuell kann für Frauen mit Vitamin D Mangel eine Ergänzung sinnvoll sein (Guo et al., 2018). Studien konnten zudem ein erhöhtes Vorkommen des Vitamin D Rezeptors (VDR) in Ovarialkarzinomen nachweisen. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein hohes Level an VDR im Cytoplasma mit einem höheren FIGO Stadium assoziiert war, sowie einem positiven Lymphknotenstatus und einem kürzeren Gesamtüberleben. Inwiefern VDR als Biomarker zu verwendet ist und welche Bedeutung es in der Pathogenese des Ovarialkarzinoms hat, sollte in weiteren Studien analysiert werden (Czogalla et al., 2020).

Ebenso soll der regelmäßige Verzehr von Grüntee einen gesundheitsfördernden und auch protektiven Effekt innehaben. Einige Studien verdeutlichten, dass die Inhaltsstoffe von Grüntee zu einer Abschwächung der Expression von Proteinen führen können, die an Entzündungsreaktionen, Zelltod und Angiogenese beteiligt sind. Es gibt Hinweise, dass Grüntee den Effekt einer Chemotherapie mit Cisplatin durch Verstärkung der Apoptose unterstützen kann (Trudel et al., 2012). Weitere Untersuchungen müssen hierbei angeschlossen werden, da die bisherigen Ergebnisse noch keine vollständige Gewissheit darstellen.

1.3.8 Hormonersatztherapie nach der Menopause

Die Auswirkungen der Hormonersatztherapie konnten in vielen Studien bereits analysiert werden. Schlussfolgerung dieser Analysen war, dass der Gebrauch einer Hormonersatztherapie das Risiko für Ovarialkarzinome um ca. 40 % steigert. Diese Risikoerhöhung blieb auch nach Beendigung der Therapie weiter bestehen, wenn das Präparat für mindestens fünf Jahre eingenommen wurde. Vor allem die alleinigen Östrogenpräparate sollen im Vergleich zu den kombinierten Hormonersatztherapien vermehrt das Auftreten von Karzinomen der Eierstöcke begünstigen. Häufig wurden seröse und endometrioid Ovarialkarzinome detektiert. Seltener war es zum Auftreten von klarzelligen Ovarialkarzinomen gekommen (Webb et al., 2017).

1.3.9 Größe und Gewicht

Laut des „American Institut for Cancer Research“ besteht eine Assoziation der Körpergröße mit dem Risiko zu erkranken. So wurde für Frauen eine Risikosteigerung von 8 % pro 5 cm Körpergröße berechnet (World Cancer Research Fund International, 2015, September 15).

Ein weiterer Risikofaktor ist Übergewicht, wobei in einigen Studien noch Unklarheit über die Stärke der Assoziation besteht. Ursächlich für die Tumorgenese bei Übergewicht könnte eine verstärkte Produktion von Östrogenen sowie eine chronisch-entzündlichen Reaktion im Körper sein. Dabei gibt es Hinweise, dass es sich bei einer Risikoerhöhung vor allem um die klarzelligen, muzinösen und endometrioiden Karzinome handelt (Tworoger et al., 2016; Webb et al., 2017).

1.3.10 Alkohol und Rauchen

Alkohol gilt als gesicherter Risikofaktor für die Entstehung von Brustkrebs. Allerdings deuten Studien darauf hin, dass keine Assoziation zwischen dem Konsum von Alkohol und dem vermehrten Auftreten von Ovarialkarzinomen besteht (Kelemen et al., 2013; Webb et al., 2017).

Raucher erkranken im Allgemeinen etwas häufiger an Ovarialkarzinomen. Besonders stark vertreten sind laut Literaturangaben dabei die muzinösen Karzinome mit einer Risikosteigerung von bis zu 50 % und die invasiven muzinösen Borderlinetumoren (bis zu 130 %). Die Anzahl der Raucherjahre ist dabei von Bedeutung. Die Rate an serösen Ovarialkarzinomen zeigte sich in Studien unverändert. Eventuell besteht eine Risikoreduktion für endometrioid und klarzellige Ovarialkarzinome (Beral et al., 2008; Webb et al., 2017).

1.4 Prävention

1.4.1 Ovulationshemmer

Wie in einem vorderen Abschnitt beschrieben, steigt das Risiko der Erkrankung mit der Anzahl der Ovulationen. Es ist deshalb eine mögliche Schlussfolgerung, dass durch den Einsatz von kombinierten Ovulationshemmern die Rate an Neuerkrankungen sinkt (Stewart et al., 2019). Der Gebrauch von oralen Kontrazeptiva zeigte in einer großen Analyse eine Risikoreduktion von annähernd 30 %. Je länger die Ovulationshemmer eingenommen wurden, desto stärker zeigte sich der Effekt. Eine fünfjährige Einnahme reduzierte das Risiko um weitere 20 %. Dieser protektive Effekt soll, auch nach Absetzen, voraussichtlich für etwa 30 Jahre anhalten (Webb et al., 2017). Seit Jahren ist der weltweite leichte Abfall der Neuerkrankungsraten für das Ovarialkarzinom wahrscheinlich zum Teil durch den Einsatz kombinierter Ovulationshemmer zu erklären.

1.4.2 Tubenligatur

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Ligatur der Tuben mit einer Risikoreduktion von 20-30 %, vor allem von endometrioiden und klarzelligem Ovarialkarzinomen, einhergeht. Auch für Frauen mit *BRCA* Mutation konnte sich hierbei eine Risikoreduktion finden (Webb et al., 2017).

1.4.3 Pharmakologische Prophylaxe

Bezüglich der Gabe von Aspirin in niedriger Dosierung gibt es unterschiedliche Studienergebnisse, die entweder eine Risikoreduktion beschreiben oder gleichbleibende Risikoprofile folgerten. Im Allgemeinen besteht die Theorie, dass anti-inflammatorische Medikamente die Entstehung von verschiedenen Tumoren, eingeschlossen den Ovarialkarzinomen, beeinflussen könnten (Stewart et al., 2019; D. Zhang et al., 2016).

1.4.4 Operative Prävention

Da sich bis heute weder in der Normalbevölkerung noch bei Mutationsträgerinnen ein effektives Screeningverfahren etablieren konnte, empfiehlt die Leitlinie (level of evidence 2+) bei Frauen mit einem anlagebedingten erhöhten Risiko eine prophylaktische bilateralen Salpingo-Oophorektomie (BSO) anzubieten bzw. nach Abschluss des Kinderwunsches durchzuführen (Rebeck et al., 2009). Hierdurch kann eine Risikoreduktion zwischen 80 bis über 90 % erreicht werden (Finch et al., 2014; Marchetti et al., 2014; S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Eine eindeutige Empfehlung, ab welchem Alter operiert werden soll, bestehe nicht mehr, da auch schon für Frauen um die

30 Jahre mit der Operation eine Risikoreduktion zu vermerken sei. Bei einer Entscheidung sollte die genetische Anlage von z.B. *BRCA1/2*, die Familienanamnese sowie ein noch bestehender Kinderwunsch zur individuellen Zeitpunktbestimmung der Operation berücksichtigt werden.

In der Vergangenheit erhielten vor allem Frauen mit nachgewiesener *BRCA* Mutation das Angebot zur prophylaktischen Operation. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der AGO-Studiengruppe (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020) konnten zuletzt weitere Risikogene für die Entstehung von Ovarialkarzinomen detektiert werden (z. B. *RAD51C*). Frauen mit selteneren Mutationen könnten ebenfalls einen Nutzen aus einer prophylaktischen Salpingo-Oophorektomie (BSO) ziehen. Die Evidenz ist hierbei noch unsicher, weshalb vorerst eine Beratung angeboten werden soll. Der Nutzen der prophylaktischen Operation bei diesen Krebsrisikogenen ist erstmalig neben der *BRCA* Anlage in die Leitlinie aufgenommen und diskutiert worden (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Eine Zusammenfassung von Faktoren, die ein höheres beziehungsweise niedrigeres Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms bedingen, wird in Tabelle 1 dargestellt.

Assoziation	erhöhtes Risiko	erniedrigtes Risiko
bewiesen	positive Familienanamnese für Ovarialkarzinome	Schwangerschaft
	Endometriose (v.a. für endometrioiden und klarzellige Karzinome)	Orale Kontrazeptiva
	Rauchen (v.a. für muzinöse Karzinome)	Tubensterilität
	Hormonersatztherapie (v.a. die alleinige Östrogengabe)	
	Übergewicht (v.a. für nicht-HGSC)	
wahrscheinlich	später einsetzende Menopause	Stillen
möglich	früher einsetzende Menarche	höheres Alter der Mutter bei der Geburt des letzten Kindes
	kombinierte Hormonersatztherapie	Aspirin
	Unterleibsentzündungen (v.a. für Borderlinetumore)	Vitamin D
	Diabetes mellitus	
	Talk-Puder (genitale Anwendung)	
unwahrscheinlich oder unzureichend belegt	Infertilitätsbehandlung, Hysterektomie ohne Oophorektomie, polyzystisches Ovarialsyndrom, Alkohol, Diät, körperliche Aktivität, Zysten im Ovar	

Tabelle 1: Zusammenfassung der Risikofaktoren sowie der protektiven Faktoren des epithelialen Ovarialkarzinoms, aus dem Englischen übersetzt (Webb et al., 2017).

1.5 Klinische Symptomatik

Die Symptome des Ovarialkarzinoms werden allgemein als unspezifisch charakterisiert, weshalb 76 % der Frauen in einem fortgeschrittenen Stadium III und IV diagnostiziert werden (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019)).

Viele der Symptome werden auch ohne pathologischen Hintergrund hin und wieder beim Gesunden erlebt. Ähnliche Beschwerden werden zum Beispiel bei der Menstruation oder Menopause, sowie dem Reizdarm-Syndrom beobachtet (Ebell et al., 2016).

Symptome des Ovarialkarzinoms, die oft nachträglich berichtet werden, sind (Bankhead et al., 2005; S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020; Stewart et al., 2019):

- Völlegefühl
- Blähungen
- Bauchschmerzen
- Vermehrtes Wasserlassen
- Veränderung der Verdauung und des Stuhlgangs
- Zunahme des Bauchumfangs
- Zyklusunregelmäßigkeiten oder Zwischenblutungen

Als behandelnde Ärztin/ behandelnder Arzt ist es von Bedeutung, diese Symptome in potenzieller Assoziation mit dem Ovarialkarzinom zu erkennen und vor allem bei Frauen mit Risikokonstellation frühzeitig weitere Diagnostik einzuleiten (Stewart et al., 2019).

1.6 Screeningverfahren und Diagnostik

Bis heute konnte kein geeignetes Screeningverfahren für das Ovarialkarzinom etabliert werden. Auch die Leitlinie empfiehlt der Normalbevölkerung kein generelles Screening, dies gilt auch für Risikopatientinnen (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Mehrere Studien, die asymptomatische Frauen mit Ultraschall und/oder dem Tumormarker CA 125 untersuchten, konnten keinen signifikanten Unterschied in der Krebssterblichkeit zu einer nicht gescreenten Gruppe feststellen (Buys et al., 2011; Henderson et al., 2018; Jacobs et al., 2016).

CA 125 als Tumor- und Screeningmarker zeigte in den Analysen eine zu geringe Sensitivität und Spezifität. Zum Beispiel konnten in einem anfänglichen Tumorstadium nur etwa bei der Hälfte der Fälle eine Erhöhung von CA 125 gemessen werden (Stewart et al., 2019). Darüber hinaus gibt es viele weitere Ursachen, die zu einem Anstieg des

Tumormarkern im Blut führen können. Ursächlich für eine CA 125 Erhöhung sind beispielsweise eine Schwangerschaft, Leberzirrhose, Endometriose oder Myome im Uterus (Bergmann et al., 1986; Halila et al., 1986; Kim et al., 2019).

Bei Verdacht auf einen Ovarialtumor sollte vorerst eine gynäkologische Tastuntersuchung mit anschließender transvaginaler Sonographie durchgeführt werden. Im weiteren Verlauf können radiologische oder nuklearmedizinische Bildgebungen, wie z. B. die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) oder die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Aussagen bezüglich der Tumorausbreitung geben und zum Staging dienen (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020).

1.7 Zeitpunkt der Diagnose

Zumeist erfolgt die Diagnose in einem fortgeschrittenen Tumorstadium: 49 % der Frauen befinden sich bei Erstdiagnose in einem UICC-Stadium III, 27 % im Stadium IV (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019)).

1.8 Tumorklassifikation

Die Einteilung des Ovarialkarzinoms erfolgt je nach Histologie oder Ausbreitung nach den FIGO-Stadien speziell für gynäkologische Tumoren (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) und/oder der TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer). Beide Einteilungen sind in Tabelle 2 nebeneinander dargestellt. Die TNM Klassifikation beschreibt dabei den histologischen Ausbreitungsgrad eines Tumors und ist spezifisch für jede Tumorform. Mit den drei Buchstaben TNM werden zuerst der Tumor- (T), dann der Lymphknoten- (N, Nodus) und zuletzt der Metastasenstatus beschrieben.

	FIGO	Definition
TX		Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
T0		Kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor auf die Ovarian oder Tuben beschränkt
T1a	IA	auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1b	IB	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1c	IC	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte:
T1c1	IC1	iatrogene Kapsel- (Serosa-)ruptur
T1c2	IC2	präoperative Kapsel- (Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
T1c3	IC3	maligne Zellen im Ascites oder in der Spülzytologie nachweisbar

	FIGO	Definition
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
T2b	IIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3		Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1 i	Metastasen ≤ 10 mm
N1b	IIIA1 ii	Metastasen > 10 mm
T3a jedes N	IIIA2	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b jedes N	IIIB	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c jedes N	IIIC	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
M1a	IVA	Pleuraerguß mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinale Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

Tabelle 2: TNM und FIGO Klassifikation der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumoren, 2021).

1.9 Histopathologische Subtypen des Ovarialkarzinoms

Die Gesamtheit der Ovarialtumoren kann in drei große Gruppen unterteilt werden, die sich jeweils durch Ursprungsort, Dignität, Histologie und Prognose voneinander unterscheiden (Javadi et al., 2016). Epitheliale Tumoren treten mit Abstand am häufigsten auf und sind für etwa 60 % aller Ovarialtumoren verantwortlich, gefolgt von den Keimzelltumoren mit 25 % und den deutlich selteneren Keimstrang-Stroma-Tumoren (ca. 7 %) (Javadi et al., 2016). In dieser Arbeit soll nachfolgend auf die Pathologie der Karzinome näher eingegangen werden.

Durch ein besseres Verständnis der Tumorgenese können Ovarialkarzinome seit einigen Jahren in die Typ I und Typ II Tumoren eingeteilt werden, die sich in grundlegenden molekularen Eigenschaften voneinander unterscheiden (Shih et al., 2004). Zu den Typ I Tumoren werden die low-grade serösen Karzinome (LGSC), muzinösen-, endometrioiden- und klarzelligigen Karzinome gezählt. Besonders häufig finden sich hierbei Mutationen von *BRAF* und *KRAS* beim LGSC sowie eine Mikrosatelliteninstabilität bei endometrioiden Karzinomen (Shih et al., 2004). Als potenzielle Risikofaktoren stehen die Endometriose und Borderlinetumoren als Ausgangsläsionen sowie häufige Ovulationen und Entzündungsprozesse unter Verdacht (Shih et al., 2004; Stewart et al., 2019). Typ I Tumoren zeigen insgesamt eine geringere zelluläre Proliferationsrate und somit eine etwas bessere Prognose als Typ II Tumoren (5-Jahres-Überleben von etwa 55% im Vergleich zu etwa 30 % beim Typ II). Jedoch zeigen die Typ I Tumoren häufig ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie (Shih et al., 2004).

Bei den Typ II Tumoren stellen die high-grade seröse Karzinome (HGSC) einen Großteil der Tumoren dar. Typischerweise finden sich hierbei Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* sowie *BRCA1/2* (Jayson et al., 2014). Typ II Tumoren zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate, ein aggressives Wachstum und einem geringeren 5-Jahres-Überleben aus (Shih et al., 2004).

Histologisch erfolgt die Einteilung der Ovarialkarzinome in mehrere Subtypen mit verschiedenen Häufigkeiten und Eigenschaften. Unter den epithelialen Tumoren, die 90 % der Ovarialtumoren ausmachen, ist das high-grade seröse Karzinom (HGSC) mit 70 % am stärksten vertreten, gefolgt von den endometrioiden (10 %), klarzelligigen (10 %) und den muzinösen Karzinomen (3 %). Low-grade seröse Karzinome (LGSC) sind deutlich seltener zu finden (< 5 %) (Javadi et al., 2016).

Im Jahr 2020 wurde die letzte überarbeitete WHO-Klassifikation (2020) der Ovarialtumoren veröffentlicht. Die aus vorherigen Studien gewonnenen Ergebnisse konnten bei der neuen Klassifikation berücksichtigt werden, unter anderem wurden neue

Kombinationstherapien in der First-Line vorgestellt (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumoren, 2021). Seit einigen Jahren werden die Ovarial-, Tuben- und Peritonealkarzinome gemeinsam in einer TNM und FIGO Klassifikation beschrieben. Das Ovarialkarzinom kann seitdem nicht mehr als eine fest definierte Tumorform interpretiert werden, sondern ist als Überbegriff für eine variable Gruppe von Tumoren zu verstehen, die sich in Ursprung, Pathogenese und Prognose voneinander unterscheiden (Meinhold-Heerlein et al., 2016).

Bezüglich der Tumorentstehung basierte früher die Theorie auf der Annahme, alle Ovarialkarzinome würden von dem Oberflächenepithel des Ovars entspringen. Diese Theorie mag auch weiterhin für einen Teil der Tumoren geltend sein, jedoch bestehen Hinweise auf eine alternative Pathogenese. Nachfolgende Studien konnten weitere Beweise sammeln, dass es bei einem Großteil der serösen high-grade Karzinome, v.a. den *BRCA1* und 2 assoziierten, zu einer primären Tumorentstehung in den Tuben gekommen war. Dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen Tuben- und Ovarialkarzinomen gibt, ist zumindest bei einem Teil der Fälle gesichert (Kindelberger et al., 2007).

1.9.1 Seröse Karzinome, High-grade (HGSC) und seröse Karzinome, Low-grade serös (LGSC)

Die serösen Ovarialkarzinome bestehen aus zwei komplett unterschiedlichen Tumoren, dem high-grade serösen Karzinom (HGSC, bis 90 %) und dem deutlich selteneren low-grade serösen Ovarialkarzinom (LGSC, 10 %). Diese beiden Formen unterscheiden sich, wie in einem vorderen Abschnitt schon angedeutet, in der Pathogenese, ihren molekularen Merkmalen, der Klinik, dem Tumorwachstum und somit der Prognose. So erkrankten Frauen mit einem LGSC im Durchschnitt etwas früher, zeigen aber insgesamt ein längeres Überleben. Die Tumorentstehung geht, im Gegensatz zum HGSC, meist primär vom Ovar aus (Stewart et al., 2019).

Beim HGSC besteht durch ein aggressives und schnelles Tumorwachstum eine deutlich schlechtere Prognose. Mutationen von *TP53* (*TP53*-Tumorsuppressor-Gen) bedingen den Ausfall von Reparaturprozessen und fehlender Apoptoseinduktion bei irreparablen DNA-Schäden (Lheureux et al., 2019). Bei Frauen mit *BRCA* Anlage ist das HGSC der häufigste Tumortyp (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Als Ursprungsort der Krebsentwicklung für einen Großteil der serösen high-grade- Karzinome wird neben der klassischen Theorie der Tumorentstehung aus Ovariepitel auch die Tube vermutet (STIC).

1.9.2 Muzinöse Karzinome

Muzinöse Karzinome treten am seltensten von allen Ovarialkarzinomen auf (3 %). Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung ist im Vergleich zum serösen Ovarialkarzinom geringer. Dabei sind 26 % der erkrankten Frauen jünger als 44 Jahre (Morice et al., 2019). Histologisch findet sich eine intestinale Differenzierung, weshalb ein primäres Karzinom des Magen-Darm-Traktes ausgeschlossen werden sollte (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Beidseitiger Befall und peritoneale Mitbeteiligung stellen einen Hinweis dar, dass möglicherweise eine Metastasierung aus dem Gastrointestinaltrakt vorliegt (Meinhold-Heerlein et al., 2016). Es werden zwei verschiedene Formen des Wachstums beschrieben: ein expansiles und ein infiltratives (De Leo et al., 2021).

In bis zu 65 % werden bei muzinösen Tumoren *KRAS*-Mutationen detektiert. Typischerweise zeigen diese *KRAS*-Tumoren eine große Tumormasse mit einem Durchmesser von >15 cm auf (Morice et al., 2019). Die Diagnose erfolgt meist in einem frühen Stadium bei einer exzellenten 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium IA von >90 % (Crane et al., 2018). Liegt bereits eine Metastasierung vor, sinkt die Überlebensrate auf 12-33 Monate (Morice et al., 2019).

Typische Risikofaktoren des serösen Ovarialkarzinoms wie Kinderlosigkeit, späte Menopause oder *BRCA* Mutation zeigten sich als nicht auf das muzinöse Karzinom übertragbar. Als einziger gesicherter Risikofaktor gilt das Rauchen (Morice et al., 2019).

1.9.3 Endometrioides Karzinome

Etwa 10 % der Ovarialkarzinome sind endometrioides Karzinome (Javadi et al., 2016). Als ein gesicherter Risikofaktor für die Tumorentstehung gelten endometrioides Drüsen als Folge von Endometriose. Endometriose bezeichnet das Vorkommen von Endometriumzellen außerhalb der Gebärmutter. Die für diesen Tumor typischen Drüsenformationen sind in Abbildung 1.4 und 1.5 zu erkennen. Anhand ihres Wachstums werden sie in G1 (weniger als 5 % solides Wachstum) bis G3 (mehr als 50 % solides Wachstum) klassifiziert (De Leo et al., 2021).

Welche gemeinsamen Prozesse bei der Tumorentstehung und Endometriose eine Rolle spielen, wurde in mehreren Punkten diskutiert: Fehlerhafte Immunreaktionen als Stimulator für die Entstehung weiterer Endometrioseherde, ein Übermaß an Östrogen begleitend mit einem Mangel an Progesteron und eine Dysbalance von Steroidhormonen (Ness, 2003). Diese Prozesse spielen bei der Entstehung beider Erkrankungen eine zentrale Rolle, weshalb von einem direkten Zusammenhang zwischen den auslösenden Faktoren

der Endometriose und dem stimulierenden Effekt auf die Entstehung eines Ovarialkarzinoms auszugehen ist (Ness, 2003).

Häufige Mutationen, die bei endometrioiden Ovarialkarzinomen gefunden werden, sind *PIK3CA* in ca. 40 %, *ARID1A* (AT-rich interaction domain 1A) in 30 %, *KRAS* in 30 %, *PTEN* und *PPP2R1A* in jeweils 16 %. Daneben zeigen Frauen mit einem genetischen Defekt im Mismatch-Reparatur-System (MMR-System; Lynch-Syndrom), neben dem deutlich erhöhten Risiko für Darm- und Endometriumkarzinome, auch ein vermehrtes Auftreten von endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinomen (Lheureux et al., 2019).

Die Diagnose eines endometrioiden Karzinoms gelingt häufiger in einer früheren Krankheitsphase, was im Vergleich zu den serösen Ovarialkarzinomen mit einer besseren Prognose assoziiert ist (Stewart et al., 2019). In einigen Fällen können endometrioide Karzinome im Ovar auch mit Metastasen eines anderen primären Tumors verwechselt werden (Meinhold-Heerlein et al., 2016).

Kurz zu erwähnen sind hier noch die ehemals seromuzinösen Ovarialkarzinome, kurzfristig als neue Tumorentität etabliert, die ebenfalls mit der Endometriose assoziiert sind, weshalb sie in Verwandtschaft mit den endometrioiden- und klarzelligen-Karzinomen anzusiedeln sind und daher heute zu den endometrioiden Karzinomen zählen. Auch hier findet sich vermehrt der Verlust von *ARID1A* (AT-rich interaction domain 1A), welches in der Regel nicht bei serösen Tumoren vorkommt. Für die Diagnosestellung sind laut WHO verschiedene Differenzierungen des Müller Gangs vonnöten (Meinhold-Heerlein et al., 2016) (Kurman et al., 2016; S3-Leitlinie maligner Ovarialtumoren, 2021).

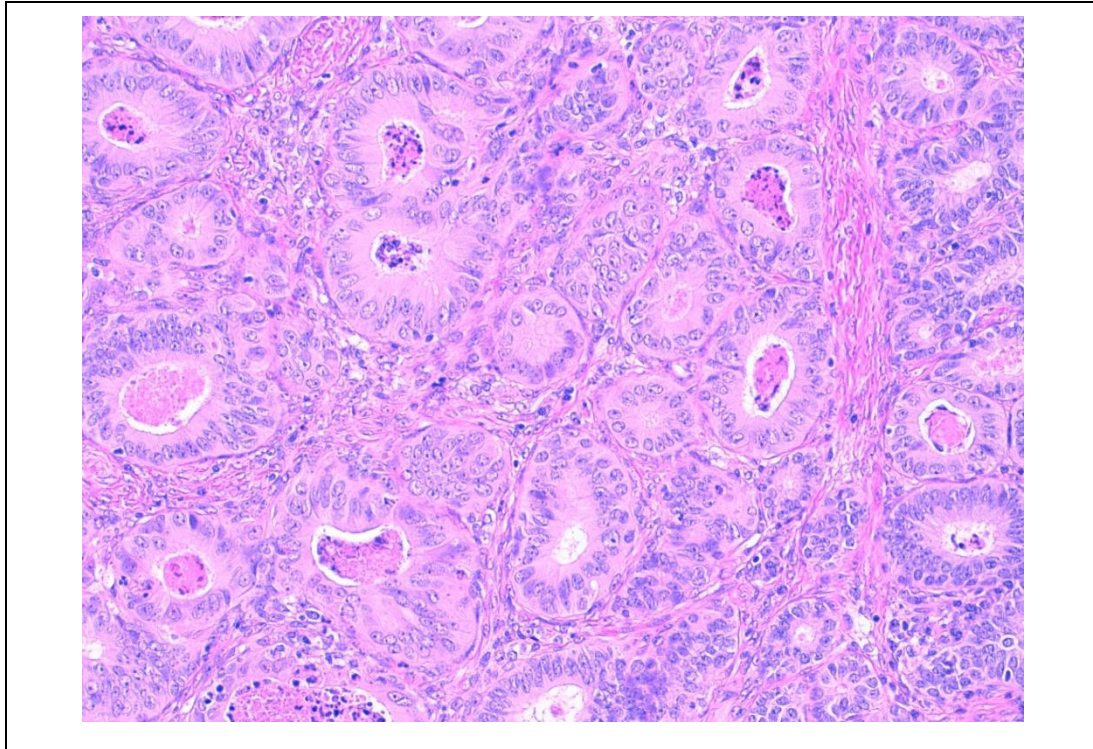


Abb. 1.4: Endometrioides Karzinom in 20x Vergrößerung.

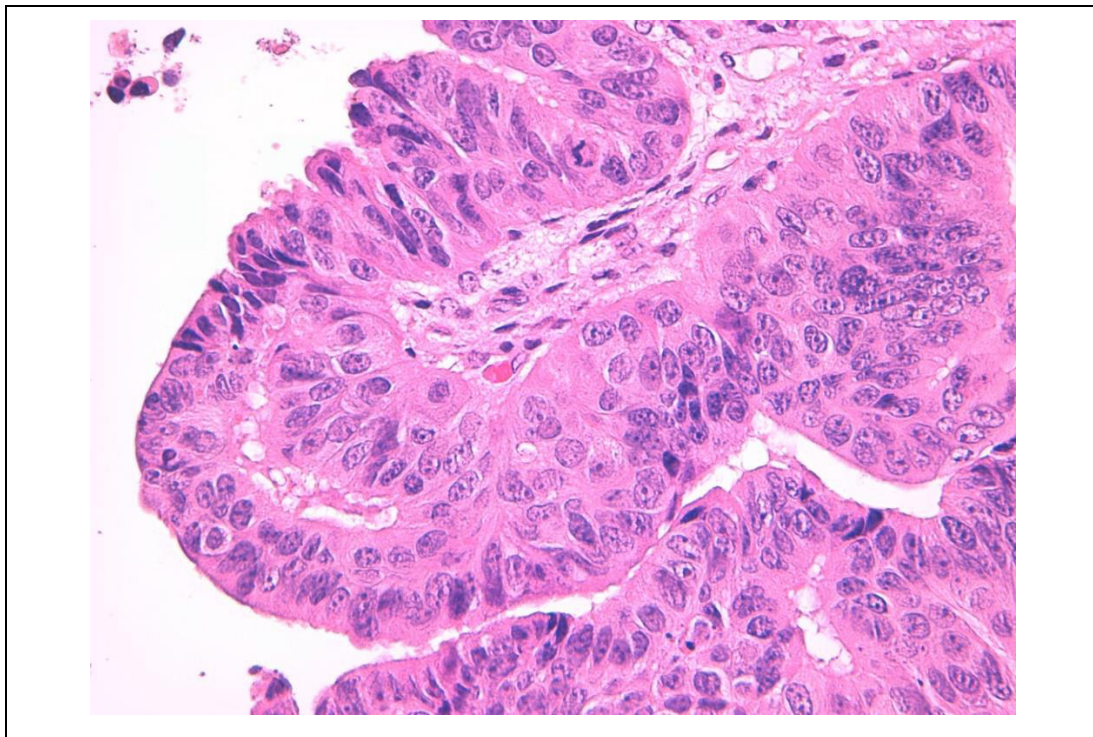


Abb. 1.5: Endometrioides Karzinom in 40x Vergrößerung.

1.9.4 Klarzellige Karzinome

Ähnlich wie die endometrioiden Tumoren machen auch die klarzelligen Tumoren etwa 10 % aller epithelialen Tumoren aus (Javadi et al., 2016). Interessanterweise tritt der klarzellige Subtyp besonders häufig in Japan auf und vertritt dort ca. 25 % aller Ovarialkarzinome. Die Pathogenese ist bis heute nicht eindeutig verstanden. Die Endometriose soll auch hierbei einen Risikofaktor darstellen. Zudem besteht wie bei dem endometrioiden Karzinom auch beim klarzelligen Karzinom eine Assoziation zum Lynch-Syndrom (Meinhold-Heerlein et al., 2016). Grundsätzlich werden sie als high-grade Karzinome eingestuft (De Leo et al., 2021). Bei einem Großteil der Tumoren (etwa 40-67 %) können Mutationen in *ARID1A* festgestellt werden, vergleichbar mit den Analysen von seromuzinösen und endometrioiden Karzinomen. Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* und *BRAF*, wie typischerweise bei den serösen Ovarialkarzinomen vorkommend, sind beim klarzelligen Subtyp deutlich seltener zu finden (Lheureux et al., 2019). Häufiger kann eine Diagnose in einem früheren Zeitpunkt gestellt werden, was mit einer besseren Prognose assoziiert ist. In einem fortgeschrittenen Stadium verschlechtert sich die Überlebensrate deutlich. Gründe dafür sind u.a., dass klarzellige Tumoren weniger stark auf platinenthaltende Chemotherapie ansprechen. (Stewart et al., 2019). Beim klarzelligen Ovarialkarzinom treten, im Vergleich zu allen anderen Subtypen, am häufigsten Komplikationen in Form von paraneoplastischen Syndromen mit Hyperkalzämie und Thromboembolien auf (Lheureux et al., 2019; Meinhold-Heerlein et al., 2016). Die folgende Abbildung zeigt das Bild eines klarzelligen Karzinoms mit tubulozystischer und papillärer Architektur (s. Abb. 1.6).

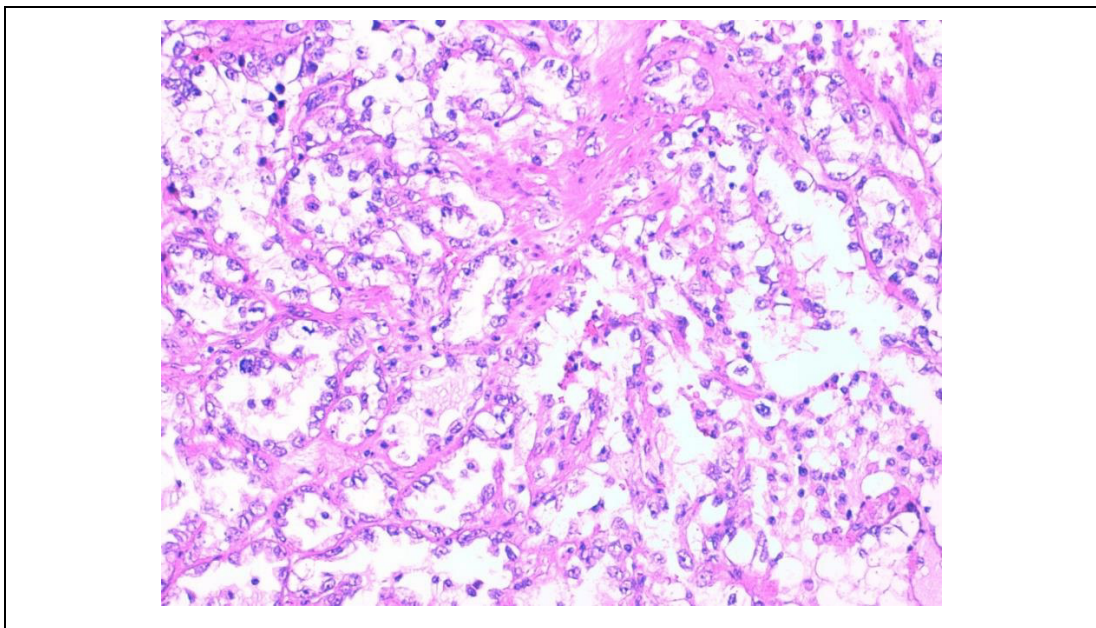


Abb. 1.6: Klarzelliges Karzinom in 20x Vergrößerung.

1.10 Abschließende Diagnostik und Therapie des Ovarialkarzinoms

Durch einen großen Bauchschnitt wird zunächst im Rahmen der abschließenden Diagnostik die Tumorausbreitung begutachtet. Es werden Biopsien sowohl von auffälligen als auch von unauffälligen Arealen in der Abdomenhöhle entnommen. Eine umfassende Inspektion von Zwerchfellkuppel, Leber, Gallenblase und weiteren Organen wird durchgeführt. Im weiteren Verlauf wird nach gesicherter Diagnose der Uterus, die Adnexen, die Appendix und große Teile des Omentum entfernt. Bei jeder Operation ist die komplette Resektion aller makroskopischer Tumoranteile anzustreben (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Bei einer sogenannten makroskopischen Komplettresektion konnte in Studien ein mittleres Überleben von 99 Monaten gemessen werden. Im Vergleich verschlechterte sich die Prognose auf etwa 36 Monate bei Patientinnen, die einen Tumorrest von < 10 mm aufwiesen und auf 29,6 Monate bei einem Tumorrest von > 10 mm (du Bois et al., 2009).

In einem frühen Stadium (**I bis IIA**) ist die Erkrankung auf das Becken bzw. den Uterus, die Tuben und das Ovar beschränkt. Etwa 24 % der Frauen befinden sich in einem dieser frühen Stadien bei Diagnosestellung. Im Stadium I der Erkrankung verzeichnet man noch eine exzellente Prognose mit einem relativen 5- Jahres-Überleben von annähernd 90 % (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019)). Ursächlich finden sich vermehrt Borderlinetumoren, mit einem niedrigeren Potenzial zu Entartung. In einem sorgfältig durchgeführten Staging sollten eine weitere Ausbreitung des Tumors und andere Risikofaktoren ausgeschlossen werden. Handelt es sich um einen gut differenzierten (G1), intakten Tumor in Stadium IA kann eine fertilitätserhaltende Operation mit Erhalt des zweiten, gesunden Ovars für Frauen mit bestehendem Kinderwunsch diskutiert werden (Jayson et al., 2014).

In **Stadium IA** und einem gut differenzierten Tumor (**G1**) ist nach aktuellen Erkenntnissen keine adjuvante Chemotherapie empfohlen (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Ab **Stadium IA/B** und einem schlecht differenzierten Tumor (**G3**) oder ab **Stadium IC** sollte eine Monotherapie mit Carboplatin und insgesamt 6 Zyklen durchgeführt werden. Zum Nutzen der Chemotherapie in den frühen Phasen des Ovarialkarzinoms wurde in einer randomisierten Phase III-Studie ein Gruppe Frauen mit platinhaltiger Chemotherapie behandelt, die Kontrollgruppe erhielt keine weitere Therapie. Für beide Gruppen konnte kein Unterschied im Gesamtüberleben festgestellt werden. Zwei Drittel der Frauen durchliefen jedoch ein unvollständiges Staging. Insbesondere in dieser

Gruppe konnte nach Chemotherapie eine Verbesserung des Gesamtüberlebens und eine längere Rezidivfreiheit festgestellt werden (Trimbos et al., 2003).

Alle Patientinnen ab **Stadium IIB** sollten anschließend an eine Operation eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Paclitaxel über insgesamt 6 Zyklen erhalten. Ab **Stadium IIIB** kann eine Therapie mit Bevacizumab zusätzlich zur Chemotherapie diskutiert werden (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Die Therapie mit Bevacizumab für 15 Monate konnte in einer Studie das mediane Überleben ohne Rezidiv für 4 Monate verlängern (Burger et al., 2011; Perren et al., 2011). Bezüglich der geeigneten Chemotherapiekombination beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (III und IV) konnte bereits 1996 gezeigt werden, dass mehr Frauen auf die Therapie mit Cisplatin-Paclitaxel ansprechen (73 % vs. 60 % bei Cisplatin- Cyclophosphamid). Sowohl das rezidivfreie Intervall als auch das Gesamtüberleben zeigte sich bei der Behandlung von Platin und Paclitaxel länger (38 vs. 24 Monate) als bei Chemotherapie von Platin mit Cyclophosphamid (McGuire et al., 1996). In weiteren Studien imponierte bei gleicher Effektivität eine bessere Verträglichkeit von Carboplatin gegenüber Cisplatin, weshalb Carboplatin verwendet werden sollte (du Bois et al., 2003; S3-Leitlinie maligner Ovarialtumoren, 2021).

Frauen mit nachgewiesener *BRCA* Mutation, Rezidive und fortgeschrittene Ovarialkarzinome nach Ansprechen auf eine platinhaltige Therapie sollten eine zusätzliche Therapie mit PARP-Inhibitoren (Poly-Adenosin-diphosphat-ribose-polymerase-inhibitor), beispielsweise Olaparib, angeboten werden. Dabei zeigte sich bei *BRCAT*rägerinnen ein bis zu 70 % geringeres Risiko für ein Fortschreiten der Erkrankung oder Tod im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Olaparib (Moore et al., 2018; S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020).

1.11 Prognose

Das relative 5-Jahres-Überleben nach Diagnose unterscheidet sich markant je nach Stadium. Leben noch etwa 89 % der Frauen, die im Stadium I diagnostiziert wurden, sind es im Stadium II noch 77 %. Wie in einem oberen Abschnitt angesprochen, wird der Großteil der Ovarialkarzinome meist im Stadium III diagnostiziert. Hierbei sinkt das relative 5-Jahres-Überleben auf 41 % und 17 % im Stadium IV (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019)).

1.12 Mikrosatelliten in der DNA

1.12.1 Vorkommen, Funktion, Bedeutung

Mikrosatelliten, oder auch Short tandem repeats (STR) genannt, sind kleine Wiederholungssequenzen von etwa 1-6 Basenpaaren und machen ca. 3 % des menschlichen Genoms aus (Lander et al., 2001). Diese Wiederholungseinheiten von Basen bestehen zum Beispiel aus (CA) oder (GATA). Mikrosatelliten sind weit über das Genom verteilt und kommen häufig vor. Zu finden sind Mikrosatelliten sowohl in codierenden wie auch in nicht-codierenden Regionen (Toth et al., 2000). Häufiger kommen sie jedoch in den nicht codierenden Bereichen vor. STRs sind durch die hohe Zahl an repetitiven Basen instabil und neigen deshalb bei der Replikation zu Mutationen, die einen großen Teil zur genomischen Variabilität von Lebewesen beigetragen haben (Gymrek, 2017; Hancock, 1995; Sun et al., 2012). Der Gehalt an Mikrosatelliten oder repetitiven Sequenzen korreliert mit der Gesamtmenge an genetischem Material eines Lebewesens (Hancock, 1996). Da sich Mikrosatelliten in der Fragmentlänge stark individuell unterscheiden, können die STRs in forensischen Analysen (Giusti et al., 1986; Kanter et al., 1986), wie z.B. zur Vaterschaftsdiagnostik (Rouger et al., 2003) verwendet werden.

Die Entstehung von Mikrosatelliten beruht wahrscheinlich auf der Theorie der DNA-Slippage (Levinson et al., 1987), wobei die DNA Polymerase eine entscheidende Rolle spielt. Wie oben bereits genannt, weisen Mikrosatelliten eine gewisse genetische Instabilität auf. Bei der Replikation dieser repetitiven Sequenzen werden vermehrt Basen fehlerhaft eingebaut oder gehen verloren, mit dem Resultat einer Längenänderung und vermehrter Variabilität des Mikrosatelliten. Die durch DNA-Slippage verursachten Fehler werden auch als „dynamische Mutationen“ bezeichnet (Richards et al., 1992).

Bei der DNA-Slippage stoppt die Polymerase ihre Replikation und löst sich kurzzeitig vom DNA-Strang ab (Abb. 1.7). In dieser Zeit trennt sich der Doppelstrang auf, insbesondere der Teil des neu synthetisierten Strangs löst sich ab (Viguera et al., 2001). In einem der Stränge bildet sich eine Schleife („loop“), weshalb sich die Stränge im weiteren Verlauf nur versetzt zusammenfügen können. Beginnt die Polymerase erneut mit der Replikation, kann der Abschnitt des „loops“ nicht erreicht werden und bleibt somit ungepaart. Dieser Fehler kann von dem körpereigenen Reparatursystem erkannt und repariert werden. Ist dies nicht der Fall, resultiert eine Längenänderung des Mikrosatelliten (Schlotterer, 2000), entweder als Längenzugewinn oder als Verkürzung, je nachdem, ob sich die Schleife auf dem abgelesenen oder dem neu synthetisierten DNA-Strang gebildet hat (Sia et al., 1997).

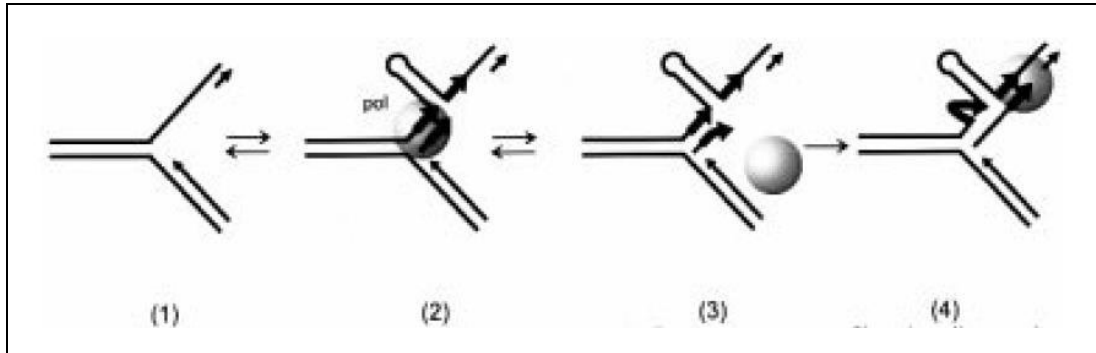


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des DNA-Slippage Modells (Viguera et al., 2001). Bei der DNA-Replikation einer Mikrosatellitensequenzen stoppt die Polymerase aufgrund einer abnormalen Struktur in dem DNA-Strang, hier als Haarnadelstruktur dargestellt (2). Anschließend löst sich die Polymerase von dem Strang ab (3). Gelingt es der Polymerase nicht, das Hindernis zu überwinden, kommt es zu Teilablösung des synthetisierten Stranges mit Schleifenbildung, welcher dann versetzt an ein nachfolgendes Wiederholungsmotiv hinter der Haarnadelstruktur bindet. Dadurch kann die Polymerase wieder ansetzen und die Replikation fortsetzen (Viguera et al., 2001).

1.12.2 MMR-System und dessen Bedeutung

In unserem Körper entstehen bei der Replikation des genetischen Materials oder durch äußere Einflüsse regelmäßig Defekte in unserer DNA. Ein Beispiel dafür ist das oben vorgestellte Modell der DNA-Slippage, bei der es zur ungepaarten Schleifenbildung kommt. Ohne ein Reparatursystem würde eine Anhäufung dieser Fehler resultieren. Das Mismatch-Reparatursystem (MMR) ist ein solches Reparatursystem, welches Fehler nicht nur erkennen, sondern diese auch reparieren kann. Es setzt sich aus sechs verschiedenen Genen zusammen: *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6* und *MSH3* (De' Angelis et al., 2018; Helder-Woolderink et al., 2016; Miyaki et al., 1997; Rhyu, 1996). Diese Gene codieren jeweils für Proteine, welche meist als Komplexe entstandene Fehlpaarungen (Mismatches) erkennen und anschließend durch richtige Basen ersetzen können.

Allgemein können die MMR-Proteine beim Menschen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: MutS (bestehend aus MutS α und MutS β), MutL (MutL α , - β , - γ), einer Exonuklease (EXO1), RPA (DNA-Bindungsprotein), einer DNA- Polymerase und -Ligase (Fukui, 2010). Wie bereits angesprochen, setzt sich der Komplex MutS aus einem α und β Teil zusammen, bestehend aus den Reparaturproteinen *MSH2*, *MSH3* und *MSH6*. Der MutS α Komplex (*MSH2-MSH6*) ist in der Lage, kurze Fehlpaarungen und DNA-Loops zu detektieren, wohingegen MutS β (*MSH2-MSH3*) für die Reparatur von längeren Abschnitten zuständig ist (Fukui, 2010). MutL sorgt im weiteren Verlauf für die Anlagerung und das Einschneiden des DNA-Strangs. Anschließend erfolgt das Herauslösen der falschen Sequenzen durch einen weiteren Komplex aus *MLH1-PMS2* und

einer Exonuklease (EXO1), die über das Protein RPA an die DNA binden kann. Zuletzt erfolgt die Reparatur mithilfe einer Polymerase und DNA-Ligase (De' Angelis et al., 2018; Fukui, 2010; Modrich, 2006).

1.12.3 MSI im Zusammenhang mit dem Lynch-Syndrom und dem Ovarialkarzinom

Treten Mutationen im Bereich von codierenden Genabschnitten für die Mismatch-Reparaturproteine auf, können Fehler bei der Replikation nur noch unzureichend oder gar nicht repariert werden. Als Folge des defekten MMR-Systems resultiert eine genomische Instabilität, auch Mikrosatelliteninstabilität genannt.

Als Beispiel für eine typische Erkrankung auf dem Boden einer MSI kann das Lynch-Syndrom genannt werden. Beim Lynch-Syndrom ist zu Beginn ein Allel in der Keimbahn mutiert. Diese Mutation wird autosomal-dominant an die Nachfahren vererbt und bedingt vorerst keine Tumorgenese. Sollte es jedoch im Laufe des Lebens auf dem zweiten Allel zu einer weiteren, somatischen Mutation oder Inaktivierung kommen, ist ein Ausfall des Reparaturmechanismus die Folge (Lynch et al., 2015). Menschen mit einem Lynch-Syndrom oder dem Ausfall des MMR-Systems entwickeln deshalb frühzeitig und vermehrt Tumoren, am häufigsten im Darm. Das Risiko beträgt etwa 80 % bei Männern und 40-60 % bei Frauen an Darmkrebs zu erkranken. Im Vergleich besteht in der Allgemeinbevölkerung ein Darmkrebsrisiko von bis zu 5 % (Schmeler et al., 2008). Auch weitere Tumoren treten beim Lynch-Syndrom vermehrt auf: Magen- und Dünndarm-Karzinome, Tumoren der Leber und des Gallensystems, urologische Tumoren, sowie Endometrium- und Eierstockkrebs bei Frauen (Watson et al., 1994). Das Risiko für ein Endometrium-Karzinom wird mit bis zu 60 % eingestuft. In Hinblick auf die verschiedenen Tumoren, die im Zusammenhang mit dem Lynch-Syndrom stehen, wird ein multidisziplinäres Vorgehen im Umgang mit betroffenen Patienten und Prävention gefordert (Lu et al., 2005). Die Wahrscheinlichkeit für ein Ovarialkarzinom bei Bestehen eines Lynch-Syndroms wird in der Literatur mit 3 % bis 20 % beschrieben. Das mittlere Erkrankungsalter liegt hierbei zwischen 40-47 Jahre (Debniak et al., 2015). Etwa 10-15 % der erblichen Ovarialkarzinome sind durch das Lynch-Syndrom verursacht (Lynch et al., 2009). Bei diesen Tumoren treten vermehrt endometrioide und klarzellige Karzinomtypen auf (Cai et al., 2004; Chui et al., 2013; Pal et al., 2008). In der Routine Diagnostik wird aktuell eine genetische Testung angeboten. Wie viele Ovarialkarzinome einer MSI zugrunde liegen ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Es gibt Hinweise, dass die Lynch-Syndrom-assoziierten Ovarialkarzinome in einem früheren Stadium diagnostiziert werden,

welches mit einer besseren Prognose assoziiert ist (Grindedal et al., 2010; Watson et al., 2001).

1.12.4 MSI-Analysen

Für eine molekulargenetische MSI-Analyse wird neben Tumorgewebe auch gesundes Gewebe derselben Patientin benötigt, welches zum Vergleich dient. Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kann das benötigte genetische Material amplifiziert werden. Anschließend erfolgt eine Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarelektrophorese und Darstellung der Ergebnisse in einem Elektropherogramm. Dabei kommt es zur Analyse von fünf verschiedenen genetischen Markern: BAT25, BAT26, D2S123, D17S250, D5S346. Im Jahr 1997 wurden diese vom National Cancer Institute (NCI) definiert, um MSI-Analysen beim kolorektalen Karzinom zu standardisieren. Es werden bei den Analysen zwei Mononukleotidmarker (BAT25 und BAT26) und drei Dinukleotidmarker verwendet (D2S123, D5S346 und D17S250) (Boland et al., 1998). Die verwendeten Mikrosatelliten-Marker mit den jeweiligen Primersequenzen sind in Tabelle 3 veranschaulicht. Größe des Markers, Lokus auf dem Chromosom sowie die damit untersuchten Gene sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Sollte es im Vergleich von Tumorgewebe zum Normalgewebe zu „Extrapeaks“ im Tumorgewebe kommen, kann man von einer MSI in dem betroffenen Marker ausgehen (Dietmaier, 2010). Je nachdem, wie viele Marker betroffen sind, können Tumoren in MSI-H (high) und MSI-L (low) unterschieden werden. MSI-H (high) Tumoren zeigen in den Analysen der fünf Mikrosatellitenmarker in zwei oder mehr Markern eine Instabilität (mind. 40%), wohingegen MSI-L (low) Tumoren eine Instabilität in einem Marker besitzen. Sollte es zu keiner Auffälligkeit in den fünf untersuchten Markern kommen, wird der Tumor als mikrosatellitenstabil (MSS) bezeichnet (Boland et al., 1998; Umar et al., 2006). Häufig, besonders bei MSI-H Tumoren, werden Ausfälle in *MSH2* oder *MLH1* detektiert, die dagegen seltener bis gar nicht bei MSI-L zu finden sind (Dietmaier et al., 1997). *MSH6* wird nur in etwa 7 % und *PMS2* in unter 5 % als Ursache eines defekten MMR-Systems gefunden (Kolodner et al., 1999; Nicolaides et al., 1994).

Als alternative Methodik zur Diagnostik einer MSI ist die Immunhistochemie (IHC) zu nennen. Die IHC ist weit verbreitet, da sie preiswert, einfacher und schneller in der Durchführung ist. Mithilfe von Antikörpern können Proteine und Moleküle auf Zellen spezifisch nachgewiesen werden. Da die Antikörper oft mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, kommt es zu einer sichtbaren Färbung des untersuchten Präparates, wenn der Antikörper an die gesuchte Struktur bindet. Folglich können somit gezieltere und individuellere Therapien eingesetzt werden. Zur Abklärung einer MSI erfolgt bei der IHC

die Detektion des Ausfalls der Mismatchreparaturproteine, welches ein wichtiger Teil in der Routine Diagnostik darstellt.

In dieser Arbeit wurde ein Kollektiv aus endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinomen molekulargenetisch auf eine MSI und somit den Defekt im MMR-System getestet. Ziel der Arbeit war es herauszufinden, in welcher Häufigkeit eine MSI diesen seltenen Ovarialkarzinomen zu Grunde liegt. Für die MSI-Analysen wurde die molekulargenetische Testung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Fragmentlängenanalyse verwendet. Dies ist im Vergleich zu der Immunhistochemie ein aufwändigeres und kostenintensiveres Verfahren, welches in der Diagnostik des Ovarialkarzinoms nicht routinemäßig angewandt wird. Zudem sollte untersucht werden, wie praktikabel die Durchführung der MSI Testung am Ovarialkarzinom ist und welche Schwierigkeiten sich aus einer molekulargenetischen Testung ergeben.

Mikrosatelliten-Marker	Primersequenzen	Lot. Nr.
BAT25 u FAM	TCGCCTCCAAGAATGTAAGT	183000-1
BAT25 l	TCTGCATTTTAACTATGGCTC	182052-2
BAT26 u VIC	TGACTACTTTTGACTTCAGCC	102304-D11
BAT26 l	AACCATTCAACATTTTTAACCC	182052-3
D17S250 Mfd15 u VIC	GCTGGCCATATATATATTTAAACC	108739-D8
D17S250 Mfd15 l	GGAAGAATCAAATAGACAAT	182052-7
D2S123 u FAM	AAACAGGATGCCTGCCTTTA	183000-2
D2S123 l	GGACTTTCCACCTATGGGAC	182052-6
D5S346 u NED	ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG	102304-D10
D5S346 l	AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT	182052-4

Tabelle 3: Auflistung der benutzten Primer mit ihren Primersequenzen für die molekulargenetische MSI-Testung (Dietmaier et al., 1997).

Mikrosatelliten-Marker	Wiederholungsmotiv *	Chromosomaler Lokus	Größe (bp)	Untersuchtes Gen	weitere Literaturangaben
BAT25	TTTT.T.TTTT.(T) ₇ .A(T) ₂₅	4q12	~ 90	c-kit Oncogen	Ichikawa et al., 2001, Parsons et al., 1995
BAT26	(T) ₅(A) ₂₆	2p	~ 80-100	MSH-2	Losso et al., 2012, Zhou et al., 1998, Liu et al., 1994
D2S123 (AFM093xh3)	(CA) ₁₃ TA(CA) ₁₅ (T/G A) ₇	2p16	~197- 227	MSH-2	Losso et al., 2012
D17S250 (Mfd15CA)	(TA) ₇(CA) ₂₄	17q11.2-q12	~ 150	TP53	Borges Bdo et al., 2011
D5S346	(CA) ₂₆	5q21/22	~ 96- 122	APC- (Adenomatous Polyposis Coli)	Zauber et al., 2003

Tabelle 4: Charakteristika der Mikrosatellitenmarker. (*) Die nicht- repetitive Nukleotide werden als Punkte angegeben (Dietmaier et al., 1997).

1.13 RAS-Gene und Onkogene

Bei der Pathogenese vieler Tumoren spielt die Familie der *RAS*-Onkogene eine entscheidende Rolle, die sich in die drei Gene *KRAS*, *NRAS* und *HRAS* mit ihren jeweiligen Effektoren differenzieren lässt (Barbacid, 1987; Li et al., 2018; Shimizu et al., 1983). *RAS*-Mutationen können in bis zu 30 % der Tumoren gefunden werden und bieten mögliche Ansatzstellen für spezifische Therapien (Agianian et al., 2018). Karzinome im Zusammenhang mit *KRAS* sind das duktales Adenokarzinom des Pankreas, das kolorektale Karzinom (CrC) und das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC, non small cell lung cancer). Etwa 90 % der *KRAS*-Mutationen sind auf Codon 12 zu finden. Weitere Loci sind ebenfalls möglich, wie das Codon 13, 117 und 146 beim kolorektalen Karzinom. *KRAS* codiert für zwei verschiedenen Proteine (*KRAS4A* und *KRAS4B*), welche durch alternatives Splicing entstehen und bei Mutation beide in ihrer Funktion verändert sind (Haigis, 2017). *NRAS* findet man beispielweise beim malignen Melanom oder bestimmten Leukämien. Das insgesamt selten betroffene *HRAS*-Gen kann beim Plattenepithelkarzinom mutiert sein (Li et al., 2018; Prior et al., 2012).

RAS-Gene codieren für die jeweiligen RAS-Proteine NRAS, HRAS sowie KRAS4A und 4B. Diese Proteine bestehen aus einer Kette von bis zu 189 Aminosäuren, welche an Position 1-166 alle eine GTPase Domäne vorweisen. Neben einer GTP/GDP Bindungsstelle besteht hier auch ein Bereich für Effektorproteine. Ab Aminosäureposition 167 befinden sich eine variable Region des Proteins, die sich jeweils in den verschiedenen Isoformen von *RAS* unterscheiden (Hypervariable Region) (Li et al., 2018). Die *RAS*-Proteine zirkulieren zwischen einer aktivierten Form (GTP an *RAS* gebunden) und einer inaktivierten Form (GDP an *RAS* gebunden) in der Zelle umher (Boguski et al., 1993).

Aktiviertes *RAS* ist an der Regulation von zellulären Mechanismen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose maßgeblich beteiligt (McCubrey et al., 2007; Vakiani et al., 2011). Diese reguliert es über verschiedene Signaltransduktionskaskaden. Kommt es zu Mutationen in den *RAS*-Genen, werden auch die resultierenden Proteine meist in ihrer GDP oder GTP Bindungsfähigkeit verändert. Es resultiert eine dauerhafte Aktivierung einer Kaskade, welche Tumorentstehung und/oder -fortschritt begünstigt (Haigis, 2017; Vakiani et al., 2011). Am bekanntesten im Zusammenhang mit der Tumorgenese ist der MAP-Kinase-Signalweg, auch als *RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK* Signalweg bezeichnet. Daneben existieren weitere Kaskaden durch *RAS* gesteuert, wie der *PI3K-AKT*- und der *RalGEF* Signalweg (Vakiani et al., 2011).

Zu Beginn des **MAP-Kinase Signalwegs** bindet ein Wachstumsfaktor oder Ligand an einen Tyrosinkinase-Rezeptor (als Beispiel ein EGFR-Rezeptor -epidermal growth factor receptor) an der Zellmembran, welcher über den *RAS* guanine nucleotide exchange factors (**GEF**, in der Abbildung in Form von SOS son- of-sevenless) die Aktivierung von *RAS* mit einer GTP Bindung initiiert. *RAS* verändert daraufhin seine Konformation und bindet über die *RAS*-Bindungsdomäne mehrere Effektorenproteine, wie zum Beispiel eine *RAF*-Kinase, und aktiviert diese (Li et al., 2018). Die Gruppe der **RAF Proteine** setzt sich zusammen aus *RAF-1 (CRAF)*, *ARAF* und *BRAF*, welche zytoplasmatische Serin-Threonin-Kinasen darstellen. Sie besitzen am N-terminalen Ende eine regulatorische Domäne (genannt CR1 and CR2) und am C-terminalen Ende eine Kinasefunktion (CR3) (Vakiani et al., 2011). Neben vielen strukturellen Ähnlichkeiten bestehen auch Unterschiede in der Effektivität der Kinasen. Dabei zeichnet sich *BRAF* durch eine besonders hohe basale Kinase Aktivität aus im Vergleich zu *CRAF*, welches erst an einer Position aktiviert werden muss (Chong et al., 2001). Die häufigste Mutation von *BRAF* Codon 600 (V600E) resultiert deshalb schon in einer ständigen Aktivierung des Gens, während das bei *CRAF* nicht der Fall ist. Folglich sind Tumoren mit *CRAF* Mutation selten, während *BRAF* als das am häufigsten mutierte *RAF* Protein bezeichnet werden kann (Emuss et al., 2005). Etwa 50 % der Patienten mit malignem Melanom zeigen Mutationen in V600 E. Bis zu 70 % der Schilddrüsenkarzinome weisen *BRAF*-Mutationen auf; auch beim kolorektalen-Karzinom (~10 %), Lungenkarzinom (bis 5 %) und 12 % der Ovarialkarzinome sind *BRAF*-Mutationen zu finden (Dankner et al., 2018; Vakiani et al., 2011).

Die *RAF* Proteine aktivieren in einem nächsten Schritt über eine **Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK)** sowie **MEK1** und **2** die Effektoren **ERK1** und **2** (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2), die im Zellkern die Transkription und Genregulation modifizieren (Santarpia et al., 2012; Vakiani et al., 2011).

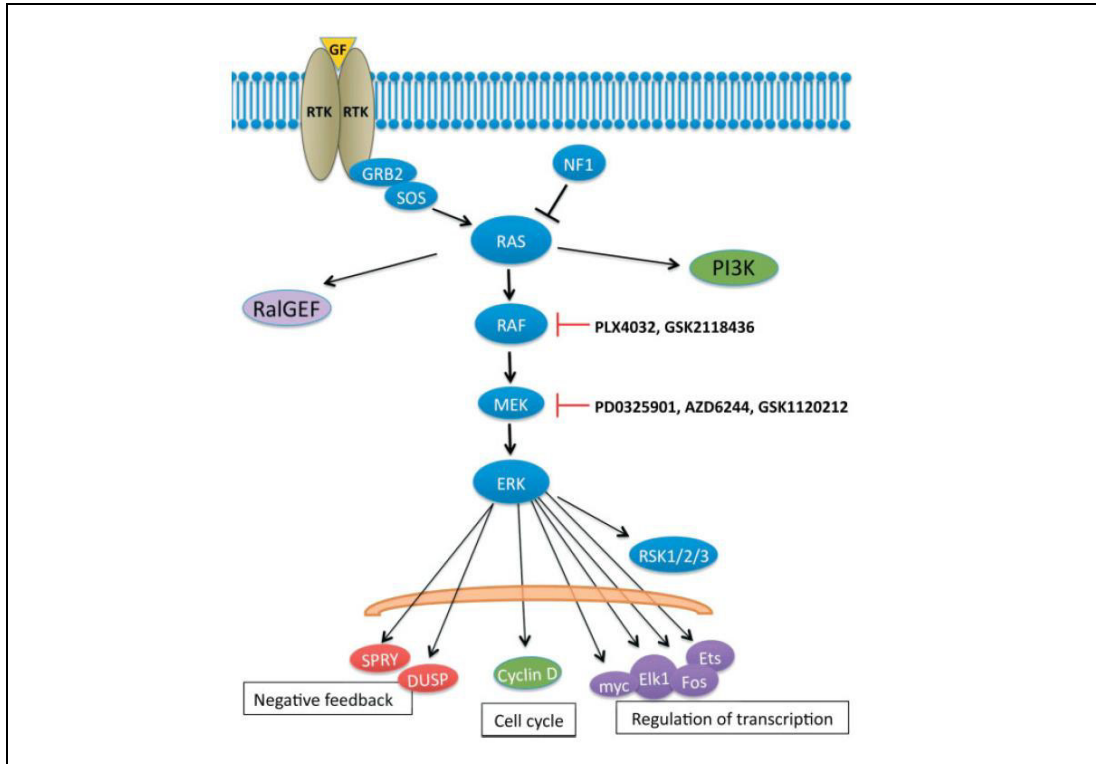


Abb. 1.8: Schematische Darstellung des RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK Signalweg, auch als MAP-Kinase Signalweg bezeichnet (Vakiani et al., 2011).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studienkollektiv

Grundlage für die Durchführung der Analysen war ein bestehendes Kollektiv von Ovarialkarzinomen aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Das Kollektiv umfasst alle erstdiagnostizierten Ovarialkarzinome zwischen 2003 und 2007 und wurden anhand klinischer und histopathologischer Eigenschaften in einer ausführlichen Datenbank (n=300) in Vorarbeiten zusammengestellt. Alle Ovarialkarzinome wurden in deren Subtypen klassifiziert und dabei in die serösen, endometrioiden, muzinösen, klarzellig und undifferenzierten Tumoren eingeteilt. Das Durchschnittsalter der Patientinnen in diesem Gesamtkollektiv betrug bei Erkrankungsbeginn 61,5 Jahre (von 23,9 bis 93,5 Jahre).

Für die aktuelle Arbeit wurden alle endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinome aus der Datenbank gefiltert und in einem neuen Kollektiv zusammengestellt (s. Tabelle 5). Darauf aufbauend wurden die folgenden Analysen durchgeführt. Insgesamt befanden sich in dem Kollektiv 31 endometrioiden und 4 klarzellige Ovarialkarzinome. Das Alter der Patientinnen mit endometrioidem Karzinom zum Zeitpunkt der Diagnose lag zwischen 23,9 bis maximal 82,5 Jahre (Durchschnitt 58,9 Jahre). Frauen mit klarzelligem Tumortyp waren im Schnitt 49,7 Jahre mit einer Altersverteilung von 38,6 bis 62,9 Jahre.

Histologie	T	N	M
endometrioid	3a	0	2
endometrioid	1c	0	0
endometrioid	3c	1	2
endometrioid	1c	0	2
endometrioid	1a	2	2
endometrioid	1a	2	2
endometrioid	3c	2	1
endometrioid	3c	1	2
endometrioid	2a	0	0
endometrioid	3c	1	2
endometrioid	3b	0	2
endometrioid	1c	0	2
endometrioid	1c	0	2
endometrioid	3c	2	2
endometrioid	2b	0	2
endometrioid	1a	0	2
endometrioid	2c	1	1
endometrioid	2a	0	2
endometrioid	2b	1	2
endometrioid	1c	2	2
endometrioid	1c	2	2
endometrioid	3c	0	2
endometrioid	3b	2	2
endometrioid	2b	0	0
endometrioid	1c	2	2
endometrioid	3b	2	2
endometrioid	1c	0	2
endometrioid	1c	2	1
endometrioid	3b	0	2
endometrioid	2a	0	2
endometrioid	1a	0	2
klarzellig	3c	1	2
klarzellig	1c	0	2
klarzellig	3c	0	1
klarzellig	3c	2	1

Tabelle 5: Darstellung des ursprünglichen Kollektivs nach Histologie und TNM Klassifikation

22 endometrioiden und 3 klarzellige Tumoren wurden in der vorliegenden Arbeit analysiert. Die Reduktion der Fallzahl begründete sich folgendermaßen: Für die MSI-Testung war es nötig, genetisches Material aus Tumorgewebe sowie aus gesundem Gewebe zu gewinnen. Bei insgesamt drei endometrioiden Fällen war kein gesundes Gewebe vorhanden, weshalb diese Fälle nicht in den Analysen verwendet werden konnten. Als weitere Schwierigkeit ergab sich, dass einige Schnitte zu wenig verwendbares Zellmaterial aufwiesen, um eine aussagekräftige Untersuchung durchführen zu können. Alternative Schnitte aus anderen Gewebeblöcken konnten häufig herangezogen werden (soweit diese im Archiv verfügbar waren). In Absprache mit einer erfahrenen Pathologin und medizinisch-technischen-Laboratoriumsassistentin (Nicole Perera) konnten weitere sieben (sechs endometrioiden, ein klarzelliges Karzinom) dieser Fälle letztendlich nicht verwendet werden, wodurch die Reduktion der Fallzahl zu erklären ist.

Zusätzlich zu dem bestehenden Kollektiv wurde ein seröses Ovarialkarzinom (G3) analysiert, welches in einer vorherigen Immunhistochemie als MSI positiv getestet worden war und somit als Positivkontrolle dienen konnte.

In repräsentativen, gefärbten Schnitten wurde mithilfe des Mikroskops (Leitz, Wetzlar) das zu extrahierende Tumor- sowie Normalgewebe mit einem Stift eingezeichnet (s. Abb. 2.1-2.5). Alle angezeichneten Objektträger wurden von einer erfahrenen Pathologin (Frau PD Dr. med. Elisa Schmoeckel) überprüft und enthielten eine ausreichende Zelldichte für die weiteren Analysen.

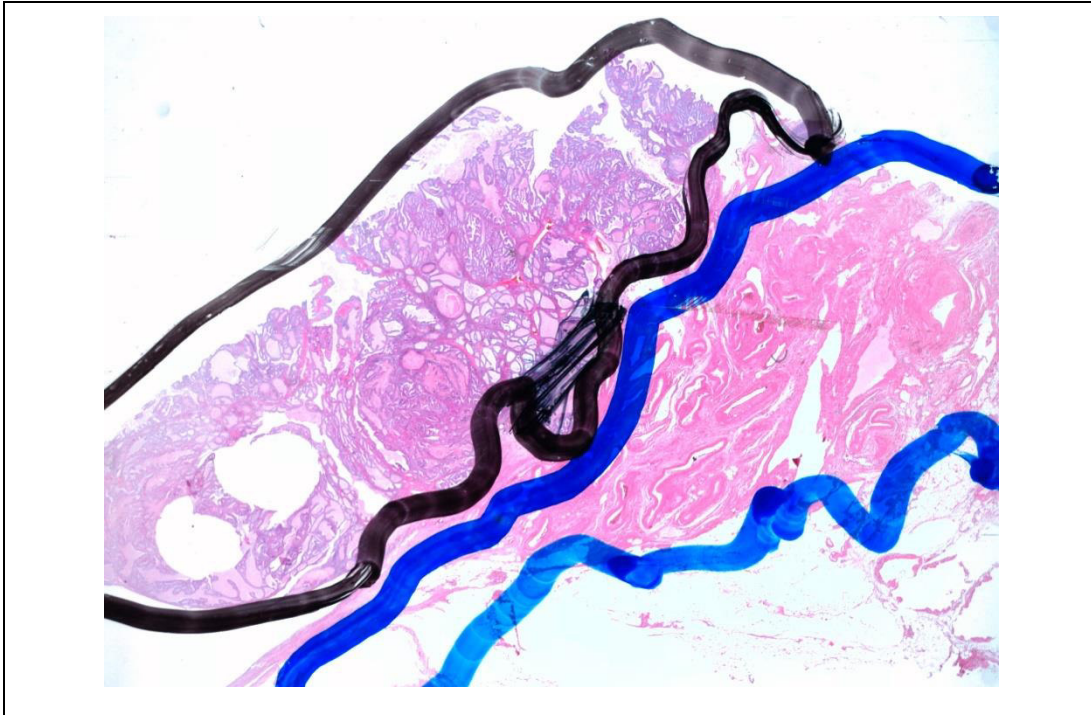


Abb. 2.1: Endometrioides Karzinom mit dem Makroobjektiv des Fotomikroskops. Einzeichnung des Tumorgewebes mit einem schwarzen Stift. Daneben befindet sich gesundes Gewebe, welches mit einem blauen Stift markiert wurde.

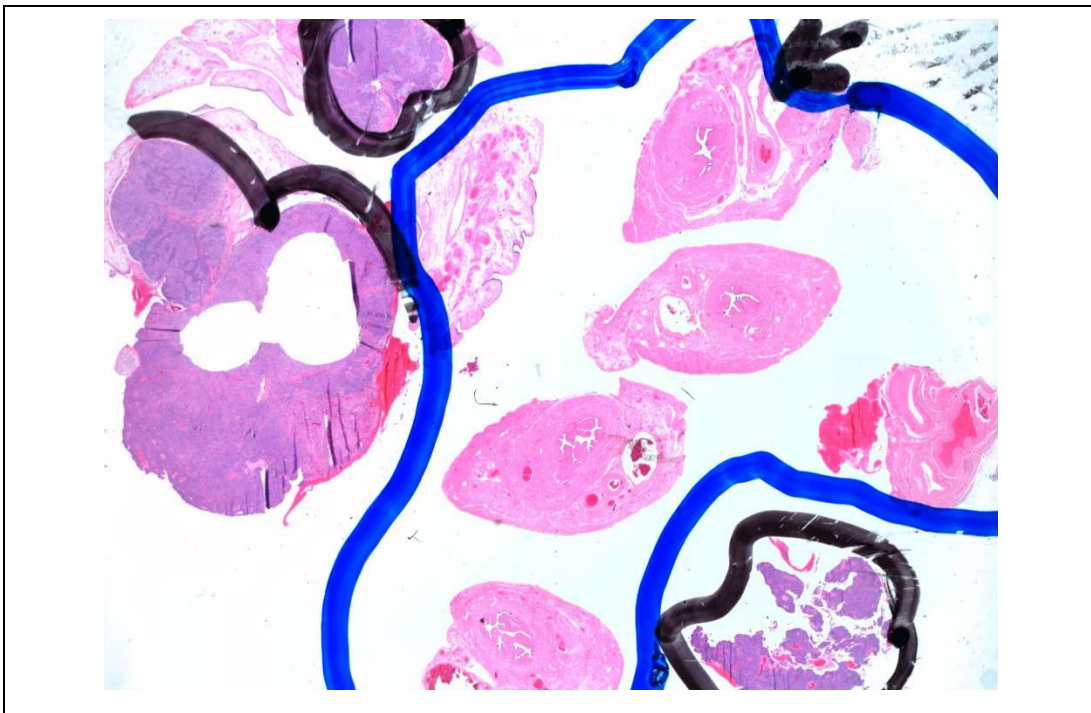


Abb. 2.2: Endometrioides Karzinoms mit dem Makroobjektiv des Fotomikroskops. Einzeichnung des Tumorgewebes mit einem schwarzen Stift. Dazwischen befindet sich gesundes Gewebe, hier mit Anschnitt der Tube (Pfeil).



Abb. 2.3: Tumorfreies Gewebe, welches für die MSI-Analysen vonnöten war, hier mit Anschnitt der Tube.

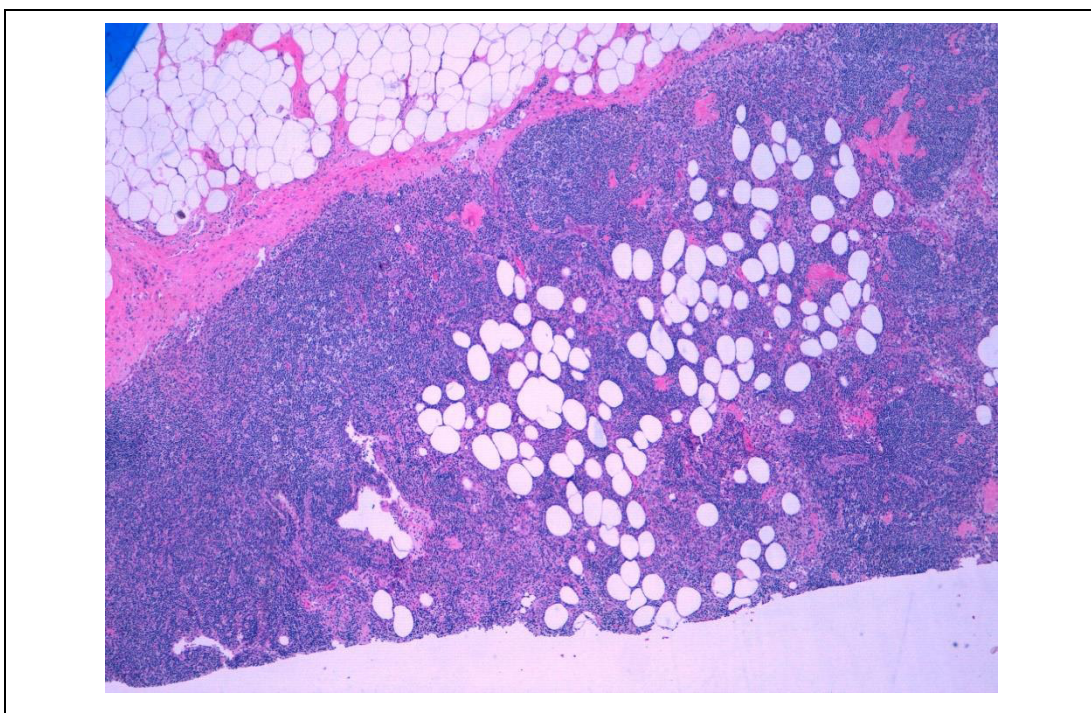


Abb. 2.4: Tumorfreies Gewebe, welches für die MSI-Analysen vonnöten war, hier wurde ein Lymphknoten verwendet.



Abb. 2.5: Tumorfrees Gewebe mit dem Makroobjektiv des Fotomikroskops, welches für die MSI-Analysen vonnöten war. Hier wurde eine Appendix vermiformis verwendet.

Anschließend wurden die zugehörigen histologischen Paraffinblöcke (Gewebe in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet) aus dem Archiv eingeholt und davon zwölf Leerschnitte und jeweils ein HE Schnitt (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) angefertigt. Grundlage für alle Analysen war die Extraktion von Zellen aus den Leerschnitten mithilfe eines Skalpell unter dem Mikroskop. Alle endometrioiden und klarzelligen Fälle dieser Arbeit sowie die Positivkontrolle wurden zur übersichtlicheren Handhabung im Labor von 1-26 nummeriert mit einer weiteren Unterscheidung in „a: Tumorgewebe“ und „b: Normalgewebe“. Für alle Analysen wurde das QIAamp DNA Micro Kit® (Lot-No: 157015286, Qiagen, Hilden) mit dessen Reagenzien verwendet, um die DNA aus dem Gewebe zu extrahieren. Dabei wurden die Versuche nach der Anleitung aus dem QIAamp® DNA Micro Handbook (QIAGEN, 2014, December) durchgeführt. Eine Übersicht der Methodik der zwei Versuchsansätze dieser Arbeit zeigte die Abbildung 2.6 im Folgenden.

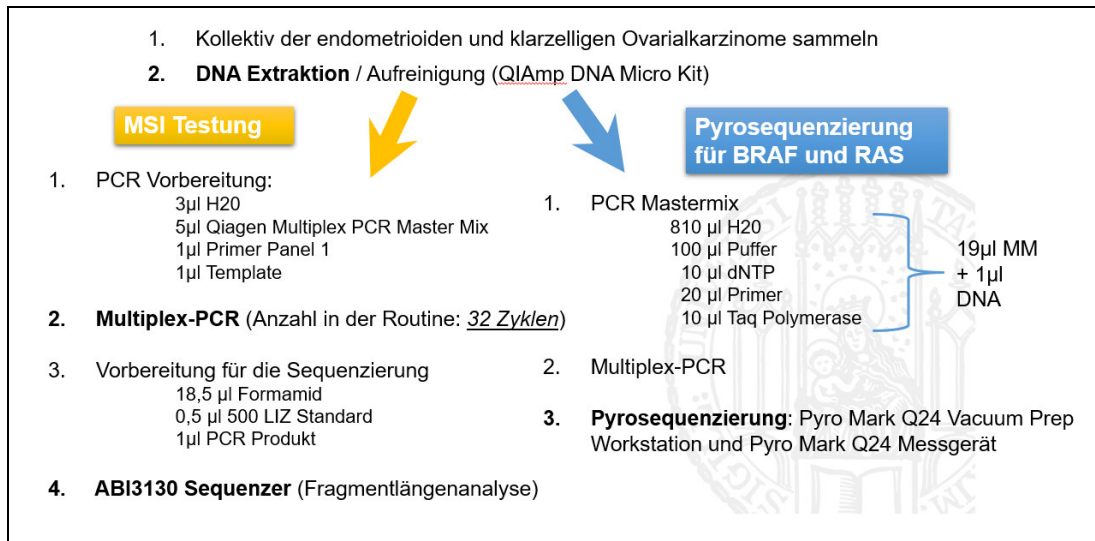


Abb. 2.6: Schematische Übersicht der Methodik und Analysen dieser Arbeit mit MSI-Testung (links) und Pyrosequenzierung von BRAF und RAS (rechts).

2.2 Gewinnung von tumorhaltigem und tumorfreiem Material

2.2.1 Mikrodissektion (Abtragung)

Je nach Zellanzahl in dem HE-Schnitt wurden ein oder mehrere Leerschnitte bei der Abtragung verwendet. Zuerst wurden die Leerschnitte zwei Mal je 15 Minuten in ein Bad aus Xylol (Firma AppliChem, Darmstadt) getränkt, danach zwei Mal je 10 Minuten in Ethanol (Firma AppliChem, Darmstadt) gereinigt und anschließend luftgetrocknet. Die bestehende Gewebemarkierung auf dem Objektträger konnte durch Übereinanderlegen von HE Schnitt und Leerschnitt auf die Unterseite des Leerschnitts übertragen werden. Im Folgenden wurde nun das Gewebe des markierten Leerschnitts unter dem Mikroskop mit einem Skalpell abgetragen. Um mögliche Kontaminationen zu vermeiden, wurde für jeden Fall ein neues Skalpell verwendet sowie immer das gesunde Gewebe vor dem Tumorgewebe abgetragen.

2.2.2 Lyse des Gewebes und DNA-Extraktion mithilfe des QIAamp DNA Micro Kit®

Aufgefangen wurden die feinen Gewebesteifen in einem vorher präparierten 0,5 ml Eppendorf Röhrchen (Hamburg). In jedes Röhrchen war in einem früheren Vorgang eine Lysatflüssigkeit aus 15 µl ATL Puffer (zuvor bei 500 Watt 15 Sekunden in der Mikrowelle erwärmt) und 10 µl Proteinase K gemischt worden. Beide Reagenzien sind in dem QIAamp DNA Micro Kit® vorhanden. Anschließend wurden die Proben gevortext

(Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York), was zu einer Durchmischung der Flüssigkeit führte. Über Nacht verblieben die Proben in einem ThermoMixer® (Eppendorf, Hamburg), der auf 56 °C bei 450 rpm (rounds per minute) Intervallmix eingestellt wurde.

2.2.3 Binden der DNA

Im Anschluss an die Lyse erfolgte das Binden des genetischen Materials an eine Membran. Zuerst wurden die Proben aus dem ThermoMixer® entnommen und kurz zentrifugiert. Als nächstes erfolgte die Zugabe von 25µl Puffer ATL (vorher bei 500 Watt für 15 Sekunden in der Mikrowelle erhitzt), 50 µl AL Buffer und 50 µl Ethanol (96-100 %) in die Röhrchen, welche daraufhin gut durchmischt wurden. Nach Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5427 R, Hamburg) für eine weitere Minute (8000 rpm) erfolgte die Entnahme der Flüssigkeit aus den Röhrchen mit einer Pipette (Eppendorf, Hamburg) und die Übertragung auf Säulengefäße (QIAamp MinElute™ Columns, Qiagen, Hilden, Lagerung im Kühlschrank bei 4-8 Grad). Diese Säulen, welche die gelöste DNA binden können, wurden in Auffangröhrchen (Collection Tubes, Qiagen, Hilden) transferiert, welche die überschüssige Flüssigkeit bei der Zentrifugation auffangen.

2.2.4 Waschen und Trocknen

In den weiteren Schritten erfolgte das Entfernen der übrigen Zellmasse aus der Flüssigkeit und das Reinigen der DNA. Mit der Zentrifuge wurden mehrere Durchläufe des Waschens getätigt. Dafür wurden zuerst 500 µl AW1 Puffer auf die Membran gegeben, in einem zweiten Schritt 500 µl AW2 Puffer und danach für je eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5427 R, Hamburg). Der Überstand in den Auffangröhrchen konnte nach jeder Zentrifugation entsorgt und die Membran in ein neues Auffanggefäß transferiert werden. Anschließend trocknete die Membran für drei Minuten in der Zentrifuge bei 14000 rpm.

2.2.5 Eluieren

In einem letzten Schritt erfolgte die Ablösung der DNA von der Membran durch Zugabe von 20 µl AE Puffer mit einer Inkubationszeit von ein bis fünf Minuten. Die Membranen wurden dabei in 1,5 ml Röhrchen transferiert und anschließend für eine Minute bei 14 000 rpm zentrifugiert. In der hier aufgefangenen Flüssigkeit am Boden der Röhrchen war die konzentrierte DNA vorhanden, welche dadurch konserviert war und im Kühlschrank aufbewahrt werden konnte.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren, um spezifische DNA-Abschnitte mithilfe der DNA-Polymerase zu vervielfältigen (amplifizieren). Ein Merkmal der PCR ist, dass sehr kleine Mengen an genetischem Material verwendet werden können, da die benötigte DNA bei den Zyklen exponentiell vervielfältigt wird. Für eine PCR werden verschiedene Komponenten benötigt: Neben destilliertem Wasser verwendet man spezifische Primer, die an zu amplifizierenden Abschnitten ansetzen und diesen von beiden Seiten begrenzt. Zusätzlich sind die Bausteine für die neu synthetisierten Stränge vonnöten, diese werden in Form von Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) hinzugegeben. Das Enzym, welches den markierten Bereich replizieren kann, heißt Polymerase und benötigt dazu noch eine Pufferlösung, um effizient arbeiten zu können. Aus diesem Gemisch wird ein gemeinsamer PCR-Ansatz hergestellt.

2.2.6.1 PCR-Ansatz

Für die Versuche wurde das Qiagen® Multiplex PCR Kit (Lot-No: 154022577, Qiagen, Hilden) mit dem Qiagen Multiplex PCR Master Mix verwendet, welches folgende Bestandteile beinhaltet: HotStarTaq® DNA-Polymerase, Multiplex PCR Puffer und ein dNTP Mix (QIAGEN, 2010, October). So wurde in einem Lauf für beispielsweise 11 Proben der MSI-Analyse insgesamt 33 µl Wasser, 55 µl Qiagen Multiplex PCR Mastermix und 11 µl Primer Mix (Biomers, Ulm) der MSI Panel 1) verwendet, welcher die speziellen Primer für die MSI-Analyse enthielt. Von diesem PCR- Ansatz wurde anschließend 9 µl pro Reaktionsgefäß abpipettiert und nachfolgend 1 µl aus der konservierten DNA für die nachfolgende PCR hinzugegeben.

2.2.6.2 PCR Abfolge

Der Ablauf einer PCR kann in drei wesentliche Schritte unterteilt werden. Zu Beginn erfolgt die **Denaturierung** der DNA. Dabei wird das genetische Material stark erhitzt, worauf sich die Wasserstoffbrückenbindungen in der DNA lösen und die Doppelstränge aufgetrennt werden. Nach der Erhitzung folgt eine Phase des Abkühlens, damit sich die Stränge nicht wieder aneinanderlegen.

In einer zweiten Phase (**Annealing**) lagern sich die hinzugegebenen Primer an die gewünschte Sequenz in der DNA an und begrenzen diese. Nachfolgend kann die DNA- Polymerase binden und mit der Replikation durch Auffüllen der Einzelstränge mit freien Nukleotiden (dNTPs) beginnen (**Elongation/Amplifikation**). In der Routine wurde der Eppendorf Mastercycler (Hamburg, PCR-Cycler) auf 32 Zyklen eingestellt. Bei

schwierig auszuwertenden Fällen (mit wenig amplifizierter DNA) wurde die Zahl der Zyklen auf beispielsweise 34 erhöht oder in Einzelfällen auch erniedrigt (bei einem Übermaß an DNA).

2.2.7 MSI-Testung mit Fragmentlängenanalyse

Für die finale Fragmentlängenanalyse der MSI-Analyse wurde in einem letzten Schritt der Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems/ Hitachi, Waltham) verwendet, der eine Kapillarelektrophorese durchführt.

2.2.7.1 Zwischenschritt von PCR zum Sequenzer

Nach der PCR wurden die Proben aus dem Mastercycler entnommen und die Vorbereitungen für den Sequenzer getätigt. Verwendet wurden pro 1 µl PCR Produkt 18,5 µl Formamid (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Lot-No: 1611473) und 0,5 µl LIZ Standard (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Lot-No: 1603400), sodass sich insgesamt 20 µl in einem Reaktionsgefäß befanden. Der Standard wird zu jeder Probe hinzugegeben, um eine Vergleichbarkeit zu schaffen. Da die Messgröße des Standards bekannt ist, kann die Messgröße der Probe durch einen relativen Vergleich der beiden bestimmt werden. Anschließend erfolgte eine kurze Denaturierungsphase, die erneut in dem Eppendorf Mastercycler (Hamburg) stattfand. Nach Entnahme der Proben wurden diese sofort für etwa zwei Minuten auf Eis gelegt. In der Zwischenzeit konnte das Sequenziergerät eingerichtet werden und anschließend mit den Proben versehen und gestartet werden.

2.2.7.2 Auswertung

Ein an das Sequenziergerät angeschlossener Computer mit dem Programm „GeneMapper“ (Applied Biosystems, Waltham) erstellte durch die gewonnenen Daten aus Länge der PCR-Produkte und Signalhöhe (Peaks) Graphen (Elektropherogramme) von Tumorgewebe und Normalgewebe bei festgelegten Nukleotidsequenzen (s. Abb. 2.7). So konnten die Elektropherogramme von Tumor- und Normalgewebe miteinander verglichen werden. Untersucht wurden die bekannten Marker der MSI Diagnostik: BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 und D17S250. Bei einem mikrosatellitenstabilen Befund (MSS) überschneiden sich die beiden Graphen bzw. konnten praktisch übereinandergelegt werden. Fielen in der Analyse Signalspitzen (Extrapeaks) an verdächtigen Stellen zumeist beim Tumor auf, wurde der Fall mit einer erfahrenen medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin und Biologin des Instituts diskutiert. So konnte zusammen

eingeschätzt werden, ob es sich um ein Artefakt in der Auswertung oder um eine MSI des entsprechenden Markers handelte (s. Abb. 2.8).

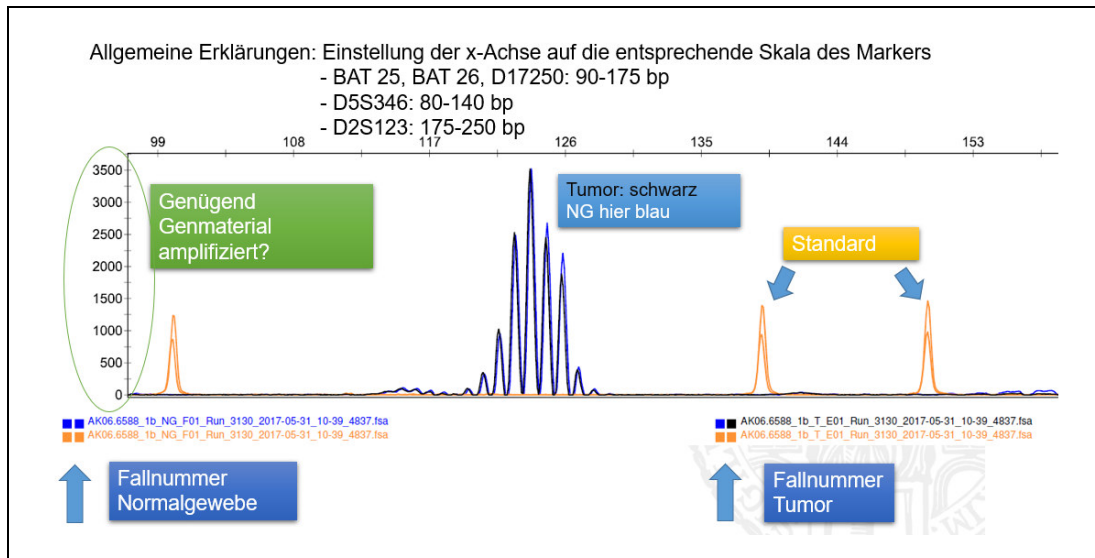


Abb. 2.7: Beispielhafte Darstellung des MSI-Markers BAT25 mit Erklärung der Vorgehensweise bei der Auswertung. Es war ausreichend DNA für die Sequenzierung vorhanden. LIZ-Standard: gelb, Tumor: schwarz, Normalgewebe (NG): blau.

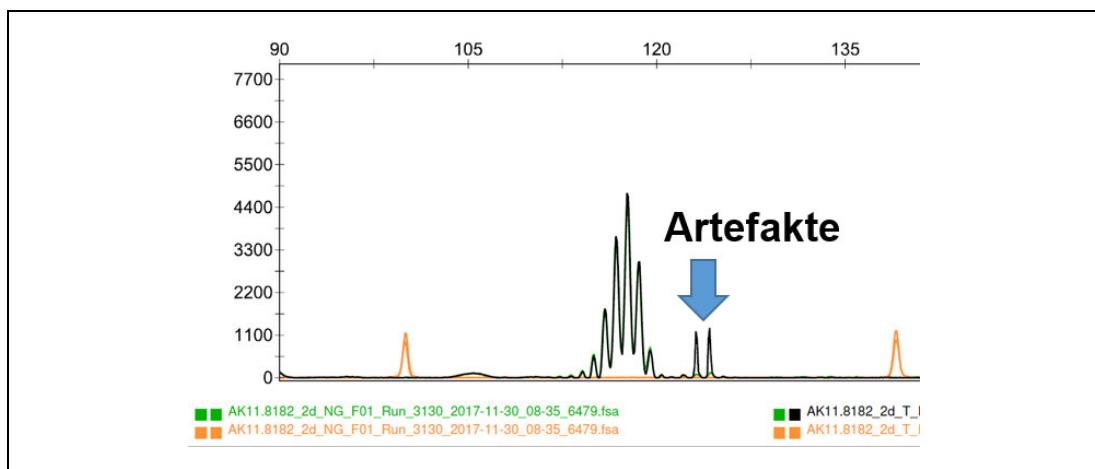


Abb. 2.8: Darstellung eines Artefaktes in einer MSI-Analyse bei BAT26.

2.2.7.3 MSI Wiederholung und Problemfälle

2.2.7.3.1 Erste Wiederholung

Nach Auswertung der Analysen war es nötig, bei insgesamt zwölf Fällen eine erste Wiederholung anzuschließen, da die Ergebnisse nicht eindeutig auszuwerten waren. Ein Beispiel für eine unzureichende Amplifikation des genetischen Materials ist in Abb. 2.9 zu

erkennen. BAT26 auf der linken Seite ist gut auszuwerten; Tumor- und Normalgewebe sind ausreichend amplifiziert und können praktisch identisch übereinandergelegt werden. Auf der rechten Seite zur Messung des Markers D17S250 finden sich nur sehr kleine Tumorpeaks (schwarz), das Normalgewebe (grün) ist hier gar nicht amplifiziert worden. Bei der ersten Wiederholung wurde deshalb die Lösung der extrahierten DNA von 1 µl auf 4 µl für den Ansatz der PCR gesteigert. Das Ergebnis dieser Wiederholung ist in Abb. 2.10 zu sehen, wobei ausreichend Normalgewebe messbar war, jedoch das Tumorgewebe nicht amplifizierte.

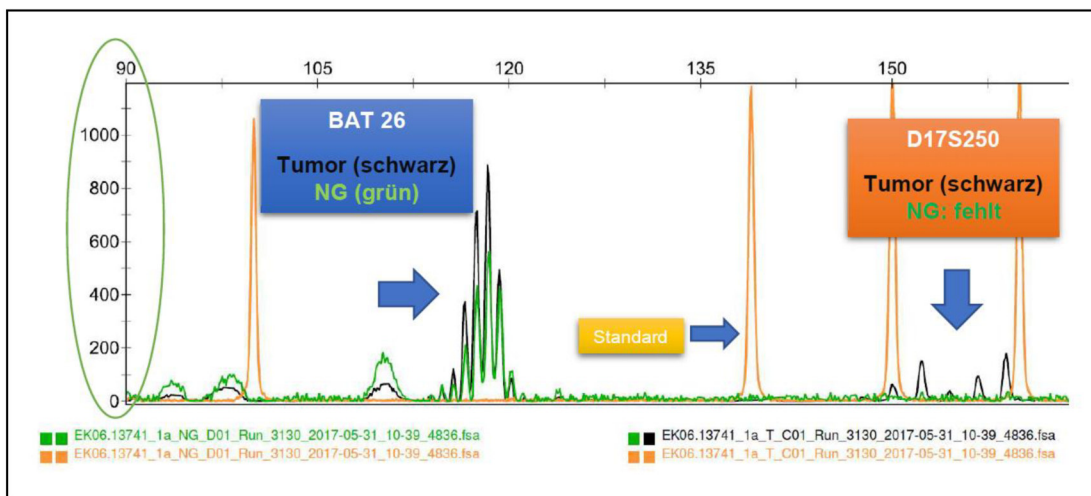


Abb. 2.9: Beispielhafte Darstellung eines Falls mit Schwierigkeiten bei der Auswertung: BAT26 (links) ist ausreichend dargestellt und als mikrosatellitenstabil zu werten, genügend DNA ist amplifiziert worden. Dagegen ist bei dem Marker D17S250 (rechts) nur wenig Tumor-DNA amplifiziert/gemessen. Normalgewebe fehlt ganz (nur „Rauschen“).

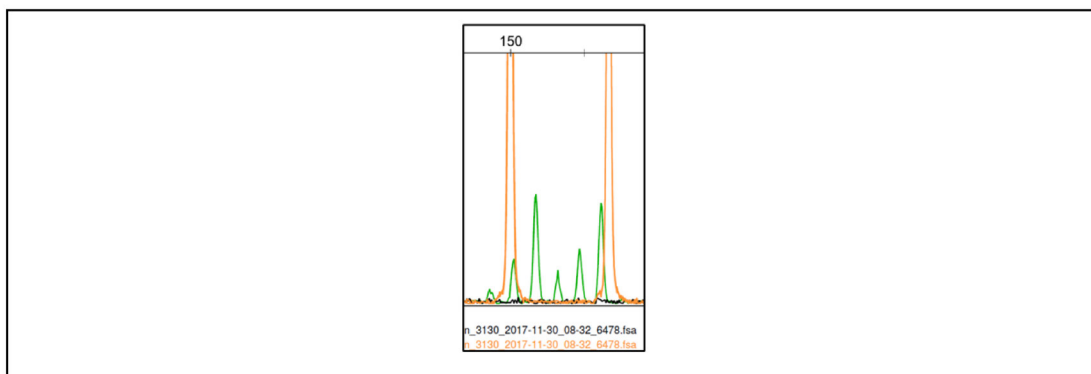


Abb. 2.10: Der gleiche Fall bei der Wiederholung. Bei diesem Lauf (im Bereich von D17S250) wurde genügend DNA aus Normalgewebe gemessen, aber Tumor-DNA fehlt komplett.

2.2.7.3.2 Zweite Wiederholung

Die erste Wiederholung führte bei vier der zwölf Problemfällen zu einer verbesserten Auswertung. Eine zweite Wiederholung musste für weitere acht Fälle angeschlossen werden, wobei 3-4 µl DNA verwendet wurden und zusätzlich die Zyklenzahl der PCR-Maschine um zwei Zyklen (in einem Fall um drei Zyklen) erhöht wurde. Im Fall Nr. 23 war es vorher zu einer Tumorüberladung in der Messung gekommen, weshalb die Wiederholung mit 0,6 µl Tumor-DNA und einer Reduktion um zwei Zyklen durchgeführt wurde.

2.2.7.3.3 Dritte Wiederholung

Bei vier Fällen verblieb auch nach der zweiten Wiederholung kein eindeutiges Ergebnis. Deshalb wurde in einer dritten Wiederholung bei diesen vier Fällen die DNA erneut von vorhandenen, ungebrauchten Leerschnitten extrahiert. In zwei Fällen wurden je 2 und 4 µl DNA-Lösung verbraucht, in den beiden letzten Proben war genügend Tumorgewebe, aber zu wenig Normalgewebe vorhanden, welches darauf auf 3 µl und 4 µl gesteigert wurde. In Tabelle 6 sind alle Wiederholungsläufe mit der verwendeten DNA-Menge und variierten Anzahl der PCR-Zyklen zusammengefasst.

Nummer	1. Wiederholung	2. Wiederholung	3. Wiederholung
2	X 4µl	X 3µl, Cyclor +2	
6	X 4µl	X 3µl, Cyclor +2	X 2µl T u. NG
8	X 4µl		
9	X 4µl	X 3µl, Cyclor +2	
11	X 4µl	X 3µl, Cyclor +2	
12	X T: 1µl; NG: 3µl		
13	X 4µl	X 4µl, Cyclor +3	X 4µl T u. NG
14	X T: 1µl; NG: 3µl		
15	X 4µl	X 3µl T u. NG, Cyclor +2	
16	X T: 1µl; NG: 3µl		
23	X T: 1µl; NG: 4µl	X T: 0,6µl -2 Cyclen, NG: 4µl +2 Cyclen	X T: 1µl u. NG: 3µl
24	X 4µl	X T: 3µl +2 Cyclen, NG: 3µl +2 Cyclen	X T: 1µl u. NG: 4µl

Tabelle 6: Farbliche Darstellung der Wiederholungsläufe. X: Im vorherigen Durchlauf keine ausreichende Analyse möglich, T: Tumor-DNA in µl, die verwendet wurde, NG: Normalgewebe- DNA in µl, die verwendet wurden, Cyclor: Veränderung der Zyklen der PCR-Maschine von ursprünglich 32 Zyklen.

2.2.8 Pyrosequenzierung für die BRAF- und RAS-Analyse

Nach den abgeschlossenen MSI-Analysen erfolgte mit dem gewonnenen DNA-Material aus den Tumorzellen eine weitere PCR für die anschließende Pyrosequenzierung (Pyro Mark Q24 Vacuum Prep Workstation und Pyro Mark Q24 Messgerät, Qiagen, Hilden). Das Verfahren der Pyrosequenzierung eignet sich dabei besonders gut für die Analyse von Punktmutationen. Für die *BRAF* und *RAS* Untersuchung wurden jeweils spezifische Primer (s. Tabelle 7) verwendet (Biomers, Ulm), die nachfolgenden Schritte der Pyrosequenzierung verliefen bei *BRAF* und *RAS* nach dem gleichen Schema ab. Es wurde in einem ersten Lauf *BRAF* Exon 15 (Position V600E) bei allen Tumorfällen untersucht. Bei der *RAS*-Diagnostik wurden *KRAS* (Exon 3 p.59,61, Exon 4 p.117, Exon 4 p.146 und Exon 2 p.12,13) und *NRAS* (Exon 2 p.12,13, Exon 3 p.59,61, Exon 4 p.146, Exon 4 p.117) analysiert.

2.2.8.1 PCR für die Pyrosequenzierung

Für die PCR wurde zuerst ein Mastermix-Ansatz für 50 Proben angesetzt, bestehend aus 810 µl destilliertem Wasser, 100 µl Pufferlösung (Qiagen, Hilden, Lot-No: 154040184), 10 µl dNTP (GE Healthcare, Chicago, Lot-No: 9740280), 20 µl der spezifischen Primerlösung (Biomers, Ulm) und 10 µl Taq Polymerase (Qiagen, Hilden, Lot-No:157025298). Zu 19 µl des Mastermixes wurde jeweils 1 µl des DNA-Gemisches hinzugegeben. Anschließend konnte die PCR gestartet werden.

2.2.8.2 Verwendete Primer

Panel	Gen	Genabschnitt	Name Datenbank	Sequenz	LOT Nr.
P4	BRAF	Ex15	BRAF-Ex15-Pyro-F1	TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG	1921624
P4	BRAF	Ex15	BRAF-Ex15-Pyro-R1-BIO	TCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT	241372-3
P4	BRAF	Ex15	BRAF-Ex15-Pyro-S1	GTA AAAATAGGTGATTTTGG	218991-4
P1	KRAS	Ex02-p.12,13	KRAS-Pyro-F1	NNNGGCCTGCTGAAAATGACTGAA	258353-1
P1	KRAS	Ex02-p.12,13	KRAS-Pyro-R1-BIO	TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT	263353-6
P1	KRAS	Ex02-p.12,13	KRAS-Pyro-S1	TGTGGTAGTTGGAGCT	1351621
P13	KRAS	Ex03-p.59,61	KRAS Ex3 p59, p61 F3	AATTGATGGAGAAACCTGTCTCTT	1351628
P13	KRAS	Ex03-p.59,61	KRAS Ex3 p59, p61 R2-Bio	TCCTCATGTA CTGGTCCCTCATT	171582-8
P13	KRAS	Ex03-p.59,61	KRAS Ex3 p59, p61 S5	TCTCTGGATATTCTCGAC	171582-9
P14	KRAS	Ex04-p.117	KRAS Ex4 p117 F1	CTGAAGATGTACCTATGGTCCTAG	1351622
P14	KRAS	Ex04-p.117	KRAS Ex4 p117 R1-BIO	CTGAGCCTGTTTGTGTACTAGT	171582-2
P14	KRAS	Ex04-p.117	KRAS Ex4 p117 S1	ACCTATGGTCCTAGTAGGAA	1351624
P15	KRAS	Ex04-p.146	KRAS Ex4 p146 F2	GGCTCAGGACTTAGCAAGAAGTTA	1614062
P15	KRAS	Ex04-p.146	KRAS Ex4 p146 R2-BIO	AGTTATGATTTTGCAGAAAACAGA	171582-5
P15	KRAS	Ex04-p.146	KRAS Ex4 p146 S2	GAATTCCTTTTATTGAAAC	1351627
P6	NRAS	Ex02-p.12,13	NRAS codon 12,13 F4	CTTGCTGGTGTGAAATGACTGAG	263353-8
P6	NRAS	Ex02-p.12,13	NRAS codon 12,13 R6-BIO	TGATTGTACAGTGCCCTTTT	1943013
P6	NRAS	Ex02-p.12,13	NRAS codon 12,13 S	TGGTGGTGGTTGGAG	263353-10
P16	NRAS	Ex03-p.59,61	NRAS Ex3 p59, p61 F1	AAACCTGTTTGTGGACATACTG	1351631
P16	NRAS	Ex03-p.59,61	NRAS Ex3 p59, p61 R1-Bio	TATTGGTCTCTCATGGCACTGT	171582-11
P16	NRAS	Ex03-p.59,61	NRAS Ex3 p59, p61 S1	TTGTTGGACATACTGGAT	1614065
P18	NRAS	Ex04-p.117	NRAS Ex4 p117 F1-Bio	ATGATGTACCTATGGTGCTAGTGG	171582-13
P18	NRAS	Ex04-p.117	NRAS Ex4 p117 R1	CGTAACTCTTGGCCAGTTCCG	1679502
P18	NRAS	Ex04-p.117	NRAS Ex4 p117 S1	TCCTTGTGGCAAATC	182358-18
P17	NRAS	Ex04-p.146	NRAS Ex4 p146 F1	CGAACTGGCCAAGAGTTACG	1679504
P17	NRAS	Ex04-p.146	NRAS Ex4 p146 R1-BIO	TGAAAGCTGTACCATACCTGTCTG	171582-17
P17	NRAS	Ex04-p.146	NRAS Ex4 p146 S1	TCCATTCATTGAAACCT	1351630

Tabelle 7: Angabe der Primer, die für die BRAF- und RAS-Analysen verwendet wurden; jeweils ein Forward- (F1) und ein Reverse- Primer (R1) für die PCR-Analyse sowie ein Primer für die Pyrosequenzierung (S1) (Balschun et al., 2011; Jung, 2015; Ogino et al., 2005).

2.2.8.3 Zusammenfassung der Bestandteile für den Mastermix der BRAF- und RAS-PCR:

- 810 µl destilliertes Wasser
- 100 µl Pufferlösung (Qiagen, Hilden, Lot-No: 154040184)
- 10 µl dNTP (GE Healthcare, Chicago, Lot-No: 9740280)
- 20 µl Primerlösung (Biomers, Ulm, Lot-No: PM1746012)
- 10 µl Taq Polymerase (Qiagen, Hilden, Lot-No:157025298)

2.2.8.4 Vakuum Prep Station

Ein wichtiger Zwischenschritt nach der PCR mit Vorbereitung der Proben auf die letztendliche Pyrosequenzierung fand in der Pyro Mark Q24 Vacuum Prep Workstation (Qiagen, Hilden) statt, die aus insgesamt fünf Becken einer „Waschstraße“ bestand (s. Abb.2.11). An der Pumpe/Saugkopf des Systems befanden sich mehrere Metallsaugstifte, woran die Sepharose-Beads mit der DNA während der „Waschstraße“ gebunden wurden.

Das erste Becken war mit 70 % Ethanol befüllt (50 ml), im zweiten Becken befand sich Denaturierungslösung (40 ml), danach folgte eine Station mit Waschpuffer (50 ml). Die übrigen zwei Becken waren mit destilliertem Wasser befüllt und dienten zum Reinigen der Pumpe des Systems. Am Ende erfolgte die Übertragung in eine Flachbodenplatte (PyroMark Q24 Platte, Qiagen, Hilden).

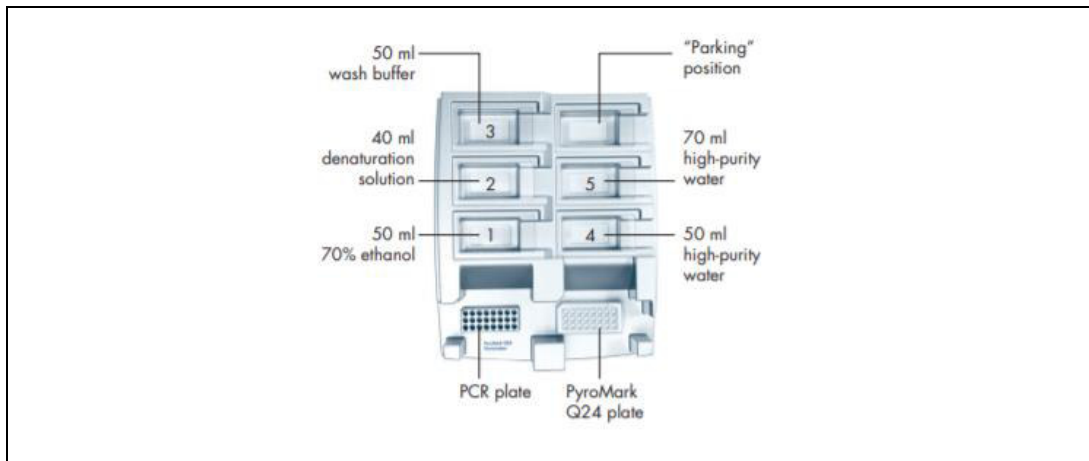


Abb. 2.11: Darstellung der Vakuum Prep Station mit ihren 5 Becken, die mit unterschiedlichen Flüssigkeiten im Waschvorgang befüllt waren. Beschreibung nach dem PyroMark® Q24 Vacuum Workstation quick-start guide Protokoll (QIAGEN, 2012, December).

2.2.8.5 Vorbereitung und Durchführung

Im Folgenden werden die genauen Schritte dieses Vorgangs beschrieben:

1. Herstellung eines „Bead-Mix“ für 32 Proben: 32 μ l „Beads“ (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare, Chicago, Lot-No: 10235656), 1280 μ l Bindungspuffer (Qiagen, Hilden, Lot-No: 154020017) und 768 μ l Wasser.
2. Herstellung eines Primermixes (Biomers, Ulm) aus Primer (auf 0,3 μ M verdünnt) und „Annealing“-Puffer (Qiagen, Hilden).
3. Gabe von 65 μ l des „Bead-Mix“ in jede Vertiefung der Spitzbodenplatte, anschließende Zugabe von je 15 μ l des PCR Produktes.
4. Schütteln der Spitzbodenplatte bei 1400 rpm für 5-10 Min auf einer Schüttelplatte (Monoshake Thermo Electron LED, Langenselbold).
5. Hinzugabe von je 25 μ l Primermix in die Spitzbodenplatte, anschließend Transfer der Spitzbodenplatte in die Vakuum Prep Station.
6. Anschalten und Überprüfen/Waschen der Pumpe der Vakuum Prep Station mit Wasser.

7. Befüllen der einzelnen Kammern der „Waschstraße“.
8. Aufsaugen/Absaugen der Flüssigkeit („Beads“ und PCR-Produkt) in der Spitzbodenplatte mit der Pumpe der Vakuum Prep Station.
9. Transfer der Pumpe für ca. 5-10 Sekunden in die 1. Kammer: Waschen mit 50 ml Ethanol (70 %) (Pan Reac AppliChem, Darmstadt).
10. Transfer in 2. Kammer: Spülen in 40 ml alkalischer Denaturationslösung (Qiagen, Hilden).
11. Transfer in 3. Kammer: Neutralisierung mit Waschpuffer (Qiagen, Hilden).
12. Anheben der Pumpe, um 90 °C vertikal drehen und kurz absaugen lassen.
13. Ausrichten der Pumpe über der Flachbodenplatte (Pyromark Q24 Platte, Qiagen, Hilden), dann die Pumpe abschalten. Die „Beats“ mit der gebundenen DNA konnten nun durch vorsichtiges Rütteln übertragen werden.
14. Abschließend erneutes Anheben der Pumpe und spülen mit 70 ml Wasser.
15. Transfer in die 4. und 5. Kammer mit 50 ml Wasser zum Säubern und Spülen. Anschließend auf vorgesehener Position parken.
16. Erhitzen der Flachbodenplatte (Pyromark Q24 Platte) auf einer Heizplatte (Präzitherm, Störk Tronic, Stuttgart) mit PyroMarkQ24 Halterung (Qiagen, Hilden) für 2 Minuten auf 80 °C.

2.2.8.6 Analyse im Pyro Mark Q24 Messgerät

Nach Durchlaufen der Vakuum Prep Station wird das Pyro Mark Q24 Messgerät (Qiagen, Hilden) für die eigentliche Pyrosequenzierung vorbereitet. Dafür wird eine PyroMark® Q24 Cartridge (Kartusche mit verschiedenen Hohlräumen für die benötigten Reagenzien, Qiagen, Hilden) mit den verschiedenen Nukleotiden A/C/G/T und einem Enzym- sowie Substratmix (PyroMark Gold Q24 Regents, Qiagen, Hilden) befüllt. Eine Skizze der PyroMark Q24 Kartusche ist in Abb. 2.12 dargestellt.

Exemplarisch wird dies für die BRAF-Analyse (1. Lauf mit Probe 1-21) vorgestellt:

Bei dem ersten Lauf der *BRAF*-Analyse wurden 21 Fälle plus eine Positivkontrolle, ein Wildtyp und ein MIX (= 24 Plätze in einem Lauf) untersucht. Von den verschiedenen Nukleotiden wurden folgende Mengenangaben in die Kartusche befüllt:

- Nukleotid A: 71 µl (in Fach A)
- Nukleotid C: 63 µl (in Fach C)

- Nukleotid G: 68 μ l (in Fach G)
- Nukleotid T: 68 μ l (in Fach T)
- Enzymmix: 119 μ l (in Fach E)
- Substratmix: 119 μ l (in Fach S)

Anschließend konnte die Pyrosequenzierung gestartet werden.

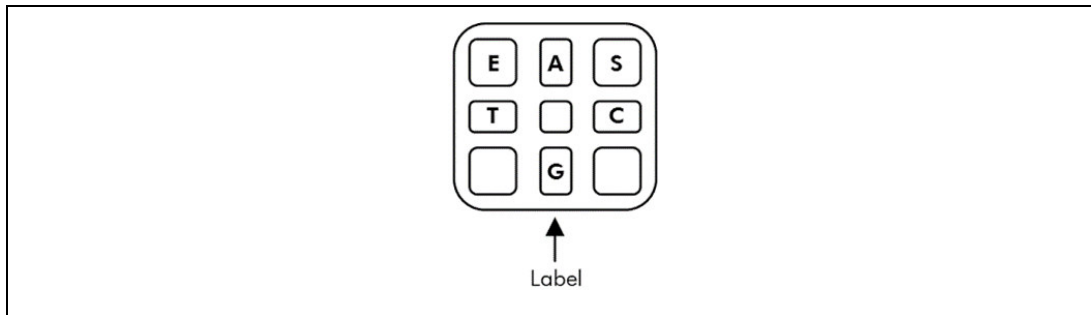


Abb. 2.12: Grafische Darstellung der PyroMark Q24 Kartusche in der Aufsicht (Produktblatt PyroMark® Q24 Cartridge Version 3, <https://www.Qiagen.com/it/resources/download.aspx?id=9f763b95-b523-4d27-b5dc-2e0b06d707c5&lang=de-DE>, 31.07.2020).

2.2.9 Auswertung der Ergebnisse

Während der Analysen wurden alle gewonnenen Rohdaten von Gensequenzen als Pyrogramme (graphische Darstellung von Nukleotidfrequenzen) auf einem USB-Stick zwischengespeichert. Nach Abschluss der Analysen können diese Daten mit dem Programm PyroMark Q24 2.0.8 (Qiagen, Hilden) angesehen und verglichen werden (s. Abb. 2.13). Mit einer erfahrenen medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin (Sabine Jung) wurden die Ergebnisse zusammen analysiert und gemeinsam entschieden, ob es sich um einen Wildtyp (WT) oder eine Mutation handelt. In jedem Lauf der Pyrosequenzierung wurde eine Positivkontrolle, ein Wildtyp und ein MIX (= Negativkontrolle, Reagenzien ohne PCR Produkt) mitgeführt. Bei einer Mutation kam es zu Signalsteigerungen für eines der Nukleotide, im Vergleich zu dem Wildtyp ohne Signalsteigerung.

Die Daten wurden in die öffentliche Datenbank COSMIC-Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC, 2020, August 27) eingetragen und dadurch die genaue Punktmutation bestimmt.

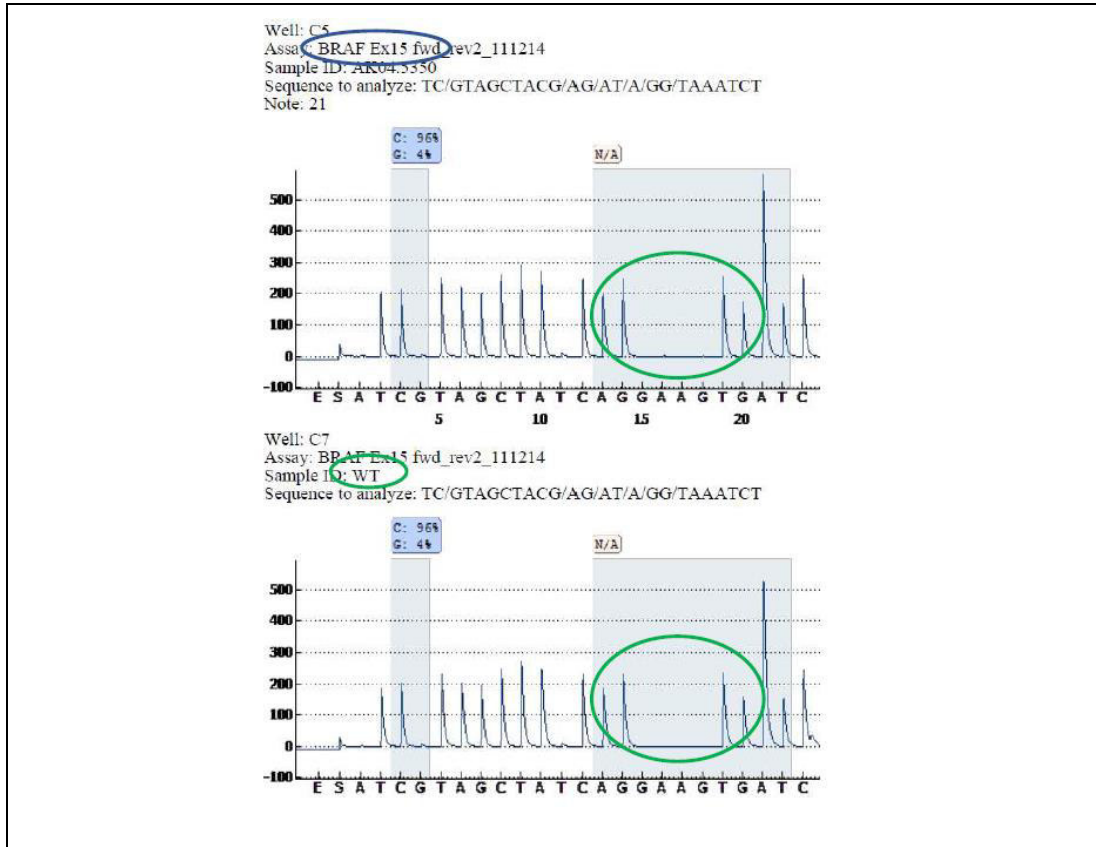


Abb. 2.13: Veranschaulichung einer BRAF Untersuchung des Exon 15 (oberes Pyrogramm). Vergleich mit dem entsprechenden Wildtyp (unteres Pyrogramm) in der grün umkreisten Region. Hier finden sich keine zusätzlichen Signale, also entsprechend einem Wildtyp (keine Mutation).

3 ERGEBNISSE

Wie bereits in einem oberen Abschnitt erläutert, konnten insgesamt zehn Fälle nicht in die Untersuchungen eingeschlossen werden. Ursache hierfür war nicht verfügbares Normalgewebe für die MSI-Testung in drei Fällen und ein zu geringer Anteil an Tumorzellen bei sechs endometrioiden und einem klarzelligem Karzinom.

3.1 Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse

Von den 22 analysierten endometrioiden Ovarialkarzinomen zeigten sich 20 Karzinome in allen fünf untersuchten MSI-Markern mikrosatellitenstabil (MSS). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 verkürzt dargestellt und in Tabelle 9 am Ende des Kapitels ausführlich aufgelistet. In Abbildung 3.3 ist beispielhaft eine ideale Auswertung eines mikrosatellitenstabilen Markers gezeigt. Alle untersuchten Marker sind ausreichend amplifiziert, Tumor- und Normalgewebe liegen identisch übereinander. Zum Vergleich dient die verwendete Positivkontrolle in Abbildung 3.4 (ein high-grade seröses, mikrosatelliteninstabiles Ovarialkarzinom). In allen Markern fallen Extrapeaks und Verschiebungen zwischen Tumor- und Normalgewebe auf.

Einmalig im Kollektiv konnte ein instabiler Marker (BAT25) detektiert werden (Nr. 12), was somit als MSI-L (low-grade) zu werten war (s. Abb. 3.6). In einem weiteren Fall war von einem high-grade MSI positiven Befund (Nr. 13) mit einer Instabilität in BAT25 und D2S123 auszugehen (s. Abb. 3.5). Jedoch ist bei diesem Fall nur wenig Gewebe in den Elektropherogrammen gemessen worden, weshalb eine vollständige Auswertung schwierig erschien. Die Marker BAT26, D17S250 und D5S346 konnten im Fall Nr. 13 trotz vier Wiederholungen nicht vollständig ausgewertet werden.

Das seröse Karzinom (Positivkontrolle), vorher in der Immunhistochemie als MSI positiv getestet (s. Abb. 3.1), fiel ebenfalls in dieser Untersuchung mikrosatelliteninstabil aus. Da es sich um die Positivkontrolle handelt, ist die Nr. 14 in der Ergebnistabelle in Klammern gesetzt aufgeführt (s. Tabelle 9 und 10). Von den drei klarzelligem Karzinomen waren alle mikrosatellitenstabil.

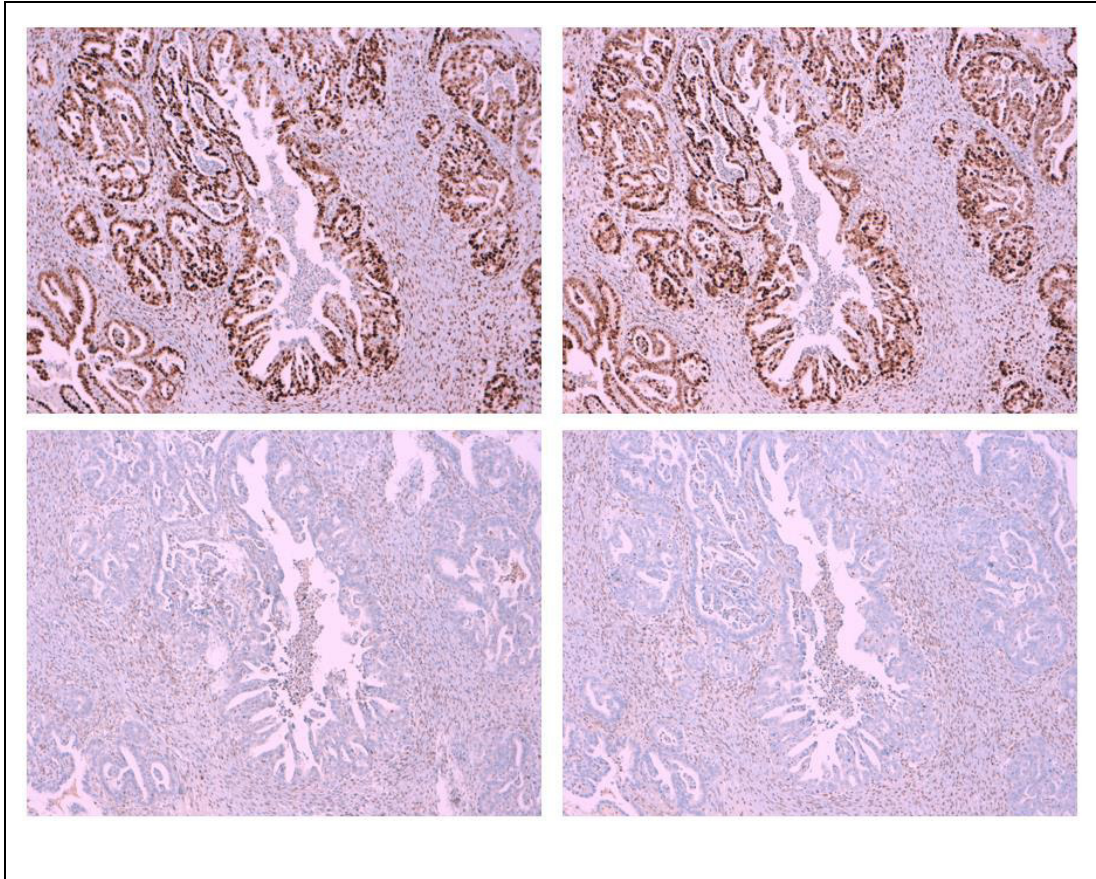


Abb. 3.1: Immunhistochemie der mitgeführten Positivkontrolle eines serösen Ovarialkarzinoms, das in der molekulargenetischen Untersuchung ebenfalls MSI positiv ausfiel. Links oben MLH1 Testung, rechts oben PMS2 Testung, beide unauffällig. Auf den Bildern der unteren Reihe fällt ein Ausfall von MSH 2 und MSH 6 auf.

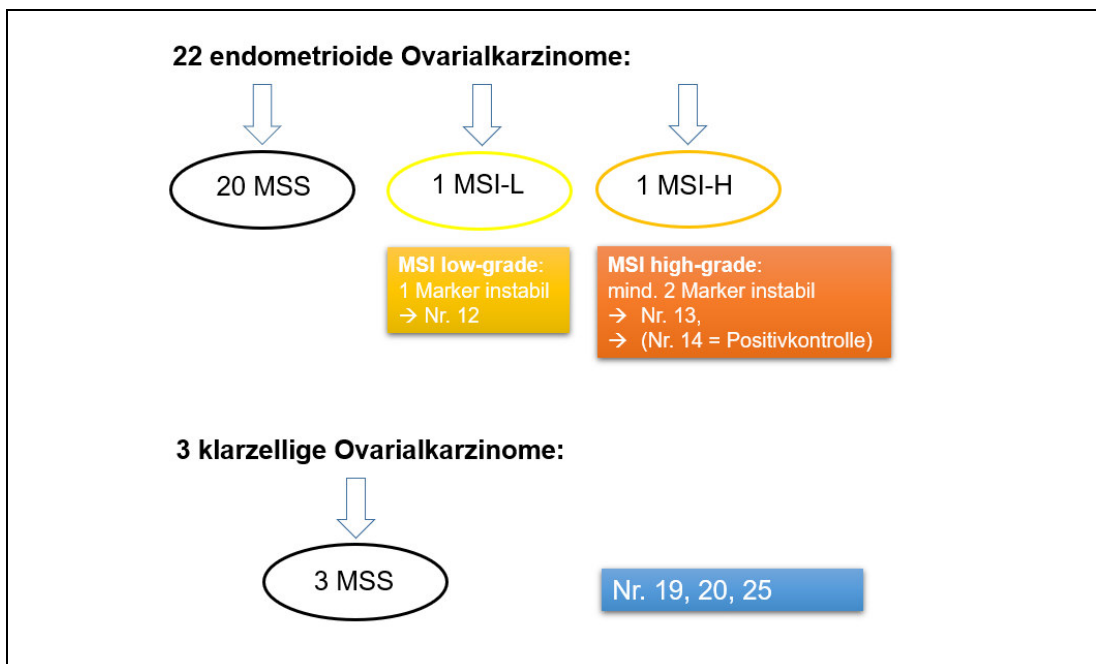


Abb. 3.2: Vereinfachte Darstellung der Ergebnisse der MSI-Testung.

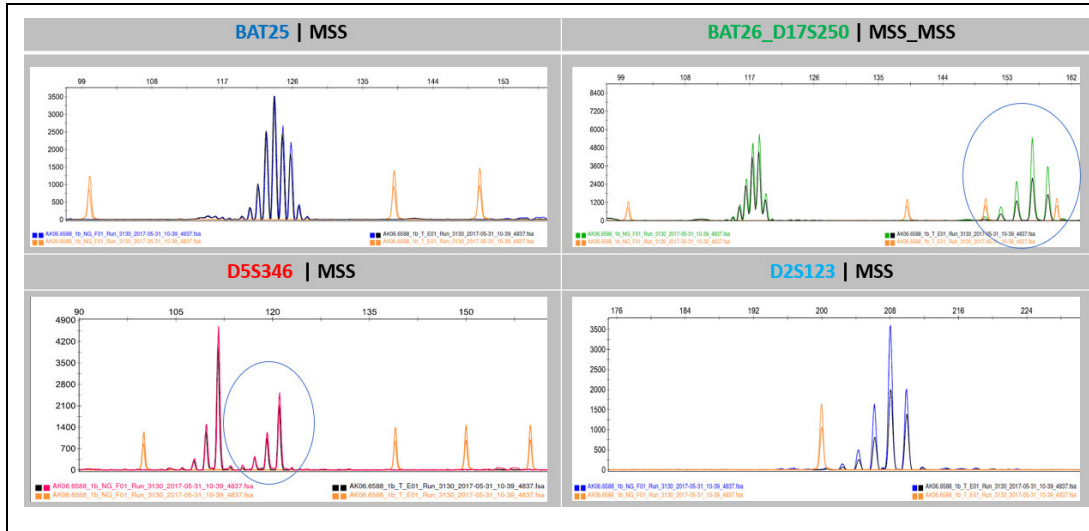


Abb. 3.3: Darstellung der Ergebnisse eines idealen Falls in der Auswertung, hier Nr. 7 (AK06.6588_1b). Alle Marker sind ausreichend gemessen und deutlich dargestellt, Tumor- und Normalgewebe liegen nahezu identisch übereinander. Ein mikrosatellitenstabiler Befund.

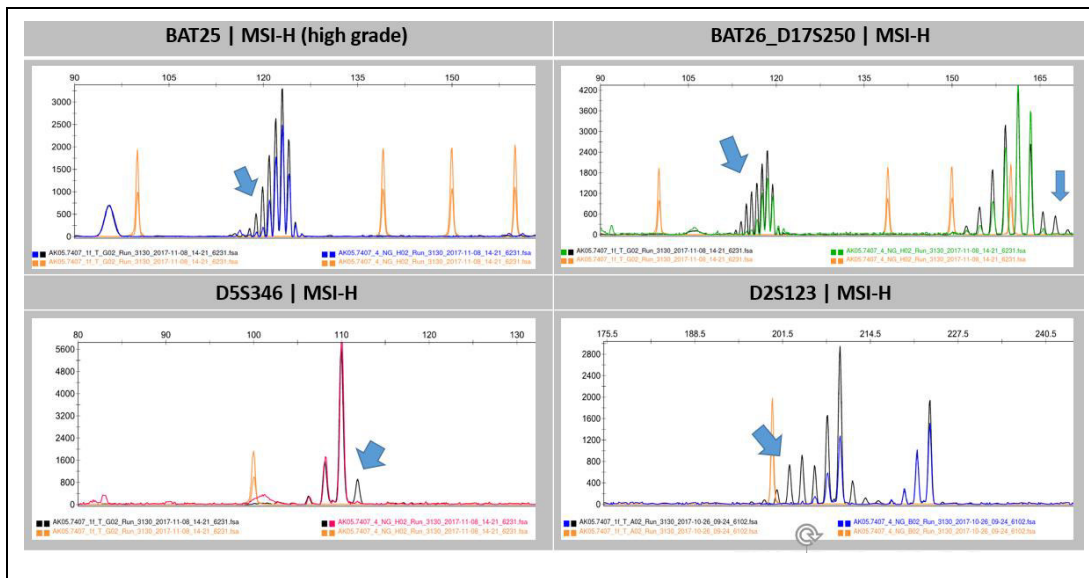


Abb. 3.4: Darstellung eines MSI-H Befundes (Nr. 14 - seröses Ovarialkarzinom, Positivkontrolle). Alle fünf Marker sind instabil.

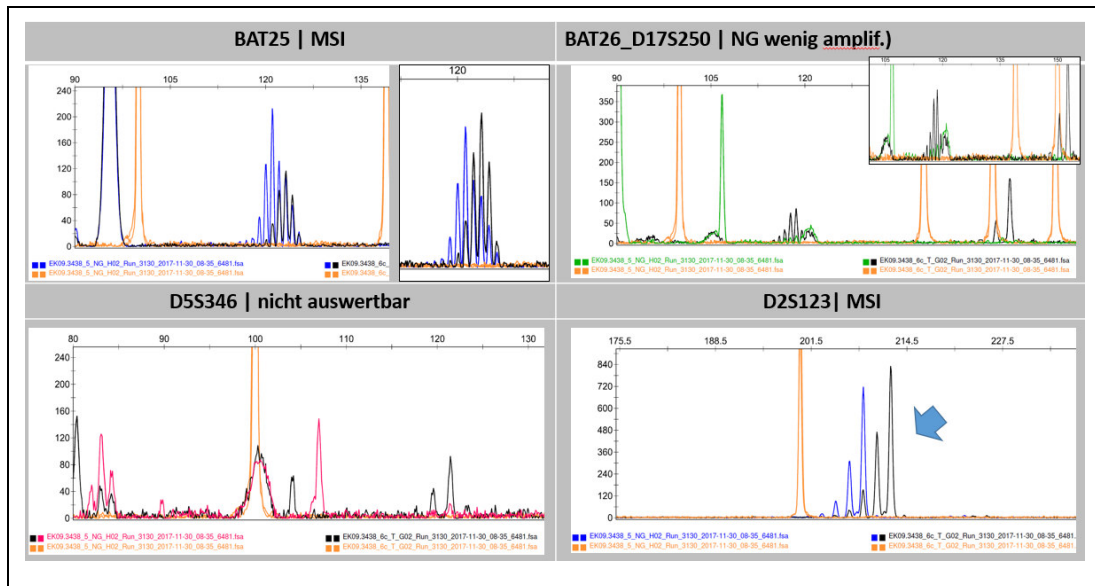


Abb. 3.5: Ergebnisse der MSI-Testung des high-grade MSI positiven Falls (Nr. 13), mit Schwierigkeiten bei der Auswertung. Bei BAT25 und D2S123 ist das Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe verschoben, die Marker sind instabil. Dagegen sind die anderen Marker kaum bis nicht auswertbar.

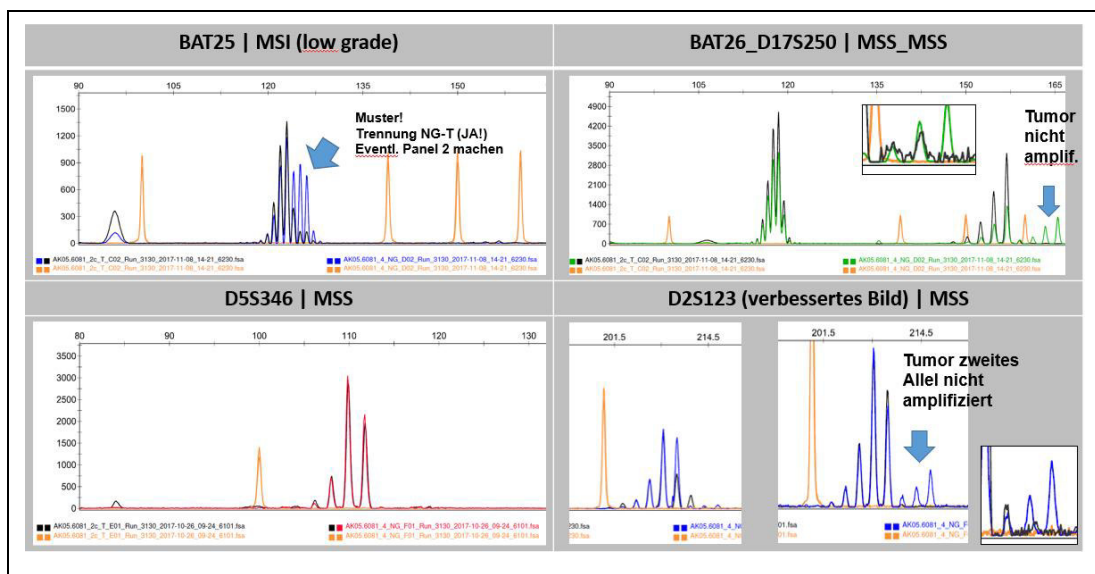


Abb. 3.6: Ergebnisse des low-grade MSI getesteten Falls (Nr. 12) mit Schwierigkeiten in der Auswertung.

3.2 BRAF-Analyse

Es wurde bei *BRAF* das Exon 15 an der Position V600 E untersucht. In allen untersuchten Fällen wurde keine Mutation für *BRAF* nachgewiesen.

3.3 RAS-Analyse

Bei den *RAS*-Onkogenen wurden *KRAS* und *NRAS* an unterschiedlichen Genloci mit bekannten Positionen für Punktmutationen untersucht. Es wurde für *KRAS* und *NRAS* je das Exon 3 (p.59,61), das Exon 4 (p.117 und p.146) und das Exon 2 analysiert. Bei der *RAS*-Testung konnte für *NRAS* keine Mutation im Kollektiv nachgewiesen werden. Insgesamt konnten fünf Mutationen (das mitgetestete seröse high-grade Karzinom nicht mitgezählt) bei *KRAS* Exon 2 detektiert werden (5/22 – 22,7%), wie in Tabelle 8 verkürzt dargestellt. Davon waren alle Tumoren von endometrioider Histologie. Eine fragliche *KRAS* Exon 3 p.59,61 Mutation bestand in einem Fall (Nr. 26). Im Exon 3 und 4 des *KRAS*-*Gens* fanden sich keine Mutationen. Zweifach wurden spezifische Mutation bei *KRAS* (c.35 G>A, p. G12D) mit dem Resultat von Aspartat als Aminosäure nachgewiesen und *KRAS* (c. 35 G>C, p. G12A) mit Alanin als Aminosäure. Tabelle 10 am Ende des Kapitels gibt eine Übersicht über alle *BRAF* und *RAS* Ergebnisse der aktuellen Arbeit.

Nummer	KRAS Exon 2 Ogino
7	c.35 G>A p.G12D (Aspartat)
10	c.35 G>C p.G12A (Alanin)
15	c.35 G>A p.G12D (Aspartat)
18	c.35 G>T p.G12V (Valin)
21	c.35 G>C p.G12A (Alanin)
(14- serös high grade)	c.38 G>A p.G13D (Aspartat)

Tabelle 8: Auflistung der *KRAS* (Exon 2) Punktmutationen mit Austausch eines Nukleotids in der Sequenz (z. B. G>T: Guanin zu Thymin), worauf sich die resultierende Aminosäure ändert. Der seröse Tumorfall (Positivkontrolle der MSI-Testung, nicht zum eigentlichen Kollektiv gehörend) wurde mitgetestet und ist hier zur Vollständigkeit mitaufgeführt.

Nummer	BAT25	BAT26 D17S250	D5S346	D2S123
1	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
2	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
3	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
4	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
5	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
6	MSS	MSS (D17S250 T nicht amplif.)	MSS	nicht amplif.
7	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
8	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
9	MSS	MSS (D17S250 nicht amplif.)	MSS	MSS
10	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
11	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
12	MSI-low grade	MSS, MSS	MSS	MSS
13	MSI-high grade (wenig amplif.)	wenig amplif.	nicht amplif.	MSI-high grade
14	MSI-high grade Linksverschiebung	MSI	MSI	MSI
15	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
16	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
17	MSS fragl., Linksverschiebung, aber stabil, leicht überladen	MSS, MSS	MSS	MSS
18	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
19	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
20	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
21	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
22	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
23	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
24	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
25	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS
26	MSS	MSS, MSS	MSS	MSS

Tabelle 9: Ergebnisse der MSI-Analyse des Kollektivs (endometrioider Tumor, klarzelliger Tumor - Nr. 19,20,25). MSI positive Fälle in orange. BAT26 und D17S250 werden jeweils zusammen aufgeführt, da sie in einer Einstellung abgelesen werden können. Der Fall Nr. 14 ist die Positivkontrolle zum Kollektiv.

Nummer	BRAF Auswertung 0= keine Mutation; 1= Mutation	RAS Auswertung 0= keine Mutation; 1= Mutation, X=nicht auswertbar							
		KRAS Exon 3 p.59,61	KRAS Exon 4 p.117	KRAS Exon 4 p.146	NRAS Exon 2 p.12,13	NRAS Exon 3 p.59,61	NRAS Exon 4 p.146	NRAS Exon 4 p. 117	KRAS Exon 2 Ogino
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	c.35 G>A p.G12D (Aspartat)
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	c.35 G>C p.G12A (Alanin)
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	X	X	X	X	X	X	X	X
14	0	0	0	0	0	0	0	0	c.38 G>A p.G13D (Aspartat)
15	0	0	0	0	0	0	0	0	c.35 G>A p.G12D (Aspartat)
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	c.35 G>T p.G12V (Valin)
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	c.35 G>C p.G12A (Alanin)
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	Unsicheres Ergebnis: c.184 G>A p.E62K	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 10: Ergebnisse der BRAF- und RAS-Analysen mit den jeweiligen Punktmutationen. Fall 19,20,25 sind klarzellige Tumoren. X: keine Auswertung möglich mit dem genetischen Material des Falls Nr. 13.

4 DISKUSSION

4.1 Die Erkrankung

Das Ovarialkarzinom gilt auch heute noch in Zeiten der fortgeschrittenen Medizin als Karzinom mit sehr hoher Mortalität. Etwa 240.000 Frauen erkranken weltweit jährlich an einem Ovarialkarzinom, etwa 150.000 Todesfälle gehen auf diesen gynäkologischen Tumor zurück (Webb et al., 2017). Bisher konnte in mehreren Studien für potenzielle Screeningmethoden kein Vorteil im Gesamtüberleben der gescreenten Gruppe aufgezeigt werden (Buys et al., 2011; Henderson et al., 2018; Jacobs et al., 2016). Umso wichtiger wäre es, Risikopersonen zu identifizieren sowie individuelle und hoch wirksame Therapien zu entwickeln, die aktuell beim Ovarialkarzinom noch nicht ausreichend vorhanden sind.

Ovarialkarzinome aufgrund von einer *BRCA* Anlage machen den Großteil der hereditären Karzinome aus (ca. 65-85 %), während dem Lynch-Syndrom als Ursache ein Anteil von etwa 10-15 % zukommt (Ketabi et al., 2011). Am häufigsten entwickeln sich Darm- (40-60 % für Frauen) und Endometrium-Karzinome (bis zu 60 %). Zudem steigert sich das Risiko von 1,6 % auf etwa 10 %, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Stewart et al., 2019). Es bestehen Hinweise, dass besonders die endometrioiden und klarzelligigen Ovarialkarzinome mit einer MSI und somit dem Lynch-Syndrom assoziiert sind (Helder-Woolderink et al., 2016; Ketabi et al., 2011; Leskela et al., 2020; M. A. Murphy et al., 2011; Pal et al., 2008; Vierkoetter et al., 2014). Diese Theorie sollte anhand eines eigenen Kollektivs aus endometrioiden und klarzelligigen Karzinomen des Pathologischen Instituts in München untersucht werden. Mit Hilfe der gewonnenen Daten sollte unter anderem die Bedeutung und Häufigkeit eines defekten MMR-Systems bei den zwei seltenen Subtypen des Ovarialkarzinoms eingeschätzt werden.

4.2 Ergebnisse

Ein Großteil der analysierten endometrioiden Karzinome (n=22) und alle drei klarzelligigen Karzinome zeigten sich in den fünf untersuchten MSI-Markern mikrosatellitenstabil (MSS). Nur in zwei Fällen von endometrioiden Tumoren wurde eine Instabilität detektiert (ein MSI-L und ein MSI-H), entsprechend einer Rate von 9 %. Ein endometrioider Fall (Nr. 13) war in dem gesamten Kollektiv der einzige mit einem high-grade MSI positiven Befund. Zusätzlich ergaben sich bei diesem Fall jedoch mehrere Schwierigkeiten in der Auswertung. Die Marker BAT25 und D2S123 zeigten sich instabil, jedoch konnten die Marker BAT26, D17S250 und D5S346 nicht suffizient ausgewertet werden. In den verwendeten Schnitten des Tumorblocks war zuvor ausreichend Gewebe

vorhanden, was vermuten lässt, dass die Fixierung des Materials möglicherweise nicht optimal erfolgt war.

4.3 MSI Bethesda Panel

Ursächlich für das Lynch-Syndrom mit dem Resultat einer MSI sind vererbte Defekte in den Genen des Mismatch-Reparatursystems (*MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6* und *MSH3*). In einem Tumor resultiert aus einer MSI die Entstehung neuer Allellängen im Vergleich zum gesunden Gewebe, welche mit der MSI-Analyse detektiert werden können (Boland et al., 1998; K. M. Murphy et al., 2006). 1997 wurde von dem National Cancer Institut das Bethesda Panel aus fünf Mikrosatellitenmarkern zur standardisierten Untersuchung einer MSI vorgeschlagen. Dieses setzt sich aus zwei mononukleotiden und drei dinukleotiden Markern zusammen (Boland et al., 1998). In einer späteren Evaluierung erkannte man Limitationen dieses ursprünglichen Panels an, da besonders die dinukleotiden Marker verglichen mit den mononukleotiden Markern eine geringere Sensitivität und Spezifität in der Testung von MMR-Defekten aufwiesen (Deschoolmeester et al., 2008; K. M. Murphy et al., 2006; Umar et al., 2004). In der Literatur gibt es Hinweise, dass dinukleotide Marker nur in 59-69 % (D5S346), 77-81 % (D17S250) und in 85-89 % (D2S123) eine MSI bei einem MSI-H Tumor anzeigen können (Loukola et al., 2001; Sutter et al., 1999). Neuere Studien deuten darauf hin, dass ein Panel aus fünf mononukleotiden Markern besser geeignet sein könnte, um MSI-H Tumoren zu testen, auch weil dabei ein Vergleich mit Normalgewebe nicht unbedingt nötig ist (Buhard et al., 2004; K. M. Murphy et al., 2006; Suraweera et al., 2002; Umar et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kollektiv aus seltenen Ovarialkarzinomen mithilfe der vom National Cancer Institut vorgeschlagenen Marker analysiert. Die meisten Untersuchungen zur MSI wurden bisher am kolorektalen Karzinom durchgeführt. MSI Untersuchungen von weiteren Tumortypen, wie beispielsweise dem Ovarialkarzinom, sind aktuell noch selten in der Literatur zu finden. Es ist deshalb nicht eindeutig geklärt, inwieweit diese Marker ebenfalls für das Ovarialkarzinom gelten. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig (Deshpande et al., 2020; Umar et al., 2004).

4.4 Limitationen der Arbeit und Auswertung

Da es sich um zwei seltene Subtypen des Ovarialkarzinoms handelt, konnte nur eine kleine Fallzahl akquiriert und analysiert werden. In einigen Fällen war es nicht möglich, ausreichend gesundes Gewebe für die Untersuchungen zu gewinnen. Insgesamt wurden 24 Wiederholungen durchgeführt. Nicht selten traten Artefakte in den Analysen

auf. Schließlich musste in vier Fällen die Extraktion genetischen Materials aus neuen Leerschnitten mit Wiederholung aller nachfolgenden Schritte erfolgen. Auffällig bei diesen Fällen war, dass häufig ein einzelner Marker nicht auswertbar war (da Genmaterial in der Amplifikation fehlte). Bei einem Großteil der Wiederholungen waren es besonders dinukleotide Marker, die uneindeutig erschienen. Eine ähnliche Problematik wurde bereits in der Literatur beschrieben. In der Menschheit sind dinukleotide Marker sehr polymorph vorhanden, was eine zusätzliche Untersuchung von Keimzell-DNA nötig macht; ein zeit- und kostenintensives Verfahren, welches zusätzliche Fehlerquellen mit sich bringt (Perucho, 1999; Suraweera et al., 2002). Die Deutung dieser polymorphen Varianten ist oftmals schwierig und aufwändig, was zu Wiederholungsläufen und falschen MSI-H Diagnosen führen kann (Loukola et al., 2001; Suraweera et al., 2002). Auch können bei den dinukleotiden Markern fälschlicherweise Banden als PCR-Artefakte gebildet werden (besonders bei in Formalin fixiertem Gewebe), mit der Folge einer Missinterpretation als eine MSI (Perucho, 1999). Diese Schwierigkeiten in der Auswertung konnten in der aktuellen Arbeit nachvollzogen werden, weshalb eine Umstellung des Marker-Panels auf mononukleotide Marker weiter diskutiert werden sollte:

Goel et al. schlägt aus eigenen Untersuchungen die Verwendung eines Panels aus fünf mononukleotiden Markern (mithilfe einer Pentaplex PCR) vor. Dies sei dem Standard des National Cancer Instituts überlegen, da sie kostengünstiger, schneller in der Anwendung, effizient sowie akkurat seien. Auch werden die Analysen ohne die Notwendigkeit von Normalgewebe durchgeführt, was einen deutlichen Vorteil darstellt (Goel et al., 2010). Dadurch könnten Wiederholungen bei unklaren Ergebnissen und Artefakten reduziert werden. In einer weiteren Studie erreichte die Verwendung von sechs mononukleotiden Markern im Vergleich zum Bethesda Panel auch eine genauere Differenzierung von MSI-L Fällen (in MSS oder MSI-H) (He et al., 2023). Andere Untersuchungen vergleichen weitere MSI Marker und Panels an verschiedenen Tumorentitäten (MSI V.1.2 Panel und ein Panel aus langen mononukleotiden Markern (LMRs)); u.a. am kolorektalen Karzinom, Endometrium-Karzinom und Prostata-Karzinom. Hierbei vermag die Verwendung von zusätzlichen mononukleotiden Markern (LMRs) sinnvoll sein, da diese auch relativ kurze Verschiebungen im Rahmen einer MSI besser detektieren können (Lin et al., 2022). Mittlerweile wird das Promega Panel empfohlen, welches aus fünf mononukleotiden Markern (NR-21, NR-24, MONO-27, BAT-25 and BAT-26) und zwei pentanukleotid Markern besteht (Zhao et al., 2022). Jedoch fehlen ähnliche Studien zur Evaluation anderer Marker-Panels am Ovarialkarzinom.

Laut aktuellem Kenntnisstand sind bei einem Großteil der Tumoren BAT25 und BAT26 ausreichend, um MSI-H Tumoren ausfindig zu machen, da sie quasi monomorph

in der Bevölkerung vorhanden sind (Suraweera et al., 2002). Das bedeutet, dass sie auch ohne Vergleichs-DNA in Form von Normalgewebe analysiert werden können. Bei der Verwendung von mononukleotiden Markern oder fokussiert BAT25 und BAT26 hätte eine größere Anzahl an Tumoren aus dem ursprünglichen Kollektiv in die aktuelle Untersuchung einbezogen werden können. Auch in der Diagnostik würde eine solche Testung von BAT25 und BAT26 zusätzlich zur IHC eine mögliche erste Orientierung bieten, ob weitere molekulargenetische Untersuchungen nötig sind. In einer Untersuchung von verschiedenen Tumorentitäten konnten 99,5 % der MSI-Tumoren anhand BAT26 detektiert werden (ohne den zusätzlichen Bedarf von Normalgewebe) und 99 % der Tumoren mit MSI bei einem Kollektiv aus kolorektalen Karzinomen (Hoang et al., 1997; Zhou et al., 1998). Dennoch verbleiben auch hier Einschränkungen, da Polymorphismen ebenfalls bei den monomorphen Markern vorkommen können. Für BAT26 finden sich diese bei einem sehr kleinen Anteil der kaukasischen Bevölkerung (0,08 %), jedoch deutlich häufiger bei Afroamerikanern (7,7 %) (Samowitz et al., 1999). Bei dem Verdacht auf bestehende Polymorphismen sollten deshalb weitere Marker herangezogen werden (Suraweera et al., 2002).

4.5 Vergleich IHC und molekulargenetische Analyse

In einer Vorarbeit wurde bereits das Ursprungskollektiv aller Ovarialkarzinome, inklusiver der verwendeten endometrioiden und klarzelligen Tumoren, auf Immunhistochemie (IHC) untersucht.

In der aktuellen Arbeit wurde die molekulargenetische Analyse verwendet, da es Vermutungen gibt, dass die IHC weniger sensitiv in der Detektion einer MSI ist, welches sich auch in der Literatur wiederfindet. Jensen et al. analysierte in einem Kollektiv 52 Fälle mittels Immunhistochemie und molekulargenetisch anhand der fünf molekularen MSI-Marker. Ein MMR-Defekt wurde in 10 % der Fälle molekulargenetisch detektiert, am häufigsten beim klarzelligen Karzinom (3/18, 17 %) gefolgt vom endometrioiden Karzinom (1/8, 13 %). Durch die IHC wurde in einem Fall ein molekulargenetisch nachgewiesener MSI-L Tumor nicht erkannt (Jensen et al., 2008). In einer weiteren Studie konnten 21 % der klarzelligen Karzinome mit dem Referenzpanel an MSI-Markern positiv getestet werden. Die IHC verfehlte dabei vier der sechs MSI-H Tumoren (67,7 %). Für die fünf Referenzmarker des NCI ließ sich hierbei eine Sensitivität von 83,3 % bei BAT25, 100 % bei BAT26, 83,3 % bei D5S346, 50 % bei D2S123 und D17S250 errechnen (Cai et al., 2004).

Immunhistochemie sollte, im Vergleich zu einer molekularen MSI-Testung, wahrscheinlich nicht als alleiniges Testinstrument für die MSI-Analyse verwendet werden, da etwa 5 % der MSI-Tumoren durch IHC nicht erkannt werden (K. M. Murphy et al., 2006). Wahlberg et al. beschreibt in seiner Studie, dass fünf Fälle mit einem Keimzelldefekt in *MSH2* oder *MLH1* durch Immunhistochemie nicht erkannt wurden, weshalb er die IHC als primäre Methode zur Analyse von MMR-Defekten als nicht ausreichend ansieht. Die molekulare Analyse mit dem empfohlenen NCI-Panel zeigte dagegen in derselben Studie eine Sensitivität von 100 % in der Identifizierung von MSI-H Fällen (Wahlberg et al., 2002). Beide Analysen, die IHC und die molekulare MSI-Analyse, beinhalten technische sowie interpretatorische Schwierigkeiten. Die IHC ist dabei besonders praktisch in der Durchführung, kosteneffektiv und nützlich in der Identifizierung von Mutationssequenzen und somit weit verbreitet. Dagegen gilt die molekulare MSI-Analyse allgemein als exakter und sensitiver in der Identifizierung einer MSI (Jensen et al., 2008; Wahlberg et al., 2002). Beispielsweise könnten mononukleotide Marker (mindestens BAT25 und BAT26) in Kombination mit der IHC das Screening auf ein Lynch-Syndrom gemeinsam erweitern und effektivieren.

4.6 MSI am Ovarialkarzinom in der Literatur

Vergleichbare Studien zur MSI-Testung in endometrioiden und klarzelligen Karzinomen sind in der Literatur seltener vertreten mit teils diskrepanten Ergebnissen. In einem Kollektiv aus 48 endometrioiden und acht klarzelligen Karzinomen zeigte sich eine MSI in sieben der 56 Fälle (12,5 %). Dabei konnten bei allen MSI positiven Tumoren Auffälligkeiten in den MSI-Markern BAT26, D2S123, D5S346 und D17S250 dargestellt werden. BAT 25 war in sechs der sieben Fälle alteriert. Daraus lässt sich folgern, dass eine MSI im Allgemeinen selten bei Ovarialkarzinomen zu finden ist und fast ausschließlich auf endometrioide und klarzellige Tumoren begrenzt ist (Gras et al., 2001).

In einem anderen Kollektiv zeigte sich ein positiver MSI-Befund in drei endometrioiden und einem klarzelligen Subtyp, insgesamt in 13 % (Catasus et al., 2004). Liu et al. untersuchte bei 74 endometrioiden Karzinomen in 20 % eine MSI-H und in 12 % eine MSI-L (Liu et al., 2004). In einer weiteren Studie mit 42 klarzelligen Tumoren fanden sich sechs MSI-H (14.3%), und drei MSI-L (7.2%) Befunde (Cai et al., 2004).

Zusammenfassend ist die Datenlage zur genauen Abschätzung der Häufigkeit einer MSI bei den endometrioiden und klarzelligen Ovarialtumoren noch nicht eindeutig. In der aktuellen Untersuchung konnte MSI bei 9 % der endometrioiden Tumoren detektiert werden (zwei MSI pos. von 22 Fällen). In 4,5 % trat eine MSI-L und in 4,5 % eine MSI-H auf, insgesamt somit deutlich seltener als in den zuvor genannten Ergebnissen aus der

Literatur. Die klarzelligen Tumoren zeigten sich alle stabil. Diese Diskrepanzen könnten durch die beschriebenen Limitationen und Schwierigkeiten in der MSI-Analyse bedingt sein. Die Durchführung einer IHC in Kombination mit der molekulargenetischen Testung vermag die Aussagekraft der Analysen in Hinblick auf die MSI Diagnostik erhöhen.

4.7 RAS und BRAF Testung

Die Familie der *RAS*-Onkogene setzt sich aus den Genen *KRAS*, *NRAS* und *HRAS* zusammen, die für die jeweiligen RAS-Proteine NRAS, HRAS sowie KRAS4A und 4B codieren (Barbacid, 1987; Li et al., 2018; Shimizu et al., 1983). *RAS*-Mutationen können in bis zu 30 % der Tumoren gefunden werden und bieten mögliche Ansatzstellen für spezifische Therapien von Karzinomen (Agianian et al., 2018). Zudem können diese als frühe Mutationen bezeichnet werden, da sie häufig als eine der ersten Schritte in der Tumorentstehung auftreten, was ein besonderes Interesse in Hinblick auf mögliche Prävention mit sich bringt. Nahezu ein Viertel der untersuchten Tumoren zeigen *KRAS*-Mutationen, dagegen ist *NRAS* bei etwa 8 % und *HRAS* bei nur 3 % mutiert. Häufig zeigen Adenokarzinome *KRAS*-Mutationen (Li et al., 2018; Prior et al., 2012).

Über verschiedene Signaltransduktionskaskaden ist *RAS* maßgeblich an wichtigen Mechanismen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose in der Zelle beteiligt (McCubrey et al., 2007; Vakiani et al., 2011). *BRAF* ist ein Effektor von *RAS* und stellt eine zyttoplasmatische Serin-Threonin-Kinase dar (Chong et al., 2001; Vakiani et al., 2011). In einer Vielzahl von menschlichen Tumoren sind *BRAF*-Mutationen zu finden, in 89 % führen sie zu Veränderungen im Aktivierungssegment des Exon 15, welche über 90 % an Position 600 vorkommen (V600E). Dabei kommt es zu einem Austausch von Thymin zu Adenin an Nukleotidposition 1796, worauf die neue Aminosäure Glutaminsäure gebildet wird (Mayr et al., 2006; Mercer et al., 2003). *BRAF*- und *KRAS*-Mutationen werden nur selten nebeneinander in einem Tumor vorgefunden. Das unterstützt die Hypothese, dass *BRAF*- und *KRAS*-Mutationen beide den *RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK* Signalweg von unterschiedlichen Ausgangspositionen aus aktivieren können (Mayr et al., 2006).

4.8 BRAF und RAS Ergebnisse

Die aufgetretenen fünf Mutationen (22,7 %) betrafen stets *KRAS* Exon 2. Davon waren alle Tumoren von endometrioider Histologie. Im gesamten Kollektiv fand sich keine Mutation für *BRAF* und *NRAS* sowie für *KRAS* das Exon 3 und 4 betreffend.

Verglichen mit Angaben in der Literatur waren dabei die Diskrepanzen der Resultate aus verschiedenen Analysen bezüglich der Testung von *BRAF* und *RAS* auffällig,

weshalb eine schlussendliche Einschätzung der Mutationsrate schwierig erscheint. Zu *BRAF*-Mutationen bei endometrioiden Karzinomen reichten die Ergebnisse von 0-24 %, (s. Aufzählungen unten) verglichen mit einer Mutationsrate von 0 % in der aktuellen Analyse. Für *KRAS* ergaben sich ebenfalls unterschiedliche Angaben von 0-33 % (s. Aufzählungen unten). Hiermit sind die aktuellen Ergebnisse mit einer Mutationsrate von 22,7 % am ehesten konsistent. In den meisten Studien wurde jedoch nur eine kleine Fallzahl an Tumoren untersucht. Da diese Tumoren selten sind, ist es sinnvoll, Untersuchungen mit einem größeren Kollektiv anzuschließen. Dies könnte eine mögliche Ursache sein für die noch uneindeutige Studienlage.

In einer Untersuchung von Singer et al. wiesen beispielsweise 24 % der endometrioiden Karzinome (n=21) eine *BRAF*-Mutation auf, aber keiner der 20 klarzelligen Tumoren. Es wurde je eine *KRAS*-Mutation (etwa 5 %) bei einem endometrioiden und einem klarzelligen Tumor detektiert (Singer et al., 2003). Wenn Mutationen vorhanden waren, dann traten *BRAF* und *KRAS* nie gleichzeitig auf. Interessanterweise konnte in keinem der 72 high-grade serösen Ovarialkarzinome eine Mutation von *BRAF* und *KRAS* analysiert werden. Mutationen beschränkten sich vor allem auf die low-grade serösen Karzinome, was wiederum die Theorie unterstützt, dass sich die Tumorgenese von low-grade und high-grade Karzinomen unterscheidet (Singer et al., 2003). Von 13 endometrioiden Karzinomen und vier klarzelligen Karzinomen wiesen bei Mayr et al. in der *BRAF* Testung jeweils ein endometrioider- und ein klarzelliger Tumor eine Mutation auf, was einer Mutationsrate von 9,1 % und 25 % entspricht. Diese Ergebnisse konnten in der hier durchgeführten Analyse nicht reproduziert werden. Bezüglich *KRAS* wurde keine Mutation für die beiden Subtypen detektiert (Mayr et al., 2006), was wiederum abweicht von den obigen Ergebnissen. McConechy et al. berichten dagegen von 33 % *KRAS*-Mutationen in endometrioiden Ovarialkarzinomen (McConechy et al., 2014). Laut Shih et al. besitzen 4-5 % der endometrioiden Karzinome eine *KRAS*-Mutation, bei klarzelligen Karzinomen werden 5-16 % angegeben (Shih et al., 2004). Dagegen fand Sieben et al. in seinem Kollektiv aus 20 endometrioiden und 14 klarzelligen Karzinomen weder eine Mutation von *BRAF* noch von *KRAS* (Sieben et al., 2004). Letztendlich ist unklar, wie es zu solchen Abweichungen in den Ergebnissen der *BRAF* und *RAS*-Testung bei endometrioiden und klarzelligen Karzinomen kommen mag.

4.9 Therapieansätze des Ovarialkarzinoms

Auch wenn in den letzten Jahren immer mehr Erkenntnisse über die molekularen Hintergründe dieser Erkrankung gesammelt werden konnten, besteht im Unterschied zum Vorgehen bei Brustkrebs nur eingeschränkt Wissen über Mechanismen oder Ansatzpunkte,

die auch therapeutisch genutzt werden könnten. Momentan wird jeder Subtyp des Ovarialkarzinoms in Abhängigkeit vom Tumorstadium anfangs gleich therapiert, unabhängig von einer molekular-pathologischen Differenzierung. Eine Ausnahme bilden jedoch Tumoren mit nachgewiesener *BRCA*-Mutation, Rezidive eines high-grade Ovarialkarzinoms und fortgeschrittene Ovarialkarzinome, da diese zusätzlich gezielt mit PARP-Inhibitoren behandelt werden können (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Aktuell erfolgen diese gezielten Therapien mit PARP-Inhibitoren oder Bevacizumab nur als Ergänzung zu einer bestehenden Standardtherapie, um dessen Effektivität zu steigern (Ravindran et al., 2021). Nur wenige Studien untersuchten spezifische Therapien an den verschiedenen Subtypen des Ovarialkarzinoms. Es bestehen Hinweise, dass die low-grade und muzinösen Ovarialkarzinome schlechter auf eine Chemotherapie ansprechen (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020; Shih et al., 2004). Abweichungen vom therapeutischen Standardprotokoll können in der jetzigen Situation aber noch nicht empfohlen werden (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Ebenfalls besteht für MSI positive Ovarialkarzinome keine individuelle Therapieoption. Hierfür sind weitere Erkenntnisse über MSI-Tumoren und deren molekularpathologische Hintergründe von großer Bedeutung. Eine MSI kann jedoch bereits jetzt bei Kenntnis in Bezug auf die Diagnostik von Relevanz sein. Sollte eine Keimbahnmutation vorliegen kann für direkte Angehörige einer Patientin eine genetische Testung und intensiviertere Screeningverfahren diskutiert werden.

Laut Lheureux et al. finden sich häufige Mutationen des endometrioiden Tumors ebenfalls beim klarzelligem Tumor. Dazu gehören *PIK3CA* (40 %), *ARID1A* (30 %), *KRAS* (30 %), *PTEN* (16 %), und *PPP2R1A* (16 %) (Lheureux et al., 2019). Hiermit kann die Verwandtschaft der beiden Subtypen dargestellt werden, ein möglicherweise wichtiger Ansatzpunkt für zukünftige Therapieversuche. Bezüglich *BRAF* und *RAS* ergeben sich bereits Hinweise auf mögliche Ansatzstellen, die therapeutisch genutzt werden können. Hierzu zählen die MEK-Inhibitoren (Trametinib, Selumetinib, Pimasertib, Binimetinib) die in einen Teil des aktivierten MAP-Kinase Signalwegs eingreifen können. Aktuell laufen Untersuchungen zu einigen dieser Therapien in klinischen Studien (Ravindran et al., 2021). Ein Fallbericht aus dem Jahr 2019 berichtet von einer 56-jährigen Frau mit fortgeschrittenem Low-grade serösen Ovarialkarzinom (LGSC) im Stadium IIIC. Trotz maximaler operativer Therapie und mehreren Zyklen Chemotherapie zeigte sich eine Tumorprogression. Durch den Nachweis einer *NRAS* Mutation im Tumor wurde ein Therapieversuch mittels MEK-Inhibitor Trametinib begonnen, der noch nicht offiziell zur Behandlung von Ovarialkarzinomen zugelassen ist, jedoch bei anderen *NRAS* positiven Tumoren bereits positive Effekte gezeigt hatte. Nach einer Behandlung von einigen

Wochen konnte eine Normalisierung des Tumormarkers CA-125 erreicht werden, zudem fiel ein signifikanter Rückgang der Tumormasse von 2,3 cm auf 1,1 cm auf. Die initialen Nebenwirkungen, in diesem Fall dermatologischer Art, konnten durch eine Dosisanpassung reduziert werden (Champer et al., 2019; Gadducci et al., 2020). Trametinib könnte eine neue Therapieoption für Patientinnen mit Rezidiv eines low-grade serösen Ovarialkarzinoms darstellen (Gershenson et al., 2022). Lee et al. folgert aus ersten Studien, dass eine Aktivierung von MEK die Ansprechrate für MEK-Inhibitoren erhöhen könnte. Jedoch gibt es Beobachtungen, dass eine MEK Aktivierung auch unabhängig einer vorhandener *BRAF*- und *KRAS*-Mutation auftreten kann (J. M. Lee et al., 2019). Somit ist weiter unklar, welche Patienten am ehesten von einer Therapie mit MEK-Inhibitoren profitieren würden.

Voraussetzung für eine gezielte Tumorthherapie ist ein umfangreiches Verständnis der Pathogenese und die Identifikation von spezifischen Treibermutationen, die sich in der Gesamtheit an Ovarialkarzinomen nach heutigem Wissen voneinander unterscheiden. Klar ist, dass es sich bei der Erkrankung der Ovarialkarzinome inklusive Eileiter- und Peritonealkarzinome um eine heterogene Gruppe von Tumoren handelt, die sich in Ursprung, Pathogenese und Prognose voneinander unterscheiden.

4.10 Fazit und Ausblick

In der aktuellen Arbeit konnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden, die in der Erforschung der seltenen endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinome von Bedeutung sein könnten. Eine MSI auf dem Boden eines Lynch-Syndroms mag wahrscheinlich bei sporadisch untersuchten endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinomen eine untergeordnete Rolle spielen. Dennoch ist es sinnvoll, erkrankten Frauen mit diesem speziellen Tumortyp eine MSI-Testung anzubieten (Vierkoetter et al., 2014). Die aktuell verwendeten Kriterien zur Diagnose eines Lynch-Syndroms sind eventuell nicht mehr umfassend genug, da ein Großteil der Ovarialkarzinome mit einer MSI dadurch nicht erkannt werden kann (Pal et al., 2012). Zudem sollte eine Evaluation der bisher verwendeten MSI-Marker erfolgen, gegebenenfalls mit Spezifizierung und Testung dieser auf die Diagnostik von Ovarialkarzinomen (Deshpande et al., 2020). Mithilfe unterschiedlicher molekularer Ergebnisse könnte es gelingen, für diese Gruppe der seltenen Subtypen des Ovarialkarzinoms spezifische Treibermutation zu finden, die nicht nur diagnostisch, sondern auch therapeutisch genutzt werden könnten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ovarialkarzinom stellt auch heute noch in Zeiten der fortgeschrittenen individuellen Therapien einen klinisch schwer zu behandelnden Tumor und weiterhin eine häufige Krebstodesursache der Frau dar. Meistens wird dabei der Tumor in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, in dem eine Metastasierung bereits stattgefunden hat (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019)). Eine verlässliche Screeningmethode besteht bis heute nicht (Henderson et al., 2018; Jacobs et al., 2016). Die therapeutischen Optionen beim Ovarialkarzinom sind dabei begrenzt. In einer radikalen Operation mit Entnahme von Uterus, Adnexen, Tuben sowie Lymphknoten, Peritoneum und Appendix wird eine makroskopisch komplette Resektion angestrebt. Im Anschluss ergibt sich meist eine platinhaltige Chemotherapie für alle aggressiven Ovarialkarzinome (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Im Unterschied zum Vorgehen bei Brustkrebs besteht hier relativ wenig Wissen über molekulare Hintergründe der Erkrankung, die auch therapeutisch genutzt werden könnten. Momentan werden die unterschiedlichen Subtypen des Ovarialkarzinoms in Abhängigkeit vom Tumorstadium noch weitgehend gleich therapiert. Ausnahme machen Tumoren mit *BRCA*-Mutation, Rezidive nach Ansprechen auf eine platinhaltige Therapie und fortgeschrittene Ovarialkarzinome, da diese zusätzlich mit PARP-Inhibitoren behandelt werden können (S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2020). Andere individuelle Therapieansätze werden noch nicht routinemäßig durchgeführt.

Das Ovarialkarzinom wird histologisch in mehrere Subtypen mit verschiedenen Häufigkeiten unterteilt: high-grade serös, low-grade serös, muzinös, endometrioid und klarzellig, seltener sind die malignen Brenntumoren. In der aktuellen Arbeit wurden die endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinome molekulargenetisch auf eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) sowie auf eine *BRAF*- und *RAS*-Mutation untersucht. Ziel der Arbeit war es, mögliche Hinweise für die weitere Erforschung und das Verständnis dieser seltenen Tumoren zu liefern.

Betroffene mit einem meist erblich bedingten Lynch-Syndrom erkranken häufig frühzeitig an bestimmten Tumoren, vor allem an Darmkrebs. Daneben besteht bei Frauen nahezu ein gleich großes Risiko für die Entwicklung eines Endometrium-Karzinoms sowie ein vermehrtes Auftreten von Ovarialkarzinomen (Schmeler et al., 2008). Ursächlich für das Lynch-Syndrom ist ein Defekt in dem körpereigenen Reparatursystem (MMR-System) der Zellen, welches im gesunden Zustand Mutationen bei der Zellteilung erkennt und diese reparieren kann. Als Folge resultiert eine Mikrosatelliteninstabilität im genetischen Material. MSI ist definiert als eine Längenänderung von Mikrosatelliten in sich wiederholenden Gensequenzen. Folglich können diese neuen Allellängen im Vergleich

zum gesunden Gewebe in der Analyse genutzt werden, um eine MSI zu detektieren (Boland et al., 1998; K. M. Murphy et al., 2006). Für die Analyse einer MSI auf molekulargenetischer Ebene wurden die fünf bekannten MSI-Marker, das Bethesda Panel, verwendet. In der Literatur gibt es Hinweise, dass besonders die endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinome mit einer MSI und somit dem Lynch-Syndrom assoziiert sind (Helder-Woolderink et al., 2016; Ketabi et al., 2011; Leskela et al., 2020; M. A. Murphy et al., 2011; Pal et al., 2008; Vierkoetter et al., 2014). Diese Theorie sollte an einem eigenen Kollektiv überprüft werden, um damit die Bedeutung und Häufigkeit eines defekten MMR-Systems bei zwei Subtypen des Ovarialkarzinoms einschätzen zu können. Zudem sollte in einem zweiten experimentellen Ansatz der Anteil der *BRAF*- und *RAS*-Mutationen in den endometrioiden und klarzelligen Karzinomen eingeschätzt werden.

Aus einem bestehenden Kollektiv von Ovarialkarzinomen des Pathologischen Instituts (n=300), welches alle erstdiagnostizierten Ovarialkarzinomen zwischen 2003 und 2007 umfasst, wurden insgesamt 31 endometrioiden und vier klarzellige Ovarialkarzinom-Tumorblöcke für die Analysen im Labor zusammengestellt. Es reduzierte sich die Zahl auf 22 endometrioiden und drei klarzellige Fälle, da für die MSI-Analysen neben Tumorgewebe auch Normalgewebe benötigt wurde, welches bei einigen Fällen nicht zu gewinnen war.

Ein Fall des Kollektivs konnte als MSI low-grade (ein Marker von fünf getesteten Markern instabil) und ein anderer als MSI high-grade (mind. 2 Marker instabil) klassifiziert werden. Insgesamt fielen 20 der endometrioiden Ovarialkarzinome und alle drei klarzelligen Ovarialkarzinome mikrosatellitenstabil aus. Bei der anschließenden *RAS*-Testung zeigten sich für *KRAS* Exon 2 fünf Fälle mit nachgewiesener Mutation, alle traten bei endometrioiden Tumoren auf (5/22- 22,7 %). Die *BRAF*- und *NRAS*-Analyse ergab für das gesamte Kollektiv keinen Mutationsnachweis.

In Zukunft wird es im Bereich der Ovarialkarzinome noch zu molekulargenetischen Erkenntnissen kommen müssen, um spezifische, individuelle Therapien anbieten zu können. In der aktuellen Arbeit wurde gezeigt, dass eine MSI wahrscheinlich bei den sporadischen endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinomen eine untergeordnete Rolle spielen mag. Bezüglich der Diagnostik ist die Immunhistochemie insgesamt weit verbreitet, da sie schnell und preiswert durchführbar ist. Die molekulargenetische MSI Testung mithilfe des seit 1997 vorgestellten Bethesda Panels ist im Vergleich ein zeitaufwändiges und kostenintensives Verfahren, welches zu Artefakten neigt. Eine Umstellung auf modernere Panels, die z. B. vorrangig mononukleotide Marker beinhaltet, sollte deshalb evaluiert und am Ovarialkarzinom getestet werden.

6 LITERATUR

- Aarnio, M., R. Sankila, et al. (1999). Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer*, 81(2), 214-218.
- Agianian, B., & E. Gavathiotis. (2018). Current Insights of BRAF Inhibitors in Cancer. *J Med Chem*, 61(14), 5775-5793.
- Allemani, C., T. Matsuda, et al. (2018). Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*, 391(10125), 1023-1075.
- Alsop, K., S. Fereday, 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. *J Clin Oncol*, 30(21), 2654-2663.
- Anglesio, M. S., & P. J. Yong. (2017). Endometriosis-associated Ovarian Cancers. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 60(4), 711-727.
- Balschun, K., J. Haag, et al. (2011). KRAS, NRAS, PIK3CA exon 20, and BRAF genotypes in synchronous and metachronous primary colorectal cancers diagnostic and therapeutic implications. *J Mol Diagn*, 13(4), 436-445.
- Bankhead, C. R., S. T. Kehoe, et al. (2005). Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG*, 112(7), 857-865.
- Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem*, 56, 779-827.
- Barbieri, R. L., & S. Missmer. (2002). Endometriosis and infertility: a cause-effect relationship? *Ann N Y Acad Sci*, 955, 23-33; discussion 34-26, 396-406.
- Barrow, E., L. Robinson, et al. (2009). Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. *Clin Genet*, 75(2), 141-149.
- Beral, V., R. Doll, et al. (2008). Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls, Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. *Lancet*, 371(9609), 303-314.
- Bergmann, J. F., M. Beaugrand, et al. (1986). CA 125 (ovarian tumour-associated antigen) in ascitic liver diseases. *Clin Chim Acta*, 155(2), 163-165.

- Boguski, M. S., & F. McCormick. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, 366(6456), 643-654.
- Boland, C. R., S. N. Thibodeau, et al. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, 58(22), 5248-5257.
- Bonadona, V., B. Bonaiti, et al. (2011). Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA*, 305(22), 2304-2310.
- Boyd, J. (1998). Molecular genetics of hereditary ovarian cancer. *Oncology (Williston Park)*, 12(3), 399-406; discussion 409-310, 413.
- Buhard, O., N. Suraweera, et al. (2004). Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers*, 20(4-5), 251-257.
- Bulun, S. E., Y. Wan, et al. (2019). Epithelial Mutations in Endometriosis: Link to Ovarian Cancer. *Endocrinology*, 160(3), 626-638.
- Burger, R. A., M. F. Brady, et al. (2011). Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med*, 365(26), 2473-2483.
- Buttmann-Schweiger, N., & K. Kraywinkel. (2019). Epidemiologie von Eierstockkrebs in Deutschland. *Der Onkologe*, 25(2), 92-98.
- Buys, S. S., E. Partridge, et al. (2011). Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 305(22), 2295-2303.
- Cai, K. Q., C. Albarracin, et al. (2004). Microsatellite instability and alteration of the expression of hMLH1 and hMSH2 in ovarian clear cell carcinoma. *Hum Pathol*, 35(5), 552-559.
- Champer, M., D. Miller, et al. (2019). Response to trametinib in recurrent low-grade serous ovarian cancer with NRAS mutation: A case report. *Gynecol Oncol Rep*, 28, 26-28.
- Chong, H., J. Lee, et al. (2001). Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J*, 20(14), 3716-3727.
- Chui, M. H., C. B. Gilks, et al. (2013). Identifying Lynch syndrome in patients with ovarian carcinoma: the significance of tumor subtype. *Adv Anat Pathol*, 20(6), 378-386.
- COSMIC. (2020, August 27). Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. Retrieved from <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

-
- Cramer, D. W., & S. A. Missmer. (2002). The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, 955, 11-22; discussion 34-16, 396-406.
- Crane, E. K., & J. Brown. (2018). Early stage mucinous ovarian cancer: A review. *Gynecol Oncol*, 149(3), 598-604.
- Czogalla, B., E. Deuster, et al. (2020). Cytoplasmic VDR expression as an independent risk factor for ovarian cancer. *Histochem Cell Biol*.
- Dankner, M., A. A. N. Rose, et al. (2018). Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene*, 37(24), 3183-3199.
- De' Angelis, G. L., L. Bottarelli, et al. (2018). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*, 89(9-S), 97-101.
- De Leo, A., D. Santini, et al. (2021). What Is New on Ovarian Carcinoma: Integrated Morphologic and Molecular Analysis Following the New 2020 World Health Organization Classification of Female Genital Tumors. *Diagnostics (Basel)*, 11(4).
- Debniak, T., T. Gromowski, et al. (2015). Management of ovarian and endometrial cancers in women belonging to HNPCC carrier families: review of the literature and results of cancer risk assessment in Polish HNPCC families. *Hered Cancer Clin Pract*, 13(1), 3.
- Deschoolmeester, V., M. Baay, et al. (2008). Detection of microsatellite instability in colorectal cancer using an alternative multiplex assay of quasi-monomorphic mononucleotide markers. *J Mol Diagn*, 10(2), 154-159.
- Deshpande, M., P. A. Romanski, et al. (2020). Gynecological Cancers Caused by Deficient Mismatch Repair and Microsatellite Instability. *Cancers (Basel)*, 12(11).
- Dietmaier, W. (2010). [Microsatellite instability. A new predictive marker (?)]. *Pathologe*, 31 Suppl 2, 268-273.
- Dietmaier, W., S. Wallinger, et al. (1997). Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res*, 57(21), 4749-4756.
- du Bois, A., H. J. Luck, et al. (2003). A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95(17), 1320-1329.
- du Bois, A., A. Reuss, 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), 1234-1244.
- Ebell, M. H., M. B. Culp, et al. (2016). A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *Am J Prev Med*, 50(3), 384-394.
- Emuss, V., M. Garnett, et al. (2005). Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Res*, 65(21), 9719-9726.
- Farland, L. V., J. Prescott, et al. (2019). Endometriosis and Risk of Adverse Pregnancy Outcomes. *Obstet Gynecol*, 134(3), 527-536.
- Finch, A. P., J. Lubinski, et al. (2014). Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *J Clin Oncol*, 32(15), 1547-1553.
- Fukui, K. (2010). DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J Nucleic Acids*, 2010.
- Gadducci, A., & S. Cosio. (2020). Therapeutic Approach to Low-Grade Serous Ovarian Carcinoma: State of Art and Perspectives of Clinical Research. *Cancers (Basel)*, 12(5).
- Gershenson, D. M., A. Miller, et al. (2022). Trametinib versus standard of care in patients with recurrent low-grade serous ovarian cancer (GOG 281/LOGS): an international, randomised, open-label, multicentre, phase 2/3 trial. *Lancet*, 399(10324), 541-553.
- Giudice, L. C., & L. C. Kao. (2004). Endometriosis. *Lancet*, 364(9447), 1789-1799.
- Giusti, A., M. Baird, et al. (1986). Application of deoxyribonucleic acid (DNA) polymorphisms to the analysis of DNA recovered from sperm. *J Forensic Sci*, 31(2), 409-417.
- Goel, A., T. Nagasaka, et al. (2010). An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One*, 5(2), e9393.
- Gras, E., L. Catasus, et al. (2001). Microsatellite instability, MLH-1 promoter hypermethylation, and frameshift mutations at coding mononucleotide repeat microsatellites in ovarian tumors. *Cancer*, 92(11), 2829-2836.
- Grindedal, E. M., L. Renkonen-Sinisalo, et al. (2010). Survival in women with MMR mutations and ovarian cancer: a multicentre study in Lynch syndrome kindreds. *J Med Genet*, 47(2), 99-102.
- Guo, H., J. Guo, et al. (2018). The role of vitamin D in ovarian cancer: epidemiology, molecular mechanism and prevention. *J Ovarian Res*, 11(1), 71.

- Gymrek, M. (2017). A genomic view of short tandem repeats. *Curr Opin Genet Dev*, 44, 9-16.
- Haigis, K. M. (2017). KRAS Alleles: The Devil Is in the Detail. *Trends Cancer*, 3(10), 686-697.
- Halila, H., U. H. Stenman, et al. (1986). Ovarian cancer antigen CA 125 levels in pelvic inflammatory disease and pregnancy. *Cancer*, 57(7), 1327-1329.
- Hall, J. M., M. K. Lee, et al. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250(4988), 1684-1689.
- Hancock, J. M. (1995). The contribution of slippage-like processes to genome evolution. *J Mol Evol*, 41(6), 1038-1047.
- Hancock, J. M. (1996). Simple sequences and the expanding genome. *Bioessays*, 18(5), 421-425.
- Harter, P., J. Hauke, et al. (2017). Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1). *PLoS One*, 12(10), e0186043.
- He, L., J. Yang, et al. (2023). A comparison of performance of 6-monomucleotide site panel and NCI panel for microsatellite instability detection in patients with colorectal adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*, 244, 154390.
- Helder-Woolderink, J. M., E. A. Blok, et al. (2016). Ovarian cancer in Lynch syndrome; a systematic review. *Eur J Cancer*, 55, 65-73.
- Henderson, J. T., E. M. Webber, et al. (2018). Screening for Ovarian Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*, 319(6), 595-606.
- Hoang, J. M., P. H. Cottu, et al. (1997). BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res*, 57(2), 300-303.
- Huang, X., X. Wang, et al. (2018). Association between dietary fiber intake and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of observational studies. *J Int Med Res*, 46(10), 3995-4005.
- Jacobs, I. J., U. Menon, et al. (2016). Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*, 387(10022), 945-956.
- Javadi, S., D. M. Ganeshan, et al. (2016). Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging. *AJR Am J Roentgenol*, 206(6), 1351-1360.

- Jayson, G. C., E. C. Kohn, et al. (2014). Ovarian cancer. *Lancet*, 384(9951), 1376-1388.
- Jensen, K. C., M. R. Mariappan, et al. (2008). Microsatellite instability and mismatch repair protein defects in ovarian epithelial neoplasms in patients 50 years of age and younger. *Am J Surg Pathol*, 32(7), 1029-1037.
- Jung, A. (2015). Extended KRAS and NRAS Mutation Profiling by Pyrosequencing(R). *Methods Mol Biol*, 1315, 49-61.
- Kanter, E., M. Baird, et al. (1986). Analysis of restriction fragment length polymorphisms in deoxyribonucleic acid (DNA) recovered from dried bloodstains. *J Forensic Sci*, 31(2), 403-408.
- Kelemen, L. E., E. V. Bandera, et al. (2013). Recent alcohol consumption and risk of incident ovarian carcinoma: a pooled analysis of 5,342 cases and 10,358 controls from the Ovarian Cancer Association Consortium. *BMC Cancer*, 13, 28.
- Ketabi, Z., K. Bartuma, et al. (2011). Ovarian cancer linked to Lynch syndrome typically presents as early-onset, non-serous epithelial tumors. *Gynecol Oncol*, 121(3), 462-465.
- Kim, B., Y. Park, et al. (2019). Diagnostic performance of CA 125, HE4, and risk of Ovarian Malignancy Algorithm for ovarian cancer. *J Clin Lab Anal*, 33(1), e22624.
- Kindelberger, D. W., Y. Lee, et al. (2007). Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol*, 31(2), 161-169.
- Kolodner, R. D., J. D. Tytell, et al. (1999). Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res*, 59(20), 5068-5074.
- Kuchenbaecker, K. B., J. L. Hopper, et al. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, 317(23), 2402-2416.
- Kurman, R. J., & M. Shih Ie. (2016). Seromucinous Tumors of the Ovary. What's in a Name? *Int J Gynecol Pathol*, 35(1), 78-81.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921.
- Lee, A. W., S. Rosenzweig, et al. (2020). Expanding our understanding of ovarian cancer risk: the role of incomplete pregnancies. *J Natl Cancer Inst*.
- Lee, J. M., L. Minasian, et al. (2019). New strategies in ovarian cancer treatment. *Cancer*, 125 Suppl 24, 4623-4629.

- Leskela, S., I. Romero, et al. (2020). Mismatch Repair Deficiency in Ovarian Carcinoma: Frequency, Causes, and Consequences. *Am J Surg Pathol*, 44(5), 649-656.
- Levinson, G., & G. A. Gutman. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol*, 4(3), 203-221.
- Lheureux, S., M. Braunstein, et al. (2019). Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA Cancer J Clin*, 69(4), 280-304.
- Li, S., A. Balmain, et al. (2018). A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nat Rev Cancer*, 18(12), 767-777.
- Lin, J. H., S. Chen, et al. (2022). Validation of Long Mononucleotide Repeat Markers for Detection of Microsatellite Instability. *J Mol Diagn*, 24(2), 144-157.
- Liu, J., C. T. Albarracin, et al. (2004). Microsatellite instability and expression of hMLH1 and hMSH2 proteins in ovarian endometrioid cancer. *Mod Pathol*, 17(1), 75-80.
- Loukola, A., K. Eklin, et al. (2001). Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res*, 61(11), 4545-4549.
- Lu, K. H., & R. R. Broaddus. (2005). Gynecologic Cancers in Lynch Syndrome/HNPCC. *Fam Cancer*, 4(3), 249-254.
- Lynch, H. T., M. J. Casey, et al. (1998). Genetics and ovarian carcinoma. *Semin Oncol*, 25(3), 265-280.
- Lynch, H. T., M. J. Casey, et al. (2009). Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol*, 3(2), 97-137.
- Lynch, H. T., C. L. Snyder, et al. (2015). Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer*, 15(3), 181-194.
- Marchetti, C., F. De Felice, et al. (2014). Risk-reducing salpingo-oophorectomy: a meta-analysis on impact on ovarian cancer risk and all cause mortality in BRCA 1 and BRCA 2 mutation carriers. *BMC Womens Health*, 14, 150.
- Matias-Guiu, X., & C. J. R. Stewart. (2018). Endometriosis-associated ovarian neoplasia. *Pathology*, 50(2), 190-204.
- Mayr, D., A. Hirschmann, et al. (2006). KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol Oncol*, 103(3), 883-887.

- McConechy, M. K., J. Ding, et al. (2014). Ovarian and endometrial endometrioid carcinomas have distinct CTNNB1 and PTEN mutation profiles. *Mod Pathol*, 27(1), 128-134.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1773(8), 1263-1284.
- McGuire, W. P., W. J. Hoskins, et al. (1996). Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med*, 334(1), 1-6.
- Meinhold-Heerlein, I., C. Fotopoulou, et al. (2016). The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet*, 293(4), 695-700.
- Mercer, K. E., & C. A. Pritchard. (2003). Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta*, 1653(1), 25-40.
- Miyaki, M., M. Konishi, et al. (1997). Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*, 17(3), 271-272.
- Modrich, P. (2006). Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem*, 281(41), 30305-30309.
- Moller, P. (2020). The Prospective Lynch Syndrome Database reports enable evidence-based personal precision health care. *Hered Cancer Clin Pract*, 18, 6.
- Moore, K., N. Colombo, et al. (2018). Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med*, 379(26), 2495-2505.
- Morice, P., A. Leary, et al. (2019). Mucinous Ovarian Carcinoma. Reply. *N Engl J Med*, 381(1), e3.
- Murphy, K. M., S. Zhang, et al. (2006). Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *J Mol Diagn*, 8(3), 305-311.
- Murphy, M. A., & N. Wentzensen. (2011). Frequency of mismatch repair deficiency in ovarian cancer: a systematic review This article is a US Government work and, as such, is in the public domain of the United States of America. *Int J Cancer*, 129(8), 1914-1922.
- Myung, S. K., W. Ju, et al. (2009). Soy intake and risk of endocrine-related gynaecological cancer: a meta-analysis. *BJOG*, 116(13), 1697-1705.

- Ness, R. B. (2003). Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology. *Am J Obstet Gynecol*, 189(1), 280-294.
- Nicolaides, N. C., N. Papadopoulos, et al. (1994). Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*, 371(6492), 75-80.
- Ogino, S., T. Kawasaki, et al. (2005). Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn*, 7(3), 413-421.
- Pal, T., M. R. Akbari, et al. (2012). Frequency of mutations in mismatch repair genes in a population-based study of women with ovarian cancer. *Br J Cancer*, 107(10), 1783-1790.
- Pal, T., J. Permeth-Wey, et al. (2005). BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer*, 104(12), 2807-2816.
- Pal, T., J. Permeth-Wey, et al. (2008). Systematic review and meta-analysis of ovarian cancers: estimation of microsatellite-high frequency and characterization of mismatch repair deficient tumor histology. *Clin Cancer Res*, 14(21), 6847-6854.
- Perren, T. J., A. M. Swart, et al. (2011). A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 365(26), 2484-2496.
- Prior, I. A., P. D. Lewis, et al. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*, 72(10), 2457-2467.
- QIAGEN. (2010, October). QIAGEN® Multiplex PCR Handbook.
- QIAGEN. (2012, December). PyroMark Q24 Vacuum Workstation Quick-Start Guide.
- QIAGEN. (2014, December). QIAamp® DNA Micro Handbook. 3. Edition. Retrieved from <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=085e6418-1ec0-45f2-89eb-62705f86f963&lang=en>
- Ramus, S. J., H. Song, et al. (2015). Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 107(11).
- Ravindran, F., & B. Choudhary. Ovarian Cancer: Molecular Classification and Targeted Therapy. In *Ovarian Cancer-Updates in Tumour Biology and Therapeutics*. IntechOpen2021
- Rebbeck, T. R., N. D. Kauff, et al. (2009). Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 101(2), 80-87.
- Rhyu, M. S. (1996). Molecular mechanisms underlying hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 88(5), 240-251.

- Richards, R. I., & G. R. Sutherland. (1992). Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. *Cell*, 70(5), 709-712.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019). *Krebs in Deutschland für 2015/2016* (Vol. 12. Ausgabe).
- Rouger, P., & V. Van Huffel. (2003). [Paternity testing and civil affairs]. *J Soc Biol*, 197(4), 341-349.
- S3-Leitlinie maligner Ovarialtumoren, D., Therapie, Prognose. (2021). Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 5.0, 2021, AWMF-Registernummer: 032/035OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>, [abgerufen am: 09.02.2022].
- S3-Leitlinie maligner Ovarialtumore, D., Therapie und Nachsorge (2020). Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) Langversion 4.0, 2020, AWMF-Registernummer: 032/035OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>, [abgerufen am: 10.06.2020]
- Samowitz, W. S., M. L. Slattery, et al. (1999). BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *Am J Pathol*, 154(6), 1637-1641.
- Sampson, J. (1922). Ovarian hematomas of endometrial type (perforating hemorrhagic cysts of the ovary) and implantation adenomas of endometrial type. *Boston Med and Surgical Journal* pp. 445-473.
- Santarpia, L., S. M. Lippman, et al. (2012). Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 16(1), 103-119.
- Schlotterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365-371.
- Schmeler, K. M., & K. H. Lu. (2008). Gynecologic cancers associated with Lynch syndrome/HNPCC. *Clin Transl Oncol*, 10(6), 313-317.
- Shih, I. M., & R. J. Kurman. (2004). Ovarian tumorigenesis - A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *American Journal of Pathology*, 164(5), 1511-1518.
- Shimizu, K., M. Goldfarb, et al. (1983). Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(8), 2112-2116.

- Sia, E. A., S. Jinks-Robertson, et al. (1997). Genetic control of microsatellite stability. *Mutat Res*, 383(1), 61-70.
- Sieben, N. L., P. Macropoulos, et al. (2004). In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol*, 202(3), 336-340.
- Singer, G., R. Oldt, 3rd, et al. (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 95(6), 484-486.
- Song, H., E. Dicks, et al. (2015). Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population. *J Clin Oncol*, 33(26), 2901-2907.
- Stewart, C., C. Ralyea, et al. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs*, 35(2), 151-156.
- Sun, J. X., A. Helgason, et al. (2012). A direct characterization of human mutation based on microsatellites. *Nat Genet*, 44(10), 1161-1165.
- Suraweera, N., A. Duval, et al. (2002). Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*, 123(6), 1804-1811.
- Sutter, C., J. Gebert, et al. (1999). Molecular screening of potential HNPCC patients using a multiplex microsatellite PCR system. *Mol Cell Probes*, 13(2), 157-165.
- Toth, G., Z. Gaspari, et al. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res*, 10(7), 967-981.
- Trimbos, J. B., I. Vergote, et al. (2003). Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst*, 95(2), 113-125.
- Trudel, D., D. P. Labbe, et al. (2012). Green tea for ovarian cancer prevention and treatment: a systematic review of the in vitro, in vivo and epidemiological studies. *Gynecol Oncol*, 126(3), 491-498.
- Tworoger, S. S., & T. Huang. (2016). Obesity and Ovarian Cancer. *Recent Results Cancer Res*, 208, 155-176.
- Umar, A., C. R. Boland, et al. (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*, 96(4), 261-268.

- Umar, A., C. International Workshop on Diagnostic Guidelines for Hereditary Non-Polyposis Colorectal, et al. (2006). Lynch syndrome (HNPCC) and microsatellite instability analysis guidelines. *Cancer Biomark*, 2(1-2), 1-4.
- Vakiani, E., & D. B. Solit. (2011). KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*, 223(2), 219-229.
- Vierkoetter, K. R., A. R. Ayabe, et al. (2014). Lynch Syndrome in patients with clear cell and endometrioid cancers of the ovary. *Gynecol Oncol*, 135(1), 81-84.
- Viguera, E., D. Canceill, et al. (2001). Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J*, 20(10), 2587-2595.
- Wahlberg, S. S., J. Schmeits, et al. (2002). Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res*, 62(12), 3485-3492.
- Watson, P., R. Butzow, et al. (2001). The clinical features of ovarian cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecol Oncol*, 82(2), 223-228.
- Watson, P., & H. T. Lynch. (1994). The tumor spectrum in HNPCC. *Anticancer Res*, 14(4B), 1635-1639.
- Webb, P. M., & S. J. Jordan. (2017). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 41, 3-14.
- Wheeler, J. M. (1989). Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *J Reprod Med*, 34(1), 41-46.
- Wooster, R., G. Bignell, et al. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378(6559), 789-792.
- World Cancer Research Fund International. (2015, September 15). Why taller people are at greater risk of cancer. Retrieved from <https://www.wcrf.org/int/blog/articles/2015/09/why-taller-people-are-greater-risk-cancer>
- Yoshida, R. (2020). Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast Cancer*.
- Zhang, D., B. Bai, et al. (2016). Is aspirin use associated with a decreased risk of ovarian cancer? A systematic review and meta-analysis of observational studies with dose-response analysis. *Gynecol Oncol*, 142(2), 368-377.

- Zhang, S., R. Royer, et al. (2011). Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 121(2), 353-357.
- Zhao, S., L. Chen, et al. (2022). Endometrial cancer in Lynch syndrome. *Int J Cancer*, 150(1), 7-17.
- Zhou, X. P., J. M. Hoang, et al. (1998). Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer*, 21(2), 101-107.

7 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während des Studiums und der Vollendung meiner Promotionsarbeit begleitet und unterstützt haben:

Mein herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Doris Mayr, für die Überlassung und hervorragende Betreuung dieses interessanten und spannenden Projekts. Die professionelle und gleichzeitig freundschaftliche Zusammenarbeit hat mir stets viel Freude bereitet und in mir ein besonderes Interesse und Verständnis für die Pathologie geweckt. Für die Initiierung und Ermöglichung danke ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner und Herrn Prof. Dr. med. Frederick Klauschen, Direktoren des Pathologischen Instituts der Universität München, diese Arbeit in ihrem Institut durchführen zu können. Außerdem möchte ich mich bei meiner Betreuerin, Frau PD Dr. med. Elisa Schmoeckel bedanken für ihre Motivation, Betreuung und die damit verbundene exzellente Unterstützung bei der Umsetzung. Die Intensität und Qualität der Betreuung im Pathologischen Institut empfand ich immer als hervorragend und außergewöhnlich. Darüber hinaus hat mir die wissenschaftliche Arbeit im Labor viel Spaß bereitet.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich den medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentinnen im Bereich der molekularen Pathologie aussprechen. Die vielen Stunden in der Pathologie sowie der freundschaftliche Umgang im Team untereinander werden mir immer in Erinnerung bleiben. Frau Nicole Perera danke ich vor allem für ihre exzellente und einzigartige Betreuung während der gesamten Zeit im Labor, sowie ihre freundschaftliche Unterstützung in allen Bereichen der Arbeit. Durch ihre systematische Einarbeitung in die Thematik konnte ich die Techniken der Laboranalysen schnell und sicher erlernen. Ihre Zeit war nie zu kurz für jegliche Fragen, auch bei fortgeschrittener Tageszeit. Frau Sabine Jung danke ich ebenfalls für ihre professionelle Unterstützung im Bereich der *BRAF*- und *RAS*-Analyse, sowie für ihre zusätzlich investierte Zeit bei Fragen und Hilfestellungen zu meiner Arbeit. Ebenso möchte ich mich bei Frau Jutta Hügel-Tegge und Frau Gabi Charell bedanken, sowie Frau Dr. med. Sibylle Liebmann und Frau Dr. rer. nat. Lisa Bohlmann für ihre Hilfestellung bei sämtlichen molekularpathologischen Fragen. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung danke ich für die Möglichkeit, meine wissenschaftliche Arbeit in seinem Labor durchführen zu können.

Von Herzen danke ich meinem Mann Jonas, der mich stets motiviert hat, mein Projekt zu verfolgen sowie abzuschließen und mir dabei mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein größter und herzlichster Dank gilt meinen Eltern, Angelika und Prof. Dr. med. Bernd H. Markus. Die bedingungslose Unterstützung während des Studiums und darüber hinaus gab mir stets Mut und machte diese Arbeit erst möglich. Die eigenen

Erfahrungen meines Vaters im Bereich der Immunpathologie in Amerika inspirierten mich, eine solche experimentelle Doktorarbeit im Bereich der Pathologie überhaupt in Betracht zu ziehen. Außerdem möchte ich meinem Bruder Alexander danken, der mir wie meine Eltern über die gesamte Zeit zur Seite stand.

Zuletzt bedanke ich mich noch bei meiner Großmutter, Frau Elisabeth Lichtenberg, für ihren Zuspruch sowie bei meinem früh verstorbenen Großvater, Herrn Dr. med. Bernd Markus, der vor etwa 60 Jahren ebenfalls im Pathologischen Institut in München als Chirurg geforscht hatte. Meinem Großvater Herrn Franz-Josef Kraus danke ich für seine weisen Worte und Unterstützung während des gesamten Studiums. Auch meiner langjährigen Freundin Isabelle danke ich für ihr offenes Ohr und die Durchsicht dieser Arbeit.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Schnabel, Isabelle Beatrice Elisabeth

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Molekulargenetische Untersuchungen an seltenen Subtypen des Ovarialkarzinoms

Mikrosatellitentestung sowie BRAF- und RAS-Analysen an endometrioiden und klarzelligem Ovarialkarzinomen

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.

Mainz, 18.05.2023

Ort, Datum

Isabelle Beatrice Elisabeth Schnabel

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand