

**Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. T. Kirchner**

**KRAS/BRAF-Mutationsanalysen und die immunhistologische
Expression von p53 und p16:
Eine vergleichende Untersuchung an 25 Borderlinetumoren
des Ovars und zugehörigen peritonealen
Implantaten**

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

vorgelegt von

Katinka Grasse

Aus Neumarkt i.d.Opf.

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Priv. Doz. Dr. Doris Mayr

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Miriam Lenhard
Priv. Doz. Dr. Christian Brinkschmidt

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ovarialtumoren.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Peritoneale Implantate	3
1.1.3	Histogenese und Ätiologie der epithelial-stromalen Ovarialtumoren..	3
1.2	Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung	5
1.3	Klinik von ovariellen Borderlinetumoren	8
1.3.1	Symptome.....	8
1.3.2	Diagnostik und Prognosefaktoren.....	8
1.3.3	Therapie.....	9
1.4	Die Tumorsuppressorgene p53 und p16	10
1.4.1	p53.....	10
1.4.2	p16.....	11
1.5	Molekulare Genetik.....	13
1.5.1	KRAS und BRAF.....	13
2	Fragestellung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Patientenkollektiv.....	17
3.2	Untersuchungsmaterial	18
3.3	Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien.....	19
3.3.1	Geräte.....	19
3.3.2	Verbrauchsmaterialien.....	19
3.3.3	Chemikalien	20
3.4	Immunhistochemische Untersuchung.....	21
3.4.1	p53 Immunhistochemie	21
3.4.2	p16 Immunhistochemie	21
3.4.3	Auswertung	21
3.5	Mikrodissektion.....	21
3.5.1	Entparaffinierung	21
3.5.2	Gewinnung der Gewebeproben	21
3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
3.6.1	Vorarbeit: DNA-Extraktion	22

3.6.2	PCR	23
3.6.3	PCR-Ansatz für KRAS Mutationsanalysen	23
3.6.4	PCR-Ansatz für BRAF Mutationsanalysen.....	24
3.7	Pyrosequenzierung	24
3.7.1	Ablauf der Vorbereitung zur Pyrosequenzierung.....	24
3.7.2	Pyrosequenzierungs-Reaktion.....	26
3.7.3	Verwendete Sequenzierungsprimer für KRAS Mutationsanalysen....	26
3.7.4	Verwendeter Sequenzierungsprimer für BRAF Mutationsanalysen...	27
3.7.5	Auswertung	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Immunhistologie	28
4.1.1	Auswertbarkeit der immunhistochemischen Untersuchungen.....	28
4.1.2	Ergebnisse der p53-Expression.....	28
4.1.3	Ergebnisse der p16-Expression.....	29
4.1.4	Übersichtstabelle der immunhistologischen Ergebnisse	31
4.2	KRAS- und BRAF-Mutationsanalysen	32
4.2.1	Auswertbarkeit der KRAS- und BRAF-Mutationsanalysen.....	32
4.2.2	Ergebnisse der KRAS-Mutationsanalysen	32
4.2.3	Ergebnisse der BRAF-Mutationsanalysen.....	35
4.3	Korrelation von KRAS- und BRAF-Mutationen und der Immunhistologie	37
5	Diskussion	40
6	Zusammenfassung.....	47
7	Literaturverzeichnis.....	50
8	Lebenslauf	58
9	Danksagung.....	59

1 Einleitung

1.1 Ovarialtumoren

1.1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist die am häufigsten zum Tode führende Tumorentität der weiblichen Geschlechtsorgane und mit anderen Tumorerkrankungen des Ovars die fünft-häufigste Krebserkrankung der Frau in Deutschland, nach Brust-, Darm-, Lungen- und Gebärmutterkörperkrebs (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2007; Remmele 1997). Jährlich erkranken ca. 9.960 Frauen an Ovarialtumoren, die 4,9% der bösartigen Neubildungen der Frau ausmachen (Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2010). Im Jahr 2010 starben allein in der Bundesrepublik Deutschland 5.599 Patientinnen an bösartigen Neubildungen des Ovars (Statistisches Bundesamt 2010). Aufgrund nicht ausreichender Screeningverfahren und des zunächst symptomarmen Verlaufs der Erkrankung, werden bösartige Ovarialtumoren oftmals in einem bereits fortgeschrittenem Tumorstadium diagnostiziert. Bei etwa 30% der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom ist die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung noch auf das kleine Becken begrenzt (FIGO-Stadium I und II; s. Tab. 1). In ca. 75% der Fälle wird ein Ovarialkarzinom erst im FIGO-Stadium III oder IV diagnostiziert, wenn es meist nur noch palliativ behandelbar ist. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patientinnen mit Ovarialkarzinom liegt derzeit bei 47%, was eine leichte Verbesserung gegenüber den vergangenen Jahren darstellt. Der wichtigste prognostische Faktor ist das FIGO-Stadium der Patientin zum Diagnosezeitpunkt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt derzeit bei 68 Jahren. (Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2010).

Die Ovarialtumoren lassen sich in drei histopathologische Tumorkategorien einteilen, welche sich in Ätiologie, Biologie und Klinik unterscheiden: (1) Oberflächenepithel-Stroma Tumoren, (2) Keimstrang-Stroma Tumoren und (3) Keimzelltumoren. Die epithelial-stromalen Oberflächentumoren (1) machen ca. zwei Drittel der Ovarialtumoren überhaupt und 90% der bösartigen Ovarialneoplasien in der westlichen Welt aus (Prat 2009).

Auf Borderlinetumoren, welche histomorphologisch zwischen den eindeutig benignen und malignen Tumorformen stehen, entfallen 15-20% der Oberflächenepithel-Stromatumoren (Faluyi 2010; Remmele 1997). Die Patientinnen sind zum Zeitpunkt der Diagnose im Durchschnitt 35-45 Jahre alt. Ovarialtumoren vom Borderline-Typ werden meist in einem frühen Tumorstadium festgestellt, 68-70% der Patientinnen werden im FIGO-Stadium I diagnostiziert, im Stadium IV sind es weniger als 1% (Hart 2005, Prat 2009). In ca. einem Drittel der Fälle tritt ein Borderlinetumor in beiden Ovarien auf. Im Vergleich zu den Karzinomen, besteht für ovarielle Borderlinetumoren in jedem Stadium eine wesentlich bessere Prognose. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt im FIGO-Stadium I bis IIIB zwischen 88 und 95% und Stadium IIIC und IV bei 60% (Prat 2009).

Die folgenden Abbildungen zeigen Ovarialtumoren vom Borderlinetyp.

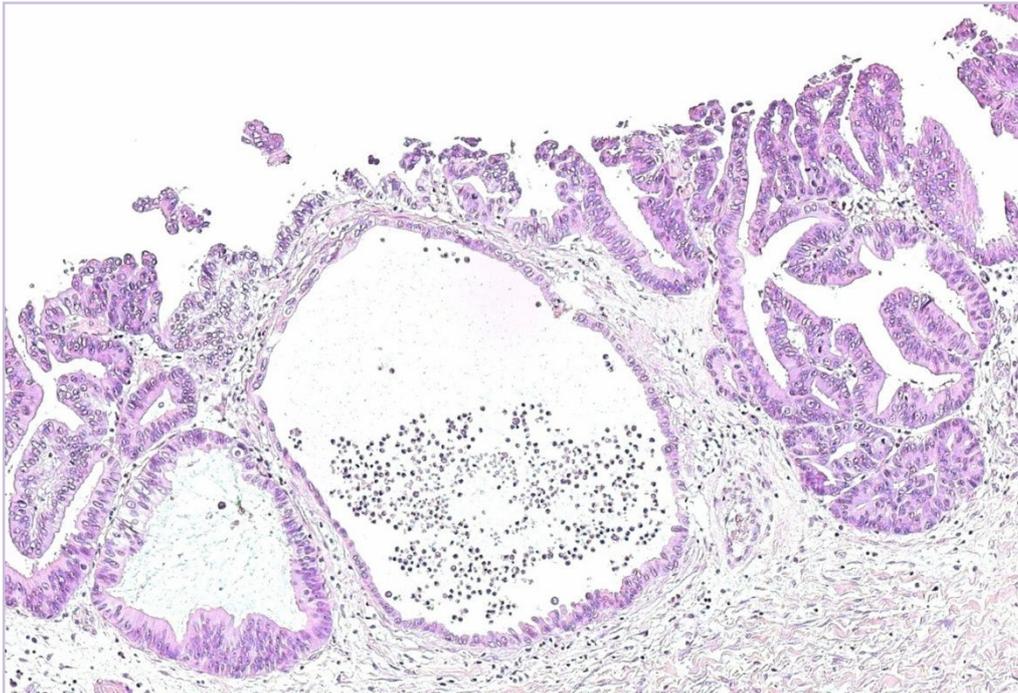


Abb. 1.1: Zystisch wachsender ovarieller Borderlinetumor vom serösen Typ

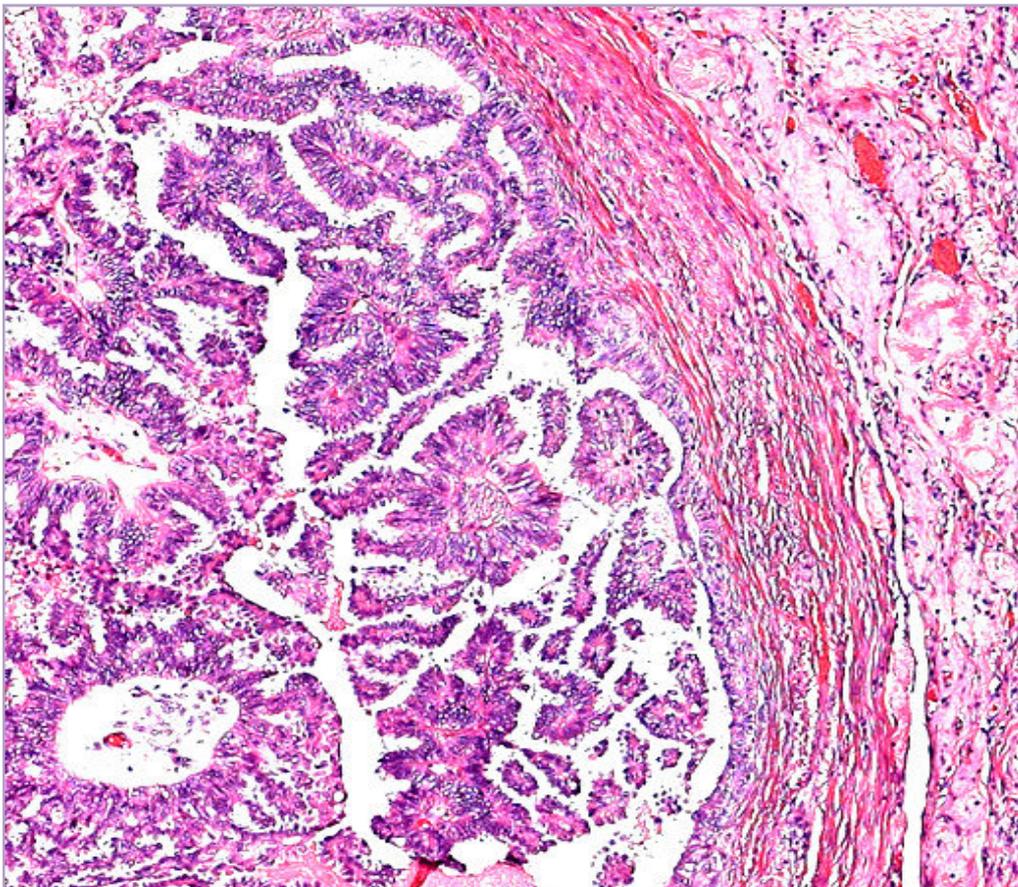
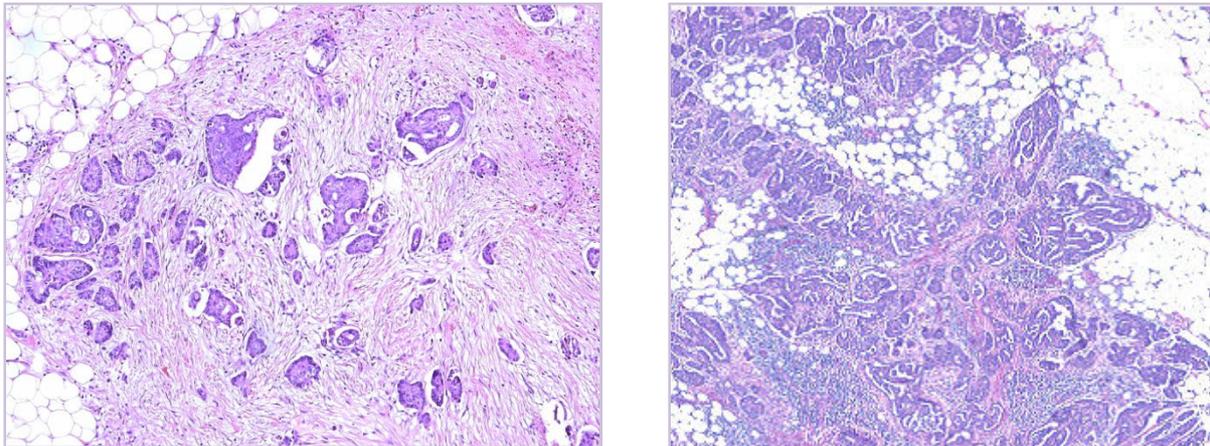


Abb. 1.2: Ovarieller Borderlinetumor vom serösen Typ, auf die Ovarinnenseite beschränkt wachsend

1.1.2 Peritoneale Implantate

Bei 30-40% der Patientinnen mit ovariellen Borderlinetumoren kommen zudem extraovarielle Läsionen vor. Diese Läsionen werden als extraovarielle Implantate bezeichnet, bei welchen man histologisch zwischen invasiven und non-invasiven unterscheidet (Bsp. Siehe Abb. 1.3). Sie sind in den meisten Fällen nur mikroskopisch oder als kleine makroskopische Läsionen ($\leq 1-2\text{cm}$) zu erkennen.

Abb. 1.3: Beispiele für invasive und Non-invasive Implantate des Peritoneums



a) Non-invasive peritoneale Implantate

b) Invasive peritoneale Implantate

In 83-96% der Fälle sind diese Implantate non-invasiv und finden sich typischerweise im Peritoneum (Hart 2005; Prat 2009). In ca. 12% der Fälle zeigen sich invasive Implantate, welche sich bevorzugt in Gewebe wie z.B. dem Omentum manifestieren (Tavassoli, Devilee 2003; Hart 2005; Prat 2009). Die histologische Einteilung der Implantate in invasiv oder non-invasiv ist wichtig und von prognostischer Bedeutung. Zudem wirken sich vorhandene Implantate auf das Tumorstadium und die Therapie der Patientinnen aus. In vorangegangenen Studien wurden bei Patientinnen mit peritonealen Implantaten vermehrt Rezidive und eine geringere 5-Jahres-Überlebensrate beobachtet. Dieser Umstand fiel gehäuft im Zusammenhang mit invasiven peritonealen Implantaten auf (Bell DA 1988; Kennedy 1996; Gershenson 1998; Seidman 2000; Bell KA 2001; Prat 2002 Longacre 2005, Prat 2009). Doch auch im Falle von non-invasiven Implantaten sind Rezidive in Form von Karzinomen oder erneuten Borderlinetumoren möglich (Gershenson 1998; Longacre 2005; Silva 2006). Allerdings ist der Entstehungsweg dieser extraovariellen Läsionen ungeklärt, und zu molekularbiologischen Untersuchungen von Borderlinetumoren und zugehörigen extraovariellen Implantaten der gleichen Patientin ist die Datenlage bislang gering.

1.1.3 Histogenese und Ätiologie der epithelial-stromalen Ovarialtumoren

Die epithelial-stromalen Ovarialtumoren leiten sich vom Oberflächenepithel des Ovars, einem Teil des sog. sekundären Müller-Systems ab. Tumoren dieser Kategorie machen etwa zwei Drittel aller Ovarialtumoren aus und entstehen entweder direkt vom Deckepithel, oder viel häufiger aus Inklusionszysten welche invaginiertes Oberflächenepithel enthalten (s.Abb.1.4).

Histogenetisch stammen die Epithelien des Ovars, der Tube, des Uterus und der Zervix vom Zölomepithel des paramesonephrischen Ganges ab. Es wird angenommen, dass die zytologischen Differenzierungen (serös, muzinös, endometrioid, klarzellig oder transitionalzellig) der epithelial-stromalen Ovarialtumoren durch Mutationen des pluripotenten Zölomepithels (sog. Transmutabilität) zustande kommen (Remmele 1997). Der seröse, muzinöse und endometriode Differenzierungstyp sind hierbei die drei häufigsten Differenzierungen (Diebold 1998).

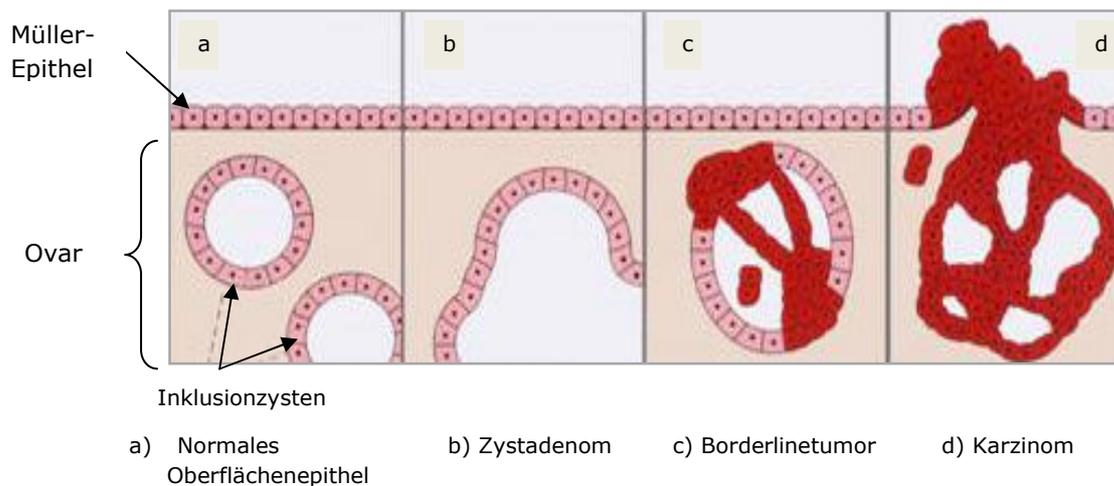


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Entstehung von Ovarialtumoren
Modifiziert nach Riede und Schäfer (Riede 2004)

Die Ätiologie der epithelial-stromalen Ovarialtumoren ist weitgehend unklar. Das Erkrankungsrisiko scheint mit langjährigen hormonellen Einflüssen in Verbindung zu stehen. So wirken sich eine frühe erste Regelblutung und ein spätes Einsetzen der Wechseljahre ungünstig aus. Auch eine Hormonersatztherapie erhöht unabhängig von Art und Dauer das Risiko an einem Ovarialtumor zu erkranken. Offenbar spielt die Anzahl der Ovulationen ebenfalls eine Rolle, da das durch den Eisprung geschädigte ovarielle Deckepithel durch die dazugehörige Wundheilung dem Risiko einer erhöhten Spontanmutationsrate ausgesetzt ist. Eventuell führt dies auch zu Einschlüssen des Deckepithels in das darunter liegende Stroma, den sog. Inklusionszysten, welche wiederum Ausgangspunkt für Tumoren sein können. Dagegen wirken sich ovulationshemmende Faktoren, wie die Einnahme oraler Kontrazeptiva, Schwangerschaft und Stillzeit risikoverringend aus (Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2010; James V. Lacey Jr., 2009).

Ein geringer Anteil der ovariellen Neoplasien, etwa 10% der Ovarialkarzinome, ist genetisch bedingt. Charakteristisch hierfür ist ein gehäuftes Auftreten innerhalb der Familie, meist assoziiert mit erblichem Brust- und Eierstockkrebs und einer nachweisbaren Keimbahnmutation in einem der verantwortlichen Gene, z.B. BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, oder TP53 (Interdisziplinäre S2k-Leitlinie 2007). Bei familiärer Belastung besteht eine zwanzigmal höhere Wahrscheinlichkeit für Verwandte ersten Grades, sprich Töchter oder Schwestern der Erkrankten, selbst

einen Ovarialtumor zu entwickeln (Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2010; Interdisziplinäre S2k-Leitlinie 2007; Tavassoli, Devilee 2003; Remmele 1997).

In den vergangenen Jahren mehrten sich die Aussagen, dass die häufigen serösen und muzinösen Subtypen der Ovarialkarzinome zumindest zu einem Teil aus Borderlinetumoren entstehen. Somit ließe sich, in Analogie z.B. zu Tumoren des Dickdarmes, eine „Adenom-Borderline-Karzinom-Sequenz“ postulieren (Kurman 2010; Vang 2009; Dehari 2007; Shih 2005; Singer 2005; Russel 2004; Ho et al. 2004; Sieben 2004; Gemignani 2003; Singer 2002).

Der Entstehungsweg der extraovariellen Implantate, welche vor allem häufig bei serösen Borderlinetumoren vorkommen, ist unklar. Es wird diskutiert ob diese extraovariellen Läsionen „metastasenartig“ als Implantate des ovariellen Borderlinetumors, oder unabhängig und eigenständig aufgrund multifaktorieller Genese, im Peritoneum entstehen.

Man geht davon aus, dass das extraovarielle Mesothel des Peritoneums das Potential für die Genese von epithelialen Läsionen (z.B. Endosalpingiose) besitzt (Prat 2009; Remmele 1997). So wurde in einigen Studien postuliert, dass die peritonealen Implantate im Zusammenhang mit Borderlinetumoren, eher unabhängige Herde einer primären peritonealen Neoplasie sind als wirkliche Implantate (Lu et al. 1998; Gu et al. 2001; Smith Sehdev 2003).

Andere Studien stützen dagegen die Theorie der Implantation, im Sinne der „metastasenartigen“ Entstehung der Implantate (Sieben 2006; Krishnamurti 2004; Sieben 2003; Alvarez 2001; Moore 2000; Zanotti 1999). Diese basiert auf der Tatsache, dass zwei Drittel der exophytisch wachsenden Borderlinetumoren mit Implantaten assoziiert sind, im Gegensatz zu weniger als 5% bei Borderlinetumoren mit endophytischem Wachstum (Segal 1992).

Ebenso wird aber auch eine Koexistenz der beiden oben genannten Entstehungswege zur Genese der Implantate nicht ausgeschlossen (Diebold 2003).

1.2 Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung

Innerhalb der Ovarialtumoren gibt es mehrere histologische Gruppen. Diese werden nach dem Ursprung der abnorm proliferierenden Zelle in drei große Untergruppen eingeteilt. Die epithelial-stromalen Oberflächentumoren umfassen die serösen, muzinösen, endometrioiden, Klarzell-, Transitionalzell-, squamösen, epithelialen Mischtypen und undifferenzierten Tumoren sowie unklassifizierte Tumoren. Davon grenzt man die Gruppe der Keimstrang-Stroma-Tumoren ab, in welcher sich die Granulosazelltumoren, die Sertolizelltumoren, Keimstrang-Stroma-Tumoren vom Misch- oder unklassifizierten Zelltyp und die Steroidzelltumoren befinden. Die dritte Untergruppe umfasst die Keimzelltumoren.

In der Gruppe der epithelial-stromalen Ovarialtumoren unterscheidet man zudem zwischen eindeutig benignen, eindeutig malignen und borderline Varianten. Besonders aus klinischer Sicht ist diese Unterteilung der Tumoren wichtig, da dies generell für die Prognose von Bedeutung ist.

Borderlinetumoren wurden früher auch als Tumoren mit niedriger maligner Potenz oder LMP (low malignant potential) -Tumoren bezeichnet. Rein histologisch nehmen sie eine Stellung zwischen den gutartigen Zystadenomen und den bösartigen Karzinomen ein (s. Abb. 1.4).

Meist zeigt sich bei Borderlinetumoren eine stärkere epitheliale Proliferation, als dies in benignen Tumoren beobachtet wird. In keinem Fall ist aber eine destruktive Invasion des Stromas oder ein konfluierendes Wachstum nachzuweisen. Trotz der fehlenden Invasivität innerhalb des Ovars sind Borderlinetumoren, v.a. vom serösen Typ, häufig mit peritonealen Implantaten vergesellschaftet (Prat 2009).

Weiterhin unterscheidet man histologisch bei den Implantaten non-invasive und invasive, wobei man erstere in den desmoplastischen und epithelialen Typ subklassifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich non-invasive Implantate untersucht. Peritoneale Implantate können aber ebenso ohne einen ovariellen Primärtumor vorkommen und werden in diesem Fall von der WHO als primärer peritonealer Borderlinetumor, in die Gruppe der epithelialen Tumoren des Peritoneums, klassifiziert (Tavassoli, Devilee 2003).

Da in der vorliegenden Dissertation das Interesse Borderlinetumoren mit zugehörigen peritonealen Implantaten galt und 24 rein seröse und ein serös-muzinöser Borderlinetumor untersucht wurden, folgt hier nur die WHO-Einteilung der serösen und muzinösen epithelial-stromalen Ovarialtumoren:

A) Seröse Tumoren

a) Benigne

- Zystadenom
- Papilläres Zystadenom
- Oberflächenpapillom
- Adenofibrom und Zystadenofibrom

b) Borderlinetumor

- Papillär-zystischer Tumor
- Oberflächlich-papillärer Tumor
- Adenofibrom und Zystadenofibrom

c) Maligne

- Adenokarzinom
- Oberflächlich-papilläres Adenokarzinom
- Adenokarzinofibrom (malignes Adenofibrom)

B) Muzinöse Tumoren

a) Benigne

- Zystadenom
- Adenofibrom und Zystadenofibrom

- b) Borderlinetumor
 - Intestinaler Typ
 - Endozervikaler Typ
- c) Maligne
 - Adenokarzinom
 - Adenokarzinofibrom (malignes Adenofibrom)
- d) Muzinös zystischer Tumor mit Wandknoten
- e) Muzinös zystischer Tumor mit Pseudomyxoma peritonei

Die Stadieneinteilung erfolgt nach dem FIGO-System (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) und nach dem TNM-System der UICC (Union Internationale Contre le Cancer). Die Abkürzung T steht hierbei für Tumor, N für Nodus (Lymphknoten) und M für Metastase. Das TNM-System ist tumor- und lokalisationsbezogen, dies bedeutet, dass z.B. Klassifikationen für Ovarialtumoren und Tumoren des Verdauungstraktes unterschiedlich sind. Die Definitionen der T-, N- und M-Kategorien entsprechen den verschiedenen FIGO-Stadien (s. Tab. 1), wobei erstere auf klinischer und pathologischer Klassifikation und letztere auf chirurgischem Staging basieren.

Die Klassifikation gilt sowohl für epithelial-stromale Ovarialtumoren als auch für Tumoren vom Borderline-Typ (Tavassoli, Devilee 2003).

Tab. 1: Einteilung der Tumorstadien nach dem FIGO- und dem TNM-System (International Union Against Cancer (UICC), 2009)

TNM	FIGO	Kriterien
TX		Primärtumor nicht beurteilbar
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Tumor auf Ovarien begrenzt
T1a	IA	Tumor in einem Ovar; Kapsel intakt; kein Tumor auf Ovaroberfläche; keine malignen Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T1b	IB	Tumor in beiden Ovarien; Kapsel intakt, kein Tumor auf Oberfläche der Ovarien; keine malignen Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T1c	IC	Tumor in einem oder beiden Ovarien; Kapselruptur; Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T2	II	Tumor auf das Becken beschränkt
T2a	IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n); keine malignen Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung

T2b	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe; keine malignen Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T2c	IIC	Ausbreitung im Becken (T2a oder T2b) und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T3 und/oder N1	III	Tumor in einem oder beiden Ovarien; Peritonealmetastasen jenseits des Beckens und/oder regionale Lymphknotenmetastasen
T3a	IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastase(n)
T3b	IIIB	Makroskopische Peritonealmetastase(n) ≤2cm
T3c	IIIC	Peritonealmetastase(n) ≤2cm
und/oder N1		und/oder regionale Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)
NX		Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		Keine regionären Lymphknotenmetastasen
M0		Keine Fernmetastasen

1.3 Klinik von ovariellen Borderlinetumoren

1.3.1 Symptome

Borderlinetumoren des Ovars sind überwiegend symptomarm. In manchen Fällen kommt es durch Torsion oder Ruptur zystischer Läsionen des Tumors zu abdominalen Schmerzen (Prat 2009). Ebenso kann es in Abhängigkeit von der Größe des Tumors zu einer Zunahme des Bauchumfanges ohne Gewichtszunahme kommen. Besonders seröse Borderlinetumoren gingen bei jüngeren Frauen mit einer hohen Unfruchtbarkeitsrate einher (Tavassoli, Devilee 2003).

1.3.2 Diagnostik und Prognosefaktoren

In der Diagnostik von Ovarialtumoren ist die Transvaginalsonographie unter den bildgebenden Verfahren der Goldstandard. Zur Beurteilung der Dignität einer Läsion werden hier morphologische Kriterien wie Zystengröße, Wanddicke, Vorhandensein von Septen und soliden Anteilen herangezogen. Trotz regelmäßiger Vaginalsonographie ist die Wahrscheinlichkeit der Früherkennung gering. Der Tumormarker CA125 ist aufgrund seiner geringen Spezifität ebenfalls nicht zur Früherkennung geeignet, weswegen ein generelles Screening momentan nicht empfohlen wird. Dies bedeutet, dass derzeit ein zuverlässiges Staging nur intraoperativ und die Diagnosesicherung pathohistologisch intraoperativ oder im Anschluss erfolgen kann (Interdisziplinäre S2k-Leitlinie 2007).

Das Vorhandensein von Implantaten wirkt sich auf das Tumorstadium der Patientinnen und auch auf deren Prognose aus. Im Zusammenhang mit invasiven Implantaten wurde in einigen Studien ein ungünstigerer Verlauf beobachtet, als dies bei non-invasiven Implantaten der Fall war (Prat 2009 und 2002; Seidman 1996 und 2000). Die Morphologie der Implantate und deren histologische Klassifikation ist daher der wichtigste prognostische Faktor (Tavassoli, Devilee

2003; Prat 2009). Von prognostischer Bedeutung sind des weiteren Tumorstadium und Tumorrest nach Primäroperation (Interdisziplinäre S2k-Leitlinie 2007).

Keinen Einfluss auf die Prognose hat eine histologisch mikropapilläre Form oder eine Mikroinvasion des Borderlinetumors. Ebenso sind betroffene Lymphknoten nicht von prognostischer Bedeutung (Prat 2009).

1.3.3 Therapie

Es erfolgt stets eine operative Therapie, welche eine Exploration des Abdomens, ein sorgfältiges Staging, die Entfernung aller Tumoranteile und eine Omentektomie umfassen sollte. In Analogie zu den invasiven Karzinomen ist die Laparoskopie nicht als Stagingmethode geeignet, weshalb ein sorgfältiges chirurgisches Staging und Inspektion des Abdomens unbedingt erforderlich ist. Hierbei sollten möglichst zahlreiche peritoneale Biopsien gewonnen werden, da invasive und non-invasive Implantate durchaus gemeinsam vorkommen können. Ziel des operativen Vorgehens ist neben der Tumorentfernung stets die Vermeidung der intraoperativen Tumorzellverschleppung oder einer Ruptur des Tumors.

Bei Patientinnen deren Familienplanung bereits abgeschlossen ist oder kein Kinderwunsch besteht ist die abdominale Hysterektomie mit bilateraler Oophorektomie Therapie der Wahl. Bei jüngeren Frauen mit bestehendem Kinderwunsch kann im Falle eines unilateralen Borderlinetumors das makroskopisch unauffällige kontralaterale Ovar mit Tube und Uterus erhalten bleiben, sofern das sonstige Staging negativ ist. Ist ein beidseitiger zystischer Borderlinetumor vorhanden, ist bei dringendem Kinderwunsch eine uni- oder bilaterale ovarerhaltende Zystektomie nur nach Aufklärung über das erhöhte Rezidivrisiko vertretbar. Nachdem bei einer bereits therapierten Patientin die Familienplanung abgeschlossen ist, kann eine Komplettierungsoperation vorgenommen werden, deren Erfolg jedoch fraglich ist (Prat 2009; Interdisziplinäre S2k-Leitlinie 2007).

Regelmäßige Nachsorge-Untersuchungen sind zwingend erforderlich, beim Rezidiv eines Borderlinetumors ist eine komplette Resektion des Tumors indiziert. Für Patientinnen in einem höheren Tumorstadium wird der Einsatz von adjuvanter postoperativer Strahlen- und Chemotherapie diskutiert. Ein Nutzen zeigte sich bislang nicht. Derzeitiger Behandlungsansatz ist eine postoperative Chemotherapie, bestehend aus Carboplatin und Paclitaxel, jenen Patientinnen zu empfehlen, bei welchen peritoneale Implantate vom invasiven Typ gefunden wurden (Prat 2009).

Jede Patientin wird zusätzlich psychoonkologisch betreut (Interdisziplinäre S2k-Leitlinie 2007).

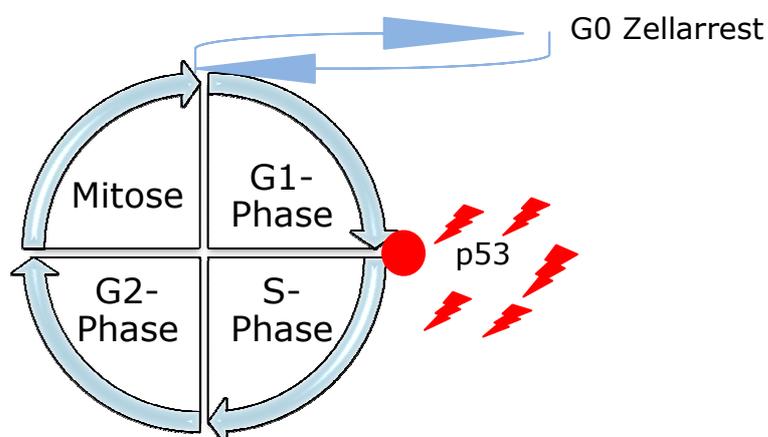
1.4 Die Tumorsuppressorgene p53 und p16

1.4.1 p53

p53 ist ein Tumorsuppressorgen, lokalisiert auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 und kodiert für ein 35 kDa großes kernständiges Protein, welches den Zellzyklus hemmen kann (McCluggage 2009). Der Wirkmechanismus des Proteins p53 und des Retinoblastomproteins Rb, einem Tumorsuppressorprotein, ist besonders gut aufgeklärt und biochemisch eng miteinander verknüpft (Löffler, Petrides 2003). Das Retinoblastomprotein Rb bindet im wenig phosphorylierten Zustand wichtige Transkriptionsfaktoren, die die in der S-Phase des Zellzyklus benötigten Gene aktivieren. In der S-Phase findet die Replikation der DNA statt. Erst durch Phosphorylierung von Rb mittels Cyclin-abhängiger Kinasen (cyclin dependent kinases = CDK) werden die Transkriptionsfaktoren freigesetzt, welche die für die S-Phase wichtigen Gene aktivieren (Löffler, Petrides 2003).

Ist die DNA einer Zelle geschädigt und dadurch bei der Zellteilung das Risiko für eine Mutation erhöht, kann p53 den Übergang von der G₁- in die S-Phase verhindern (s. Skizze 1). Dies geschieht, indem als Antwort auf den DNA-Schaden vermehrt p53 synthetisiert wird, was wiederum eine Konzentrationszunahme einer Reihe weiterer Proteine auslöst. Diese Proteine binden CDKs, wodurch die Phosphorylierung von Rb gehemmt wird. Rb bindet somit weiterhin die wichtigen Transkriptionsfaktoren, weswegen die Zelle nicht von der G₁ in die S-Phase übertreten kann.

Dadurch wird der Zellzyklus angehalten und es kann eine Reparatur der geschädigten DNA erfolgen. Darüber hinaus supprimiert das p53-Protein die Tumor-Entstehung auch über die Initiation der Apoptose, wenn ein irreversibler Schaden der DNA besteht. Im Falle einer Mutation von p53 kann dies nicht geschehen. Somit überwacht p53 die Integrität des Genoms und verhindert die Zellteilung durch Arretierung des Zellzyklus in der G₁-Phase, oder das Einleiten der Apoptose wenn die Reparatur der DNA nicht möglich ist.



Skizze 1

Modifiziert nach Löffler, Petrides - Biochemie & Pathobiochemie, 2003

p53 zählt zu den bei der menschlichen Krebsentstehung am häufigsten betroffenen Genen (Chang 1995). Bei Karzinomen des Ovars ist eine Mutation

des Tumor-Suppressor-Gens p53 ebenfalls eines der häufigsten genetischen Ereignisse und kommt etwa in 50 bis 80% der Fälle vor, insbesondere bei niedrig differenzierten Tumoren vom serösen Typ (Vang 2009). Die Mutation führt zu einer Konformationsänderung und damit zu einer Stabilisierung des Proteins wodurch es mittels immunhistochemischer Färbung sichtbar gemacht werden kann (McCluggage 2009; Mayr 2000). In den meisten Fällen zeigt sich beim Vorliegen einer p53-Mutation eine nukleäre Reaktivität (McCluggage 2009).

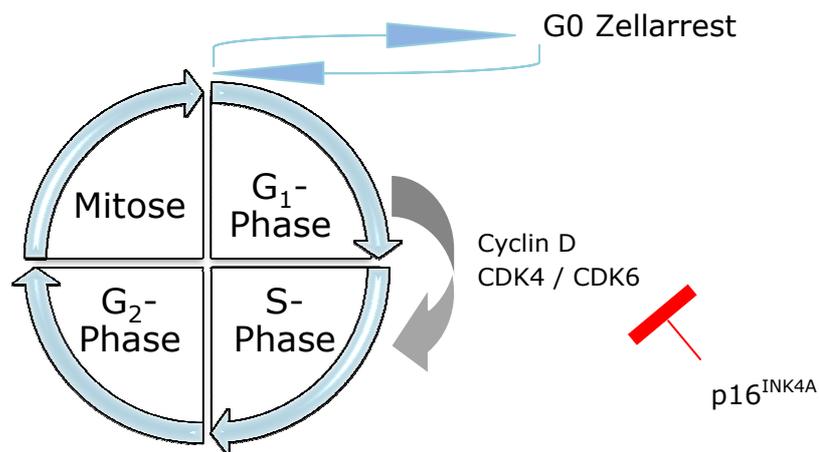
Für Borderlinetumoren ist das Fehlen der Mutation von p53 charakteristisch und wurde bereits mehrfach beschrieben (Wong 2010; Prat 2009; Vang 2009; Singer 2005; Chan 2000; Klemi 1994). Bei den hochdifferenzierten Karzinomen sowie den Borderlinetumoren des Ovars sind offenbar andere Mutationen von Bedeutung. Dies ist einer der Hinweise welche annehmen lassen, dass ein pathogenetischer Unterschied zwischen Borderlinetumoren und den niedrig differenzierten Karzinomen besteht (Kurman 2010; Prat 2009).

1.4.2 p16

p16 ist ein Produkt des INK4A-Gens, welches spezifisch an den Cyclinkomplex D:CDK4/6 bindet um den Zellzyklus an dem kritischen Übergang von der G₁- in die S-Phase zu kontrollieren (McCluggage 2009; Liggett 1998).

Für die einzelnen Phasen des Zellzyklus sind eine Reihe von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) spezifisch. Cycline sind Proteine deren Konzentration in der Zelle von den jeweiligen Phasen des Zellzyklus abhängt. Dabei bestimmen die Cycline den Zeitpunkt der Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen, indem sie an diese binden und somit deren enzymatische Aktivität regulieren (Löffler, Petrides 2003). Durch die enzymatische Aktivität der CDK4/6 wird das Retinoblastomprotein Rb, als zentrales Substrat in der G₁-Phase phosphoryliert (s.a. 1.4.1). Dies bewirkt die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, welcher wiederum für die S-Phase wichtige Gene aktiviert und damit die Progression des Zellzyklus gewährleistet (Giordano 2008). Gleichzeitig reguliert das Protein Rb die Expression von p16 durch negative Rückkoppelung (Montebugnoli 2010).

Das Cyclin D und die CDK4 sind für die G₁- und S-Phase spezifisch. p16 ist ein cyclinabhängiger Inhibitor der an diese Kinase 4 bindet und wird somit als CDK4I (Cyclin Dependent Kinase 4 Inhibitor) bezeichnet (McCluggage 2009) (s. Skizze 2). Verliert p16 aufgrund einer Mutation seine Funktion, besteht keine ausreichende Regulation der Zellproliferation, was zur Entstehung eines Karzinoms führen kann. Ein Funktionsverlust von p16 bedingt somit eine Dysregulation des CDK4-Cyclin D/p16-Rb-Signalwegs und zählt mit zu den häufigsten genetischen Ereignissen bei malignen Tumoren des Menschen (Konecny 2011; Sui 2000). Im Falle des Funktionsverlusts von p16 zeigt sich eine negative immunhistochemische Untersuchung für dieses Protein (Montebugnoli 2010). Ist das Rb-Protein aktiv hemmt dies die Expression von p16, wohingegen die Inaktivierung von Rb durch Phosphorylierung zu einer p16-Expression führt (Giordano 2008).



Skizze 2

Modifiziert nach Löffler, Petrides – Biochemie & Pathobiochemie, 2003

Eine Deaktivierung von p16 wurde initial bei Patienten mit familiär auftretendem malignem Melanom dokumentiert und beschrieben (O'Neill 2006; Rocco 2001). Das Expressionsverhalten von p16 in menschlichem Gewebe ist zudem altersabhängig. Bei Kindern findet sich vorwiegend im Thymus eine Expression von p16. Erwachsene zeigen diese dagegen im proliferierenden Endometrium, in Milchgängen der Mamma, Antrumzellen des Magens und in den Speicheldrüsen (O'Neill 2006). In Bezug auf den weiblichen Genitaltrakt ist p16 vor allem als Indikator einer Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) vom „high-risk“-Typ bekannt. Dies bedeutet, dass bei einer starken und diffusen Expression des immunhistochemischen Markers p16 eine HPV-Infektion z.B. in Läsionen der Zervix vorliegt (McCluggage 2009). Die p16-Expression im Gewebe ist von der Phosphorylierung des Retinoblastomproteins Rb abhängig. Liegt eine „high-risk“ HPV-Infektion vor, kann das Rb-Protein durch diesen inaktiviert werden. Dies führt zu einer Akkumulation von p16, welches so immunhistochemisch nachgewiesen werden kann (Giordano 2008, O'Neill 2007).

In einigen Studien fiel bei serösen Karzinomen von Endometrium und Ovar eine vermehrte Expression von p16 auf, trotz dessen wurde dieser Marker v.a. in Bezug auf das Ovar bislang noch nicht extensiv untersucht (O'Neill 2007 und 2006; Vang 2009). Es wird jedoch vermutet, dass das Expressionsverhalten von p16 in ovariellen Tumoren stadienabhängig ist: Desto höher das Tumorstadium, desto höher die Expression (O'Neill 2006). Zudem wird angenommen, dass eine immunhistochemische Expression von p16 in Ovarialtumoren unabhängig von der Karzinogenese durch HPV ist (Giordano 2008, Armes 2005), weshalb die Untersuchung von p16 nicht als Beweis verwendet werden kann, zu unterscheiden ob ein Ovarialkarzinom als Primärtumor, oder als Metastase eines Adenokarzinoms der Zervix entstanden ist. Eine starke Expression von p16 könnte aber nach Meinung einiger Autoren dennoch für eine Metastase des zervikalen Primärtumors sprechen (O'Neill 2007; Vang 2007; Elishaev 2005).

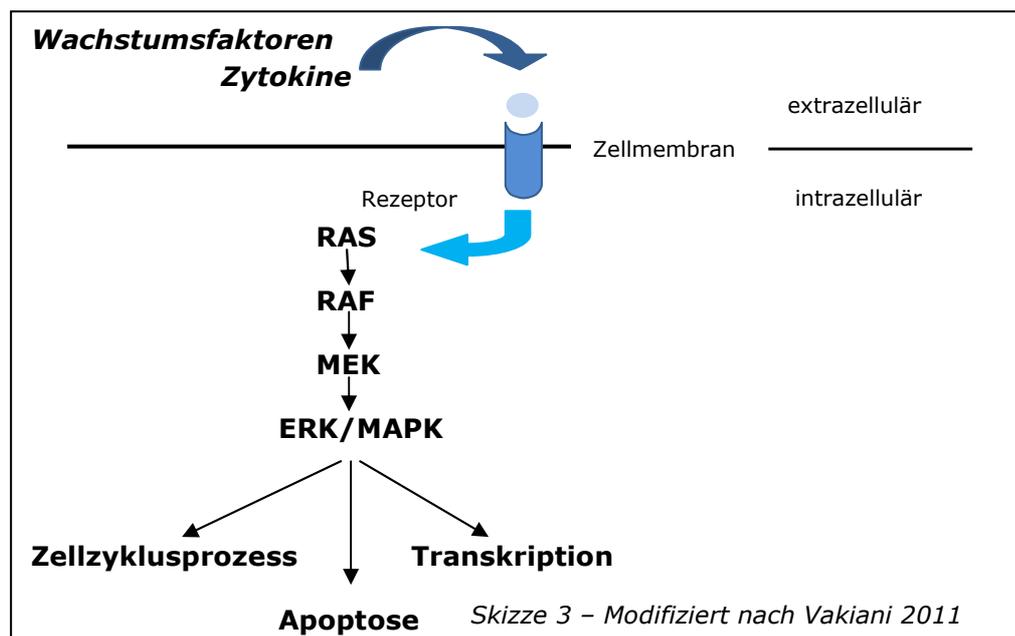
Bezüglich der Expression von p16 in ovariellen Borderlinetumoren finden sich in vorangegangenen Studien unterschiedliche Aussagen. Sui et al. (Sui 2000) zeigten in ihrer Arbeit in etwa der Hälfte der untersuchten Borderlinetumoren

eine Expression von p16. Armes et al. (Armes 2005) beobachteten hingegen in ihrer Studie, dass keiner der untersuchten Borderlinetumoren eine Expression aufwies, lediglich in schlecht differenzierten Ovarialkarzinomen ergab sich eine vermehrte p16-Expression. Ebenso berichtete O'Neill (O'Neill 2006 und 2007) über eine vermehrte Expression von p16 in der immunhistochemischen Untersuchung, vor allem in serösen Ovarialkarzinomen. Borderlinetumoren zeigten allenfalls geringe oder keine Expression von p16. Giordano et al. (Giordano 2008) konnten in ihrer Studie in den meisten der untersuchten Borderlinetumoren ein stark positives immunhistochemisches Ergebnis für p16 nachweisen, weiterhin wurde bei den malignen Tumoren eine Abhängigkeit der Expression vom Tumorstadium beobachtet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass maligne Neoplasien des Ovars häufiger eine Expression von p16 zeigen als Borderlinetumoren, und dass in Ovarialkarzinomen mit hohem Differenzierungsgrad eher als in solchen mit niedrigem Differenzierungsgrad eine p16-Expression detektiert wird. Die Betrachtung des Expressionsverhaltens von p16 in Borderlinetumoren des Ovars und die zusätzliche Untersuchung des Mutationsstatus von KRAS und BRAF ist somit durchaus interessant.

1.5 Molekulare Genetik

1.5.1 KRAS und BRAF

Der RAS-Signalweg ist ein Signaltransduktionsweg, der Signale von Tyrosinkinase-Rezeptoren der Zellmembran in den Zellkern übermittelt. KRAS und sein Effektor BRAF sind in diesem Signalweg die Moleküle, welche über eine Kaskade die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) aktivieren (Russel 2004). BRAF befindet sich in dieser Kaskade unterhalb von RAS und aktiviert MEK/ERK. Die Aktivierung des RAS-Gens löst über RAF, MEK und ERK die Signalkaskade aus und die Transduktion wird gestartet (siehe Skizze 3). Die MAPK besitzt zahlreiche Zielstrukturen die eine Rolle für z.B. Transkription, Wachstum, Angiogenese, Apoptose und Zytoskelettstruktur spielen (Vakiani 2011; Pearson 2001).



Eine Mutation von KRAS oder BRAF resultiert in einer Aktivierung des RAS/RAF/ERK/MAPK Signalwegs was in Folge zu einer Stimulation von Zielstrukturen mit dem Ergebnis der unkontrollierten Zellproliferation führt (Ueda 2008; Shih 2005). Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass eine Aktivierung der RAS-RAF-Kaskade ein häufiges Ereignis in der Tumorgenese zahlreicher Neoplasien des Menschen ist. Es sind drei RAS-Protoonkogene bekannt, KRAS, HRAS und NRAS. In ca. 25% aller Karzinome ist eines der RAS-Protoonkogene mutiert. Aktivierende KRAS-Mutationen wurden für Kodon 12, 13 und 61 beschrieben. Somatische Punktmutationen von KRAS treten in einer Vielzahl der Tumoren des Menschen, vor allem jedoch in malignen Neoplasien von Pankreas, Lunge und Dickdarm auf (Vakiani 2011). Die meisten epithelialen malignen Neoplasien welche eine RAS-Mutation aufwiesen, die gynäkologischen Tumoren mit eingeschlossen, zeigten diese in Exon 2 auf dem Kodon 12 (Gemignani 2003; Mayr 2006). Über 85% der kolorektalen Karzinome weisen eine KRAS-Mutation an diesem Genort auf (Vakiani 2011). Laut Gemignani et al. (Gemignani, 2003) zeigen insgesamt 46% der muzinösen und 17% anderer histologischer Subtypen der ovariellen Tumoren eine Mutation von KRAS. Bei Betrachtung der noninvasiven epithelialen ovariellen Tumoren sind KRAS-Mutationen in Borderlinetumoren des Ovars häufig. In zwei Drittel der Fälle tritt eine Mutation von KRAS auf, wobei die am häufigsten detektierte Punktmutation der Folge GGT->GTT entspricht (Diebold 2003). Ebenso wurden Mutationen von KRAS in Lymphknoten von Patientinnen mit ovarielltem Borderlinetumor nachgewiesen (Prat 2009).

Das RAF-Gen kodiert für zytoplasmatische Serin-Threonin-Kinasen, welche durch RAS reguliert werden und die durch RAS induzierte zelluläre Antwort auf Wachstumssignale vermitteln. Die RAF-Familie setzt sich aus den Protein-Kinasen A-RAF, B-RAF und RAF-1 (C-RAF) zusammen (Pearson 2001). Mutationen von BRAF wurden sowohl in Melanomen, kolorektalen Tumoren als auch in Neoplasien von Schilddrüse und Ovar nachgewiesen (Ueda 2008; Gemignani 2003). Vakiani et al. (Vakiani 2011) beschreiben BRAF daher als eines der am häufigsten von Mutationen betroffenen Proteine des Menschen. Eine BRAF-Mutation tritt in ca. 30% der Borderlinetumoren auf (Singer 2003). Die meisten BRAF-Mutationen, welche Einfluss auf die Aktivität der Kinase nehmen, fielen in Exon 11 und 15 auf, wobei in 90% der Fälle die Position des Kodons 600 (V600E, ehemals als V599E bezeichnet) betroffen ist (Vakiani 2011; Gemignani 2003). Zwei Drittel der ovariellen Borderlinetumoren zeigen eine Mutation von BRAF an dieser Stelle (Shih 2005). Davon tritt die Mutation in 89% direkt in, oder in direkter Nachbarschaft zu dem Aktivierungssegment in Exon 15 auf (Sieben 2004).

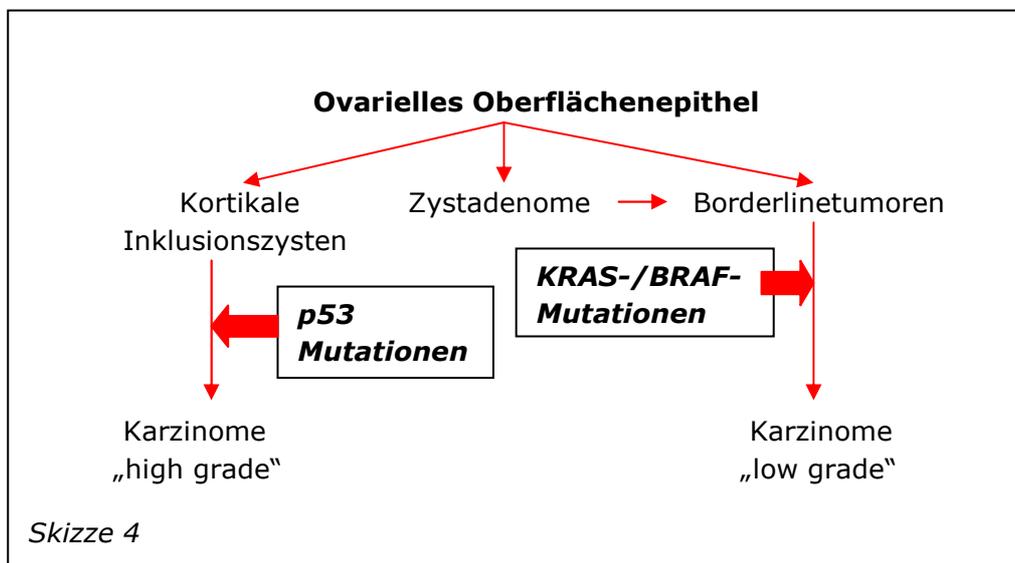
Für Borderlinetumoren des Ovars und Karzinome mit niedrigem Differenzierungsgrad sind nach Kurman et al. (Kurman 2010) und Shih et al. (Shih 2005) Mutationen von KRAS und BRAF charakteristisch, während diese bei Ovarialkarzinomen mit hohem Differenzierungsgrad seltener beobachtet werden. Dies stützt die Theorie, dass Ovarialkarzinome zu einem Teil aus ovariellen Borderlinetumoren entstehen im Sinne einer „Adenom-Borderlinetumor-Karzinom-Sequenz“. Es wird angenommen, dass KRAS und BRAF zwar eine frühe

Rolle bei der Tumorgenese spielen, aber nicht alleine für die maligne Transformation einer Zelle verantwortlich sind (Shih 2005).

In bisherigen Untersuchungen wurde eine gleichzeitige Mutation von KRAS und BRAF im selben Tumor bislang nur in wenigen Fällen beobachtet (Vakiani 2011; Mayr 2006; Bell 2005). Dies führte zu der Annahme, dass sich die beiden Mutationen gegenseitig ausschließen und in einem Tumor entweder KRAS oder BRAF mutiert ist (Brose 2002; Davies 2002, Singer 2003, Mayr 2006, Stefanius 2010). In manchen Untersuchungen fielen dennoch immer wieder Tumoren auf, welche sowohl eine KRAS- als auch eine BRAF-Mutation zeigten.

In der Studie von Sieben et al. (Sieben 2004) wurde in zwei ovariellen Borderlinetumoren eine gleichzeitige Mutation von KRAS und BRAF gefunden. Nakayama et al. (Nakayama 2008) berichteten über ein ovarielles Karzinom vom muzinösen Typ, welches eine KRAS- und BRAF-Mutation zeigt. Yachida et al. (Yachida 2009) fanden in ihrer an hyperplastischen kolorektalen Adenomen durchgeführten Untersuchung ebenfalls beide Mutationen in einer der Gewebeproben. Insgesamt lässt sich somit sagen, dass sich die Mutationen von KRAS und BRAF nicht immer gegenseitig ausschließen sondern, dass sie durchaus nebeneinander auftreten können.

In der ovariellen Tumorgenese unterscheidet man vor allem zwei Wege der Entstehung, wobei sowohl das Tumorsuppressorgen p53, als auch die Mutation von KRAS und BRAF eine Rolle spielen. Hierbei sind KRAS und BRAF vor allem bei der Entstehung der Karzinome vom sogenannten „low grade“-Typ von Bedeutung (Russel 2004; Kurman 2010), während die Karzinome vom „high grade“-Typ durch eine p53-Mutation charakterisiert werden. Hierzu siehe Skizze 4.



Skizze 4 modifiziert nach Russel and McCluggage 2004

Da die genaue Entstehung der extraovariellen Implantate der Borderlinetumoren bislang nicht genau geklärt ist wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere Implantate auf KRAS-und BRAF-Mutationen untersucht um anhand dessen den Zusammenhang zwischen Borderlinetumoren und diesen Läsionen zu klären.

2 Fragestellung

- Ergeben Mutationsanalysen bei Borderlinetumoren und zugehörigen Implantaten ein gleiches Ergebnis?
- Entspricht sich die Mutationsfolge, im Falle einer detektierten Mutation im ovariellen Primärtumor und den zugehörigen extraovariellen Implantaten?
- Können Implantate auch ohne eine vorhandene Mutation des Primärtumors eine Mutation aufweisen?
- Ist eine Mutation von KRAS oder BRAF obligat für die Entwicklung von Borderlinetumoren und/oder Implantaten?
- Lässt sich generell die Aussage bestätigen, dass sich die Mutationen von KRAS und BRAF meistens ausschließen?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Expression von p16 und dem Auftreten von KRAS- oder BRAF-Mutationen?

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Das untersuchte Tumorgewebe stammt aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ausgewählt wurden 25 Patientinnen mit dem Befund eines ovariellen Borderlinetumors, von welchen 23 Patientinnen mindestens einen extraovariellen Herd im Sinne eines Implantats aufwiesen.

Insgesamt wurde Material von 25 Patientinnen untersucht (siehe auch Abbildung 3.1). In 23 Fällen waren ein oder mehrere nicht invasive extraovarielle Implantate vorhanden. Bei 24 der untersuchten Patientinnen lag der Befund eines ovariellen Borderlinetumors vor, wobei 18 Patientinnen einen einseitigen und 6 Patientinnen einen bilateralen ovariellen Tumor aufwiesen. Eine Patientin zeigte den Befund eines extraovariellen Borderlinetumors, in diesem Fall waren zwar zahlreiche peritoneale Implantate zu finden, jedoch kein ovarieller Borderlinetumor. Zwei Patientinnen zeigten zu dem Befund des ovariellen Borderlinetumors keine extraovariellen Implantate. Diese Fälle wurden zusätzlich als Vergleichsfälle untersucht.

Sämtliche Patientinnen wurden in der Frauenklinik des Klinikums Großhadern und der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Ludwig-Maximilians-Universität Innenstadt in der Zeit von 2003 bis 2009 operiert. Das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 22 und 75 Jahren. Im Durchschnitt waren die Patientinnen 46,6 Jahre alt. Die histologische Klassifizierung und Einteilung des Tumorstadiums erfolgte nach UICC und FIGO (UICC 2009).

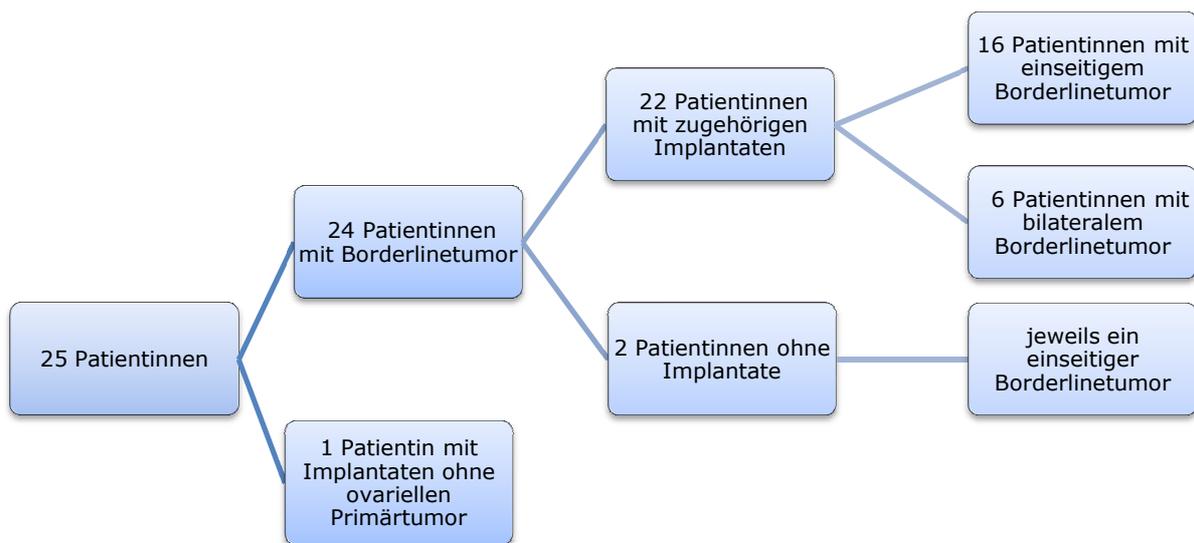


Abb. 3.1: Übersicht Patientengut

3.2 Untersuchungsmaterial

Zunächst wurden zu den einzelnen Patientenfällen die zugehörigen Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnittpräparate herausgesucht. Diese wurden unter dem Lichtmikroskop beurteilt, und die zugehörigen Paraffinblöcke aus dem Archiv des Pathologischen Instituts entnommen. Hierbei handelte es sich um in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material. Insgesamt wurden zu den 25 Patientenfällen 123 Paraffinblöcke akquiriert, aus welchen 124 Gewebeproben entnommen wurden. In einem Patientenfall stammen zwei Proben von einem Paraffinblock. Von den ovariellen Borderlinetumoren wurden insgesamt 44 Proben gesammelt, wobei hier pro Primärtumor zwischen ein und zwei Proben aufgrund des unterschiedlichen Zellgehalts untersucht wurden. Es konnten 80 Proben von extraovariellen Implantaten gesammelt werden, wobei die Anzahl der Implantate von Patientin zu Patientin variierte.

Die folgende Abbildung bietet eine Übersicht zu Anzahl und Ursprung der Proben.

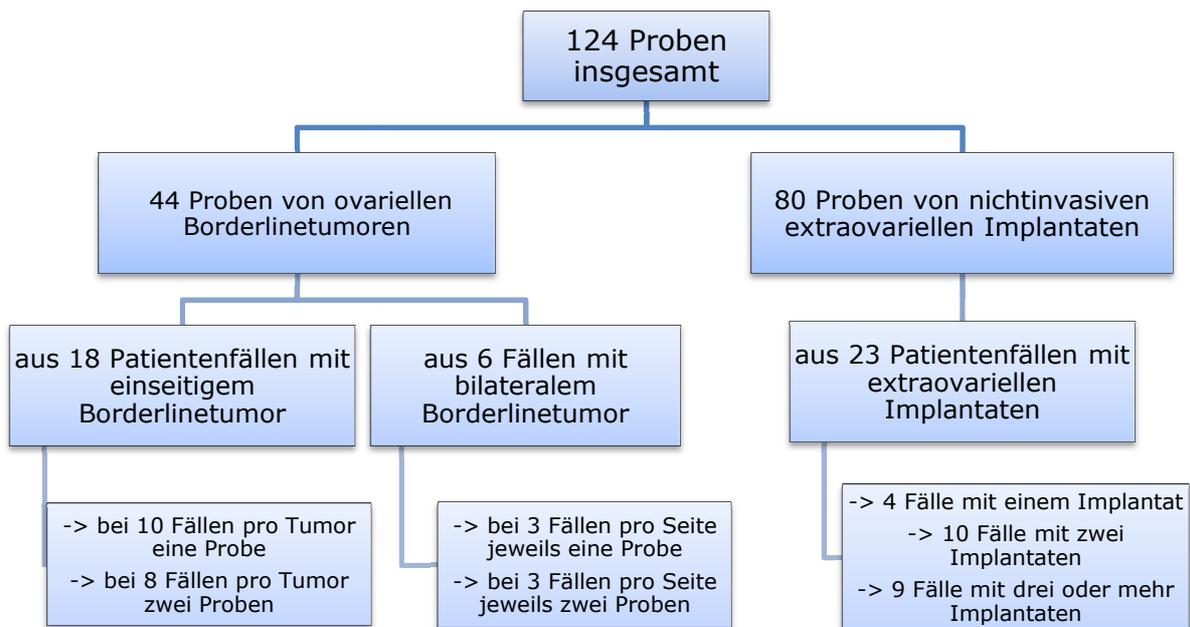


Abb. 3.2: Übersicht Probenanzahl

Von jedem der vorhandenen Paraffinblöcke wurden mit dem Mikrotom fünf neue Schnitte von ca. 2-3µm Dicke angefertigt, und auf SuperFrost Ultra Plus Objektträger gebracht.

3.3 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien

3.3.1 Geräte

Benchmark® XT	Ventana Medical Systems, Roche Group, Schweiz
Heizplatte	Präzitherm, Störk Tronic, Stuttgart, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom	Jung AG, Heidelberg, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, Erlangen-Nürnberg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pyromark™Q24 Reagent Cartridge	Pyrosequencing AB, Biotage AB, Uppsala, Schweden
Pyrosequenzer PyroMark™ Q24	Biotage AB, Uppsala, Schweden
Tischzentrifuge	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler MBS Satellite 0,2G	Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Vortex	Scientific industries .Inc, SI™, New York, USA
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland

3.3.2 Verbrauchsmaterialien

Objektträger	Menzel-Gläser SuperFrost Ultra Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
PCR-Platte	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
PCR-Strip caps	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pyromark Q24 Platte	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Tubes 0,2, 0,5 und 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.3.3 Chemikalien

Annealing Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Aqua bidest	H.Kerndl GmbH, Weißenfeld, Deutschland
Binding Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Denaturation Solution	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
dNTPs	Healthcare GE UK, Buckinghamshire, Großbritannien
Ethanol (absolut)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (reinst)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O(steril)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
HotStarTaq® DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Immunhistochemischer Antikörper p53	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Anatomical Pathology, Fremont, USA
Immunhistochemischer Antikörper p16	CINtec® Histology, MTM Laboratories AG, Heidelberg, Deutschland
PCR Primer-Mix	Metabion International AG, Martinsried, Deutschland
PCR-Puffer (10xBuffer)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Pyro Gold Reagents Für PyroMark™Q24	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAamp® DNA Micro Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Reagenzien für Benchmark® XT	Ventana Medical Systems, Roche Group, Schweiz
Sequenzierungs-Primer BRAF	Metabion International AG, Martinsried, Deutschland
Sequenzierungs-Primer KRAS	Metabion International AG, Martinsried, Deutschland
Streptavidin Sepharose™ High Performance, Beads	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Wasch-Puffer 10x	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Xylol (reinst)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

3.4 Immunhistochemische Untersuchung

Als Immunhistochemie wird die Methode bezeichnet, mit der Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Damit kann beispielsweise bestimmt werden, in welchem Gewebe das Protein vorhanden ist und auch, in welchem Kompartiment der Zelle (z.B. Zellmembran oder Zellkern) es lokalisiert ist. Für jedes der Präparate wurde jeweils eine immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Proteine p53 und p16 angefertigt. Hierfür wurden fertige Kits von Ventana verwendet und die Färbung automatisch durchgeführt.

3.4.1 p53 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression des Tumorsuppressorgens p53 erfolgte automatisch mit Hilfe des Benchmark® XT von Ventana. Der hier verwendete Antikörper war der p53 Ab-5 von Thermo Scientific.

3.4.2 p16 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression des Zellzyklusinhibitors p16 erfolgte automatisch mit Hilfe des Benchmark® XT von Ventana. Es wurde der Antikörper p16^{INK4a} von CINtec® Histology verwendet.

3.4.3 Auswertung

Zur Bewertung des immunhistochemischen Färbeargebnisses wurde der Score nach Remmele angewendet. Dabei werden sowohl die Färbeintensität, als auch der Anteil positiver Zellen betrachtet (s. Tab. 3.1). Das Produkt aus den Punkten für die Färbeintensität und den Punkten für den Anteil positiver Zellkerne ergibt einen Score-Wert zwischen 0 und 12 (Remmele und Stegner 1987). In dieser Untersuchung wurde ein Score von 0-2 als negativ, von 3-4 als schwach positiv, von 6-8 als mäßig und von 9-12 als stark positiv gewertet.

Punkte	Färbeintensität	Anteil positiver Zellkerne
0	keine Färbung	0%
1	schwach	<10%
2	mäßig	11%-50%
3	stark	51%-80%
4	/	81%-100%

Tab. 2: Remmele-Score, Auswertungsschema für immunhistochemische Färbungen

3.5 Mikrodissektion

3.5.1 Entparaffinierung

Die Präparate wurden dazu 2x15 min in Xylol, anschließend 2x10 min in absolutem Ethanol gewaschen und dann luftgetrocknet.

3.5.2 Gewinnung der Gewebeproben

Die bereits bestehenden HE-Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop beurteilt, und das zur Dissektion geeignete Tumorareal, oder Implantat mit wasserfestem Stift markiert. Diese Markierung wurde auf die entparaffinierten Leerschnitte

transferiert. Die Dissektion der Gewebeproben fand mit Hilfe eines Skalpells unter mikroskopischer Kontrolle statt.

3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.6.1 Vorarbeit: DNA-Extraktion

Für diesen Arbeitsschritt wurde der QIAmp® DNA Micro Kit nach Angaben des Herstellers Qiagen verwendet. Alle im Folgenden aufgeführten Reagenzien waren im Kit enthalten.

Der Vorgang der DNA-Elution besteht im Wesentlichen aus vier Schritten, welche im Folgenden genauer erläutert werden.

1. Schritt: Die Lyse der Gewebeprobe

Vor dem Beginn der Mikrodissektion der Präparate werden 0,5ml Eppendorf-Gefäße mit Lysepuffer des DNA Isolationssystems (QIAmp® DNA Micro Kit) vorbereitet. Das Lysat entspricht pro Gefäß 15µl ATL-Puffer (zuvor bei 500 Watt 15sec in Mikrowelle auf ca.70°C erwärmt) und 10µl Proteinase K. Nachdem das gekratzte Gewebe dem Lysat zugegeben wurde, werden die Proben gevortext (vortexen= mit Hilfe des Vortexgeräts rüttelnd vermischen) und bei 56°C übernacht im Thermomixer bei Intervallmix (450rpm) inkubiert, darauf folgt eine 10-minütige Inaktivierung des Enzyms bei 95°C.

2. Schritt: Das Binden der in dem Lysat enthaltenen DNA

Am nächsten Tag werden die Proben aus dem Thermomixer entnommen und sogleich zentrifugiert. Der ATL-Puffer wird bei 350 Watt 10sec in der Mikrowelle erwärmt und es werden jeder Probe 25µl zugegeben. Der AL-Puffer wird in der Mikrowelle bei 250 Watt für 5sec erwärmt und hiervon jeder Probe 50µl zugegeben, die Proben werden gevortext. Es werden jeder Probe 5µl Ethanol zugegeben, die Proben werden erneut gevortext und jetzt fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Während dieser Zeit werden die Auffanggefäße (Collection Tube 2ml) und die Säulengefäße (QIAamp MinElute™ Columns, Lagerung bei 4-8°C) für die DNA bereitgestellt und beschriftet. Nach diesen fünf Minuten werden die Proben kurz anzentrifugiert, der Inhalt wird abpipetiert und auf die Säulen transferiert. Die Säulen befinden sich in 2ml Auffanggefäßen und werden nun eine Minute bei 8000rpm zentrifugiert. Durch diesen Vorgang wird die in dem Lysat enthaltene DNA an die Membran der Säulen gebunden.

3. Schritt: Das Waschen der Membran

Es werden jeder Probe 500µl des AW1-Puffers zugegeben, und eine weitere Minute bei 8000rpm zentrifugiert. Danach werden jeder Probe 500µl des AW2 Puffers zugegeben und erneut eine Minute bei 8000rpm zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugieren werden die Auffanggefäße durch frische Gefäße ersetzt. Nun folgt das Trocknen, wofür die Proben drei Minuten bei 14000rpm zentrifugiert werden. Während dieser Zeit werden 1,5ml Eppendorf-Gefäße, welche im letzten Schritt die DNA auffangen, bereitgestellt und beschriftet.

4. Schritt: Das Eluieren der DNA von der Membran

Die Säulen werden der Zentrifuge entnommen und in die 1,5ml Eppendorf-Gefäße gesteckt, die alten Auffanggefäße werden verworfen. Es werden 20µl des AE-Puffers auf die Membran der Säule gegeben, die Proben werden ca. fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute bei 14000rpm zentrifugiert. Die Säulen werden den Eppendorf-Gefäßen entnommen und verworfen. Die fertigen DNA-Proben können nun in die PCR eingesetzt werden.

3.6.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction=PCR) erlaubt die gezielte Vermehrung (Amplifikation) spezifischer DNA-Abschnitte aus einem Gemisch von DNA-Molekülen. In der vorliegenden Untersuchung wurden hiermit die geringen Mengen an DNA, welche wir durch die Mikrodisektion der Präparate gewannen, amplifiziert, um die eigentlichen Mutationsanalysen durchführen zu können. Die PCR besteht aus drei wesentlichen Schritten:

Im ersten Schritt wird die DNA für eine halbe Minute auf 95°C erhitzt, wodurch sich die Doppelstränge trennen (Denaturierung). Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 60 bis 72°C abgekühlt, die Primer können sich nun an die getrennten DNA-Stränge anlagern (zweiter Schritt=Annealing). Erst nach Anlagerung der Primer beginnt die hinzugegebene DNA-Polymerase mit der Replikation, wofür Magnesiumionen und freie Nukleotide (dNTPs) im Reaktionsgemisch gebraucht werden. Im dritten Schritt (Extension) wird die optimale Arbeitstemperatur der Polymerase von 72°C erreicht. Nicht exakte Primerbindungen lösen sich bei dieser höheren Temperatur wieder, während exakte hingegen stabil sind und bis zur Komplementierung des fehlenden DNA-Stranges weiter verlängert werden. Es werden 50 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Temperaturen während der einzelnen Schritte, benötigt man eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die hier verwendete Polymerase ist die HotStarTaq® von Qiagen. Die PCR kann nur in einem bestimmten Puffermilieu ablaufen und findet in einem Thermocycler, einer Maschine zur exakten Temperaturregulierung, statt.

3.6.3 PCR-Ansatz für KRAS Mutationsanalysen

Verwendete Primer:

Ogino			Sequenz
P1	Primer	D361 KRAS-Pyro-F1	GGCCTGCTGAAAATGACTGAA
	Primer	D362 KRAS-Pyro-R1-BIO	TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT

Poehlmann			Sequenz
P2	Primer	D364 KRAS-Pyro-F2-BIO	TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTG
	Primer	D365 KRAS-Pyro-R2	TCGTCCACAAAATGATTCTGA

Ein PCR-Ansatz für eine Probe mit 40µl Reaktionsvolumen enthielt:

- H₂O 32,6µl
- 10xbuffer 4,0µl
 - MgCl₂-Konzentration von 15mM
- dNTP 0,4µl
 - Konzentration 200µM
- Primer-Mix 0,8µl
 - Konzentration 400nM jeder Primer
- HotStarTaq-Polymerase 0,2µl
 - entspricht 1U Polymerase
- DNA 2,0µl

3.6.4 PCR-Ansatz für BRAF Mutationsanalysen

Verwendete Primer:

P4		Sequenz
Primer	D376BRAF-Ex15-Pyro-F1	TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG
Primer	D377BRAF-Ex15-Pyro-R1-Bio	TCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT

Ein PCR-Ansatz für eine Probe mit 40µl Reaktionsvolumen enthielt:

- Siehe Rezept 3.6.3

3.7 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung läuft für die Mutationsanalysen von KRAS und BRAF jeweils gleich ab. Lediglich die verwendeten Sequenzierungsprimer unterscheiden sich.

3.7.1 Ablauf der Vorbereitung zur Pyrosequenzierung

Alle Reagenzien die verwendet werden, müssen zunächst auf Raumtemperatur gebracht und die Vakuum Prep Station vorbereitet werden.

Die Sepharose-Beads werden mittels sanftem Schütteln resuspendiert und anschließend ein Mix aus Binding Buffer, Wasser und den Beads angesetzt. Für jede zu sequenzierende Probe werden 65µl von dem oben genannten Mix benötigt.

Rezept für 65µl Mix: -2µl Beads
 -40µl Binding Buffer
 -23µl H₂O (steril)

Es werden jeweils 65µl Mix in jede Vertiefung der PCR-Platte vorgelegt und jeweils 15µl PCR-Produkt von einer DNA-Probe dazu pipettiert. Die PCR-Platte wird nun für fünf Minuten bei 1400 rpm gevortext. Inzwischen wird die Pumpe der Vakuum Prep Station eingeschaltet und mit Wasser deren Funktion überprüft. Anschließend folgt das Ansetzen des Primers für die Sequenzierung. Dazu werden 2,5µl des benötigten Primers für jede DNA-Probe gebraucht, diese werden aus einem vorher angefertigten Primer-Ansatz entnommen in dem die Konzentration

des Primers $0,3\mu\text{M}$ beträgt. Zu den $2,5\mu\text{l}$ Primer werden $22,5\mu\text{l}$ Annealing Buffer gegeben, was nun insgesamt $25\mu\text{l}$ entspricht. Für jede der zu sequenzierenden DNA-Proben werden $25\mu\text{l}$ Mix in die Näpfe der Pyromark Q24 Platte pipettiert.

Als nächstes werden die PCR-Platte mit den PCR-Produkten und die Pyromark Q24 Platte mit dem Sequenzierungs Primer in die vorgesehenen Positionen der Vakuum Prep Station (siehe Abb. 3.3) gestellt.

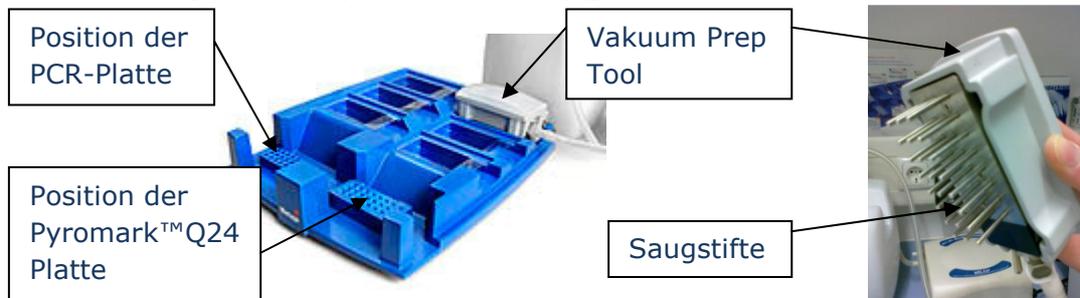


Abb. 3.3: Vakuum Prep Station und zugehöriges Vakuum Prep Tool

Durch die „Waschstrae“ der Vakuum Prep Station, wird die DNA in den PCR-Produkten für das Sequenzieren vorbereitet. Die Station besitzt insgesamt fünf Becken von welchen sich in dreien die für die DNA-Vorbereitung entscheidenden Flüssigkeiten befinden. Das erste Becken enthält Ethanol (70%), das Zweite Denaturation Solution, das Dritte Wasch-Puffer. Die anderen Becken der Station enthalten Aqua bidest zur Reinigung des Vakuum Prep Tools.

Zuerst werden die PCR-Produkte zusammen mit den Beads mit Hilfe des Vakuum Prep Tools aus den Vertiefungen der PCR-Platte gesaugt. Das Vakuum Prep Tool wird nun für ca. 5-10 Sekunden in jedes der drei Becken der Prep Station getaucht. Wenn alle Becken durchlaufen sind erfolgt ein kurzes Trocknen der Saugstifte des Vakuum Prep Tools an der Luft. Danach wird das Vakuum Prep Tool abgeschaltet während es über die Pyromark Q24 Platte gehalten wird. Durch leichtes Rütteln werden die Beads von den Saugstiften des Vakuum Prep Tools in die einzelnen Näpfe der Q24 Platte transferiert. Anschließend wird das Prep Tool im Wasserbad gereinigt und danach an der Luft getrocknet.

Nach der Vakuum Prep Station kommt die Pyromark Q24 Platte für 2 Minuten bei 80°C auf die Heizplatte. Danach wird die Q24 Platte für mindestens 5 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt.

Während dieser Zeit werden die für die Sequenzierung notwendigen Reagenzien, Enzym und Substrat, sowie die Nukleotide in die Pyromark™ Q24 Reagent Cartridge gegeben. Zusammen mit der abgekühlten Pyromark Q24 Platte wird die Cartridge in den Pyrosequenzer eingesetzt und der Sequenzierungslauf gestartet.

3.7.2 Pyrosequenzierungs-Reaktion

DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül. Pyrosequenzierung ist eine Technologie, welche auf dem Prinzip der Sequenzierung durch Synthese basiert. Zunächst wird die DNA mittels PCR-Reaktion amplifiziert, anschließend folgt das Pyrosequenzieren. Dazu ist eine Vorbereitung von Hand notwendig, deren Ablauf in 3.7.1 erläutert wird. Die eigentliche Pyrosequenzierungs-Reaktion, welche das Gerät Pyromark™Q24 durchführt, beinhaltet im Wesentlichen fünf Schritte:

Schritt 1: Hybridisierung des Sequenzierungs-Primers an die im PCR-Produkt vorliegenden DNA-Einzelstränge, welche als Matrize dienen. Diese werden nun zusammen mit den Enzymen, DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase, Apyrase und den zugehörigen Substraten, Adenosin 5´Phosphosulfat (APS) und Luciferin, inkubiert.

Schritt 2: Das erste Desoxyribonukleotid-Triphosphat (dNTP) wird der Reaktion zugegeben. Die DNA-Polymerase katalysiert den Einbau der dNTPs in den DNA-Strang, im Falle der Kompatibilität zur Base im Matrizenstrang. Im Falle eines erfolgreichen Einbaus wird die Menge an Pyrophosphat (PPi) freigesetzt, welche der Menge der eingebauten Nukleotide entspricht.

Schritt 3: Durch die ATP-Sulfurylase wird PPi in Gegenwart von Adenosin 5´Phosphosulfat (APS) in ATP umgewandelt. Dieses ATP bewerkstelligt den durch die Luciferase vermittelten Umbau von Luciferin zu Oxyluciferin, welches proportional zur Menge des ATP sichtbares Licht generiert. Dieses durch die Luciferase-Reaktion produzierte Licht wird vom CCD-Chip (charge coupled device) des Geräts detektiert und schließlich als ein Peak im Pyrogramm gesehen. Die Höhe eines jeden Peaks (Lichtsignal) ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide.

Schritt 4: Durch die Apyrase, welche ein Nukleotid abbauendes Enzym ist, werden kontinuierlich die nicht eingebauten Nukleotide und ATP abgebaut. Sobald diese vollständig abgebaut sind, wird ein neues Nukleotid hinzugegeben.

Schritt 5: Die sequentielle Zugabe der dNTPs wird durchgeführt. Während dieses Prozesses erfolgt die Synthese des komplementären DNA-Stranges. Durch die Signal-Peaks im Pyrogramm zeigt sich die Sequenz der Nukleotide.

3.7.3 Verwendete Sequenzierungsprimer für KRAS Mutationsanalysen

KRAS Exon 2 in Kodon 12

Sequenzierung	Primer-Name	Primer-Sequenz
Ogino	D363 KRAS-Pyro-S1	TGTGGTAGTTGGAGCT
Poehlmann	D366 KRAS-Pyro-S2	GCACTCTTGCCTACG

3.7.4 Verwendeter Sequenzierungsprimer für BRAF Mutationsanalysen
 BRAF Exon 15, Position V600E

Primer-Name	Primer-Sequenz
D378 BRAF-Ex15-Pyro-S1	GTAAAATAGGTGATTTTGG

3.7.5 Auswertung

Während eines Sequenzierungslaufes ergeben sich fortlaufend Daten, welche auf einem USB-Stick gespeichert werden. Nach abgeschlossenem Lauf können die gespeicherten Daten mit Hilfe des Computer-Programms AQ Pyrogram Report analysiert werden. Mit dem so erstellten Pyrogramm kann nun anhand der Signal-Peaks im Pyrogramm für jede einzelne Probe ausgewertet werden, ob die Form des Wildtyp (siehe Abb. 3.4) oder eine Punktmutation (siehe Abb. 3.5) des sequenzierten DNA-Abschnittes vorliegt. Eine Punktmutation wurde dann als solche gewertet, wenn der entsprechende Signal-Peak im Pyrogramm über 5% an Höhe erreichte und der Sequenzierungslauf qualitativ entsprechend gut war. Bei fraglichen Pyrogrammen, in denen sich ein unruhiger Lauf oder keine deutlichen Signal-Peaks zeigten, wurde die Pyrosequenzierung wiederholt. Sowohl bei den Mutationsanalysen für KRAS, als auch für BRAF wurde bei der Auswertung nach demselben Prinzip verfahren.

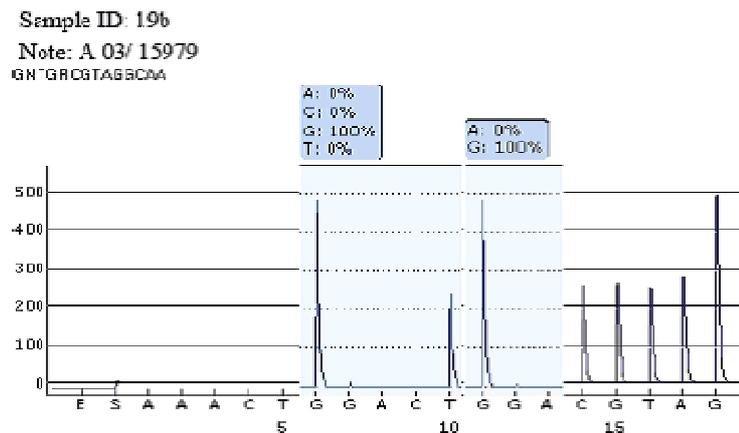


Abb. 3.4: Pyrogramm der KRAS-Mutationsanalyse der Probe 19b, welche für Kodon 12 die Wildtyp-Form zeigt

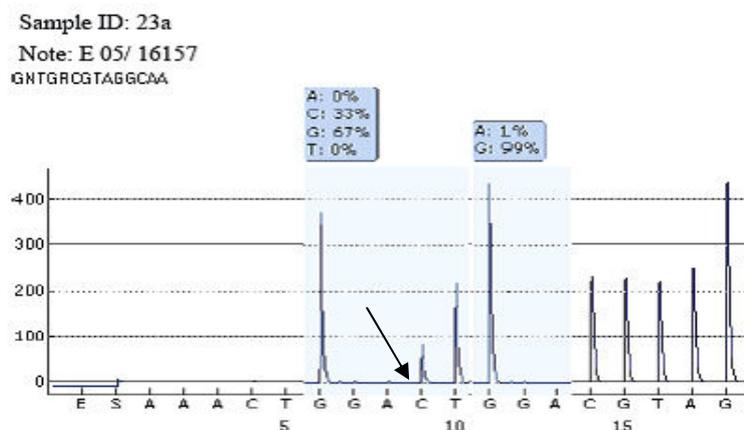


Abb. 3.5: Pyrogramm der KRAS-Mutationsanalyse der Probe 23a, welche für Kodon 12 die Punktmutation (siehe Pfeil) von GGT->GCT zeigt

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistologie

Die 25 untersuchten Patientenfälle umfassten insgesamt 124 Paraffinblöcke. Von jedem Paraffinblock wurde jeweils einer der neuangefertigten Schnitte, zur Frage einer p53- und p16-Expression, immunhistochemisch gefärbt. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte nach dem Remmele-Score (s. Tabelle 3.1).

4.1.1 Auswertbarkeit der immunhistochemischen Untersuchungen

Sowohl bei der p53- als auch bei der p16-Immunhistologie ergaben sich Probleme bei der Auswertung. Dies betraf vor allem die neuen Schnitte der Blöcke welche die Implantate enthielten, da die Implantate meist nur von sehr geringer Größe sind. In Paraffinblöcken der Borderlinetumoren war genügend Zellmaterial vorhanden, wodurch sich hier kein Problem bei der Auswertung ergab.

Nicht ausgewertet wurden Präparate auf welchen aufgrund der meist sehr kleinen Implantate keine dementsprechenden Zellen mehr zu finden waren. Ebenfalls nicht ausgewertet wurden Präparate bei welchen während des Färbeprozesses entscheidendes Zellmaterial verloren gegangen war, oder das Schnittpräparat nach Bearbeitung großflächig Luft gezogen hatte. Die Anzahl der nicht gewerteten Proben zeigen Tabelle 3 und 4.

4.1.2 Ergebnisse der p53-Expression

Von den insgesamt 44 Proben der 24 untersuchten Borderlinetumoren, konnten alle Präparate ausgewertet werden. 26 der Präparate zeigten dabei keine Expression von p53. Bei 11 Präparaten zeigte sich eine schwach positive und bei vier Präparaten eine mäßig positive p53-Expression. Lediglich drei der untersuchten Präparate der Borderlinetumoren zeigten eine starke Expression von p53. Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft die Ergebnisse einer immunhistochemischen Färbung des p53-Proteins.

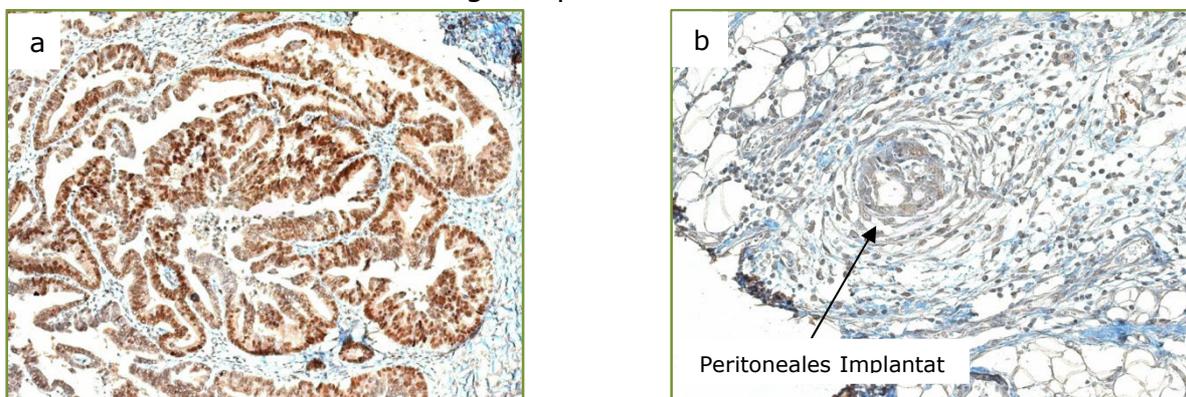


Abb. 4.1: a) Immunhistochemische Färbung des Schnittpräparats eines Borderlinetumors mit stark positiver p53-Expression; b) Immunhistochemische Färbung eines peritonealen Implantats mit fehlender p53-Expression

Von den insgesamt 80 vorliegenden Implantaten, konnten 68 Präparate ausgewertet werden. 48 Präparate zeigten keine Expression von p53. 14 Präparate zeigten eine schwach positive und drei eine mäßig positive Expression von p53. Drei Präparate zeigten eine starke p53-Expression.

Betrachtet man die jeweiligen Patientenfälle separat, ergibt sich in sieben Fällen eine negative p53-Immunhistologie sowohl für den Borderlinetumor, als auch die zugehörigen Implantate. In vier der Patientenfälle zeigte der Borderlinetumor keine p53-Expression, jedoch waren die zugehörigen Implantate schwach bis stark positiv. Acht der Fälle mit ovariellen Borderlinetumoren wiesen eine schwach positive p53-Expression auf, davon zeigten sechs Patientenfälle das gleiche Ergebnis in den zugehörigen Implantaten. In vier Patientenfällen zeigte der Borderlinetumor eine stark bis mäßige Expression von p53, von diesen Fällen besaßen drei zugehörige Implantate mit lediglich schwach positiver oder negativer Expression von p53.

Zum Ergebnis der Immunhistochemie der einzelnen Patientenfälle siehe Tabelle 5, in Tabelle 8 wird die Immunhistologie gemeinsam mit dem Ergebnis der Mutationsanalysen von KRAS und BRAF veranschaulicht.

p53-Expression nach IRS	Proben Borderlinetumoren	Proben Implantate
Negativ	26 (59,1%)	48 (60%)
Schwach positiv	11 (25%)	14 (17,5%)
Mäßig positiv	4 (9,1%)	3 (3,75%)
Stark positiv	3 (6,8%)	3 (3,75%)
Nicht auswertbar	0 (0%)	12 (15%)

Tab. 3: Ergebnisse der p53-Immunhistologie

4.1.3 Ergebnisse der p16-Expression

Von den 24 untersuchten Borderlinetumoren konnten alle der 44 vorliegenden Proben ausgewertet werden. Elf Präparate zeigten keine Expression von p16. Eine schwach positive p16-Expression fand sich in neun Präparaten. In zwölf Präparaten zeigte sich eine mäßig und in weiteren zwölf Präparaten eine stark positive Expression von p16. Die folgenden Abbildungen zeigen die immunhistochemische Färbung von Präparaten mit einer starken Expression von p16.

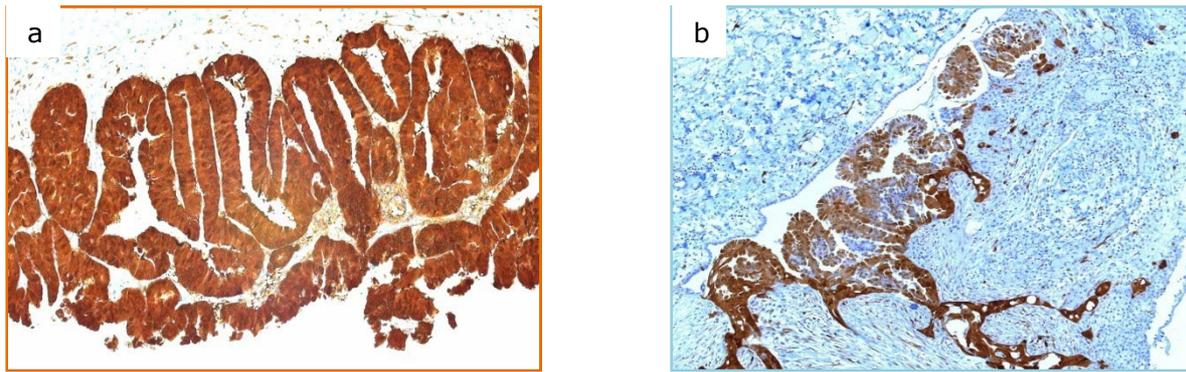


Abb. 4.2: Immunhistochemische Färbung eines Borderlinetumors (a) und eines Implantats (b) mit stark positiver p16-Expression

Von insgesamt 80 vorliegenden Implantaten konnten 70 der Präparate auf das Vorliegen einer Expression von p16 ausgewertet werden. 14 Präparate zeigten keine Expression von p16. In 15 Präparaten war eine schwach, in 17 Präparaten eine mäßig positive p16-Expression. Bei 24 Präparaten war eine stark positive Expression von p16 zu beobachten.

Betrachtet man die Fälle der Patientinnen einzeln, zeigten zwei Patientenfälle sowohl im Borderlinetumor als auch in den zugehörigen Implantaten keine Expression von p16 (Fallnr. 1 und 21). In 15 der Patientenfälle mit ovariellen Borderlinetumor war eine stark bis mäßige p16-Expression im Tumor zu beobachten. Vier dieser ovariellen Borderlinetumoren zeigten eine starke bis mäßige p16-Expression, jedoch nur eine schwache oder keine Expression von p16 in den zugehörigen Implantaten. In 16 der Patientenfälle mit extraovariellen Implantaten war in einem oder mehreren Implantaten eine stark bis mäßige Expression von p16 vorhanden. Sechs dieser Fälle zeigen zwar eine starke bis mäßige p16-Expression in den Implantaten, jedoch nicht im zugehörigen Borderlinetumor. In Tabelle 5 sind die kompletten Patientenfälle mit ihrem immunhistochemischen Ergebnis der einzelnen Präparate zusammengefasst. Tabelle 8 zeigt zudem das Ergebnis der Mutationsanalysen von KRAS und BRAF im Zusammenhang mit der Immunhistologie.

P16-Expression nach IRS	Proben Borderlinetumoren	Proben Implantate
Negativ	11 (25%)	14 (17,5%)
Schwach positiv	9 (20,4%)	15 (18,75%)
Mäßig positiv	12 (27,3%)	17 (21,25%)
Stark positiv	12 (27,3%)	24 (30%)
Nicht auswertbar	0 (0%)	10 (12,5%)

Tab. 4: Ergebnisse der p16-Immunhistologie

4.1.4 Übersichtstabelle der immunhistologischen Ergebnisse

Tab.5: Immunhistologie; LMP=Borderlinetumor, n.a.=nicht auswertbar, - =negativ, (+)=schwach positiv, +=mäßig und stark positiv

Fallnr.	Art der Probe	Probenzahl	IRS p53	IRS p16
1	Seröser LMP linkes Ovar	1	-	-
	1 Peritoneales Implantat	1	-	-
2	seröser LMP linkes Ovar	2	-/(+)	(+)/-
	seröser LMP rechtes Ovar	2	-/-	(+)/(+)
	4 peritoneale Implantate	4	2n.a./-/(+)	-/+/(+)
3	Seröser LMP rechtes Ovar	1	-	-
	2 peritoneale Implantate	2	-/-	-/+
4	Serös/muzinöser LMP Ovar rechts	1	-	+
	1 Peritoneales Implantat	1	+	+
5	Seröser LMP rechtes Ovar	1	+	+
	2 peritoneale Implantate	2	(+)/(+)	n.a./(+)
6	Seröser LMP linkes Ovar	2	-/-	+/+
	4 peritoneale Implantate	4	-/3 n.a.	(+)/-/2n.a
7	Seröser LMP linkes Ovar	1	-	+
	2 peritoneale Implantate	2	-/+	+/+
8	seröser LMP linkes Ovar	1	(+)	(+)
	seröser LMP rechtes Ovar	1	-	-
	2 peritoneale Implantate	2	2n.a	2n.a
9	seröser LMP rechtes Ovar	2	-/(+)	+/+
	4 peritoneale Implantate	4	+/(+)/-/-	+/+/+/+
10	seröser LMP linkes Ovar	2	(+)/(+)	+/+
11	seröser LMP linkes Ovar	2	-/+	-/+
	2 peritoneale Implantate	2	(+)/-	+/+
12	seröser LMP linkes Ovar	1	(+)	+
	3 peritoneale Implantate	3	-/-/-	+/+/+
13	seröser LMP linkes Ovar	1	-	-
	seröser LMP rechtes Ovar	1	(+)	+
	2 Implantate	2	n.a./+	n.a./-
14	seröser LMP rechtes Ovar	1	-	-
	2 peritoneale Implantate	2	-/-	+/+
15	7 Implantate	7	4-/2(+)/+	n.a/3-/3+
16	seröser LMP Ovar	2	-/-	-/(+)
	2 peritoneale Implantate	2	-/-	-/+
17	seröser LMP rechtes Ovar	1	-	+
	1 peritoneales Implantat	1	(+)	(+)
18	seröser LMP linkes Ovar	1	-	+
	seröser LMP rechtes Ovar	1	-	+
	2 peritoneale Implantate	2	-/-	+/+
19	seröser LMP rechtes Ovar	2	+/(+)	+/+
	seröser LMP linkes Ovar	2	+/(+)	+/+
	3 peritoneale Implantate	3	(+)/-/-	+/+/+
20	seröser LMP rechtes Ovar	1	+	+
	2 Implantate	2	-/-	+/+
21	seröser LMP linkes Ovar	1	(+)	-
	1 peritoneales Implantat	1	(+)	-
22	seröser LMP rechtes Ovar	2	(+)/-	+/+
	6 peritoneale Implantate	6	5-/+	na/-/(+)/3+
23	seröser LMP linkes Ovar	2	-/-	-/(+)
	6 peritoneale Implantate	6	3n.a./ 3-	na/(+)/3+
24	seröser LMP linkes Ovar	2	+/+	+/+
25	seröser LMP linkes Ovar	2	-/-	(+)/(+)
	seröser LMP rechtes Ovar	2	-/-	-/(+)

	19 Implantate	19	na/14-/4(+)	na/3- /9(+)/6+
--	---------------	----	-------------	-------------------

4.2 KRAS- und BRAF-Mutationsanalysen

4.2.1 Auswertbarkeit der KRAS- und BRAF-Mutationsanalysen

Die vorliegenden 124 Gewebeproben konnten alle analysiert werden, die erstellten Pyrogramme konnten ebenfalls alle ausgewertet werden. Die Abbildung 4.3 und 4.4 zeigen beispielhaft zwei auswertbare Pyrogramme, von welchen eines eine Mutation und eines Wildtyp zeigt.

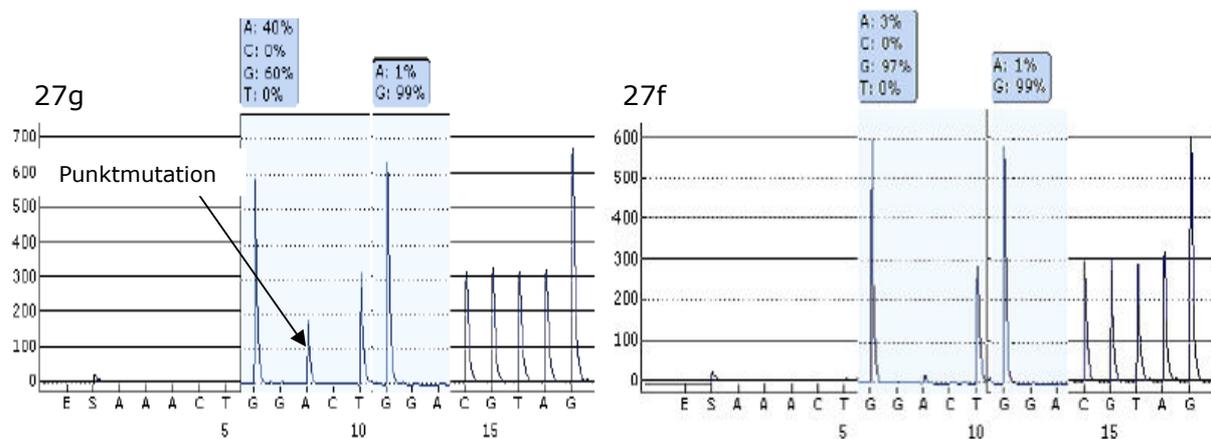


Abb. 4.3: Pyrogramme der KRAS-Mutationsanalyse der Probe 27g welche die Punktmutation GGT->GAT, und der Probe 27f welche die Wildtypform zeigt

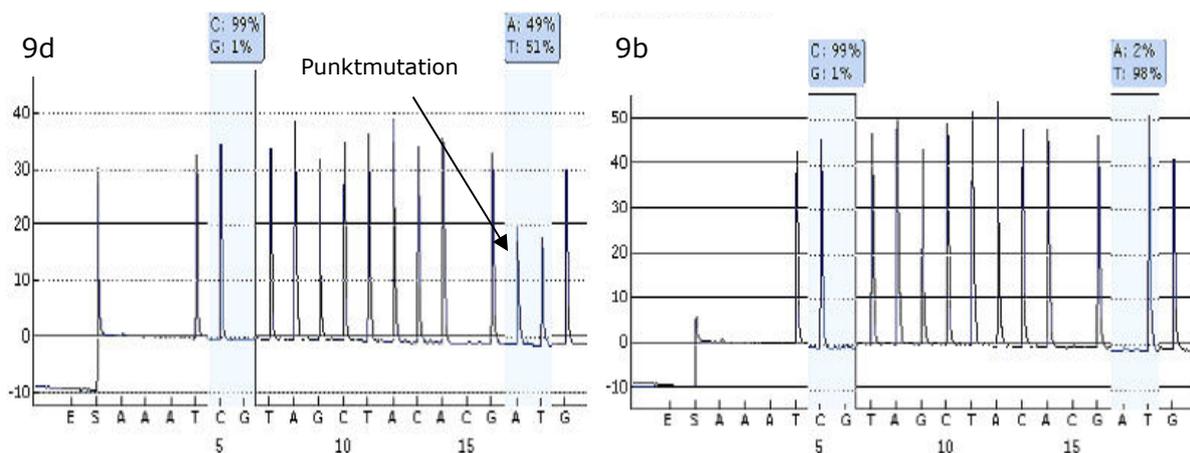


Abb. 4.4: Pyrogramme der BRAF-Mutationsanalyse der Probe 9d welche die Punktmutation GTG->GAG, und der Probe 9b welche die Wildtypform zeigt

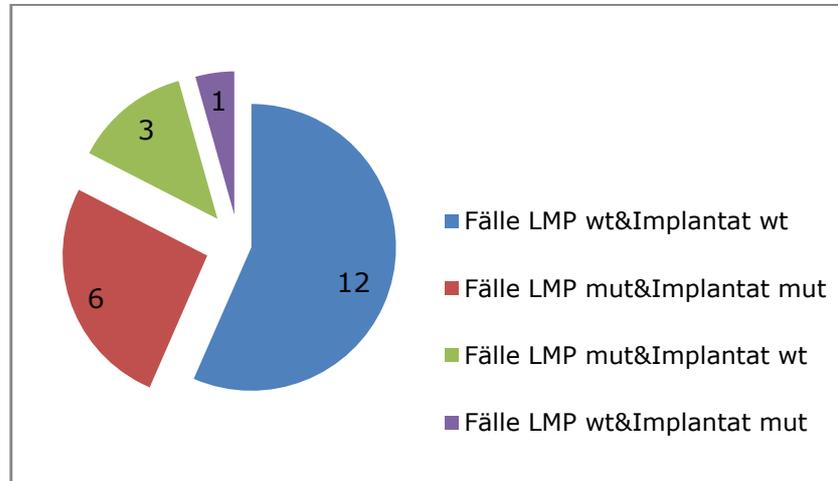
4.2.2 Ergebnisse der KRAS-Mutationsanalysen

Von den 25 untersuchten Patientenfällen war in 22 Fällen ein ovarieller Borderlinetumor mit zugehörigen extraovariellen Implantaten vorhanden. Von diesen 22 Fällen ergab sich in sechs Fällen eine Mutation im Tumor und in den

zugehörigen Implantaten, wobei sich die Mutationsfolge jeweils entsprach. In drei Fällen wies zwar der Tumor eine Mutation von KRAS auf, jedoch nicht die zugehörigen Implantate. In einem Fall fand sich eine KRAS-Mutation im Implantat, aber nicht im Tumor. In 12 Fällen zeigte sich weder im Tumor, noch in den zugehörigen Implantaten eine KRAS-Mutation. Hierzu siehe auch Abb. 4.5.

Abb. 4.5: Mutation von KRAS in Borderlinetumoren mit zugehörigen Implantaten

LMP=Borderlinetumor
Wt=Wildtyp
Mut=Mutation



In zwei Patientenfällen waren keine Implantate zum ovariellen Borderlinetumor vorhanden, in einem weiteren Fall war kein ovarieller Borderlinetumor jedoch zahlreiche peritoneale Implantate vorhanden. In keinem dieser drei Fälle (Fall 10, 15 und 24) ergab sich eine Mutation von KRAS. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der KRAS-Mutationsanalysen zusammengefasst, die detektierten Mutationen von KRAS und die jeweilige Änderung der Basenfolge sind angegeben.

Die Ergebnisse der Mutationsanalysen bezogen auf die einzelnen 124 Gewebeprobe, aufgeschlüsselt in Borderlinetumoren und Implantate, zeigt die folgende Abbildung 4.6.

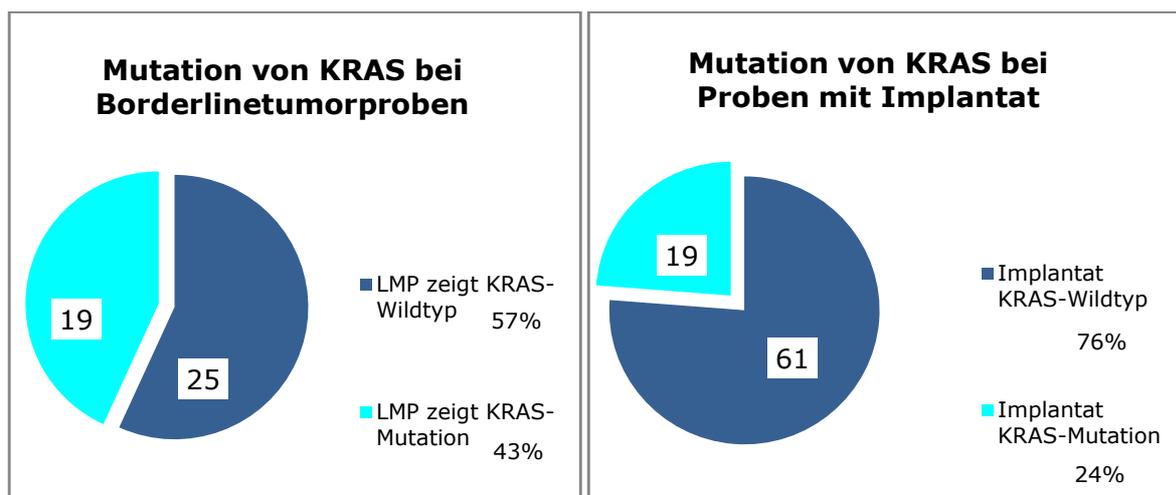


Abb. 4.6: Übersicht über Ergebnis der KRAS-Mutationsanalyse der 124 Gewebeprobe

Ergebnisse

Tab. 6: Ergebnisse der KRAS-Mutationsanalysen; LMP=Borderlinetumor, Wt=Wildtyp

Fallnr.	Art der Probe	Probenzahl	KRAS-Mutation
1	Seröser LMP linkes Ovar	1	Wt
	1 Peritoneales Implantat	1	Wt
2	seröser LMP linkes Ovar	2	2 Wt
	seröser LMP rechtes Ovar	2	2 Wt
	4 peritoneale Implantate	4	4 Wt
3	Seröser LMP rechtes Ovar	1	Wt
	2 peritoneale Implantate	2	2 Wt
4	Serös/muzinöser LMP rechtes Ovar	1	GGT->GAT
	1 Peritoneales Implantat	1	GGT->GAT
5	Seröser LMP rechtes Ovar	1	Wt
	2 peritoneale Implantate	2	2 Wt
6	Seröser LMP linkes Ovar	2	2 Wt
	4 peritoneale Implantate	4	4 Wt
7	Seröser LMP linkes Ovar	1	Wt
	2 peritoneale Implantate	2	2 Wt
8	seröser LMP linkes Ovar	1	Wt
	seröser LMP rechtes Ovar	1	Wt
	2 peritoneale Implantate	2	1 Wt; 1 GGT->GAT
9	seröser LMP rechtes Ovar	2	2 GGT->GAT
	4 peritoneale Implantate	4	3 Wt; 1 GGT->GAT
10	seröser LMP linkes Ovar	2	2 Wt
11	seröser LMP linkes Ovar	2	2 Wt
	2 peritoneale Implantate	2	2 Wt
12	seröser LMP linkes Ovar	1	Wt
	3 peritoneale Implantate	3	3 Wt
13	seröser LMP linkes Ovar	1	Wt
	seröser LMP rechtes Ovar	1	Wt
	2 Implantate	2	2Wt
14	seröser LMP rechtes Ovar	1	Wt
	2 peritoneale Implantate	2	2 Wt
15	7 Implantate	7	7 Wt
16	seröser LMP Ovar	2	2 Wt
	2 peritoneale Implantate	2	2 Wt
17	seröser LMP rechtes Ovar	1	GGT->GCT
	1 peritoneales Implantat	1	Wt
18	seröser LMP linkes Ovar	1	Wt
	seröser LMP rechtes Ovar	1	GGT->GTT
	2 peritoneale Implantate	2	1 Wt; 1 GGT->GTT
19	seröser LMP rechtes Ovar	2	2 GGT->GCT
	seröser LMP linkes Ovar	2	2 GGT->GCT
	3 peritoneale Implantate	3	2 Wt; 1 GGT->GCT
20	seröser LMP rechtes Ovar	1	Wt
	2 Implantate	2	2 Wt
21	seröser LMP linkes Ovar	1	GGT->GTT
	1 peritoneales Implantat	1	Wt
22	seröser LMP rechtes Ovar	2	2 GGT->GTT
	6 peritoneale Implantate	6	6 Wt
23	seröser LMP linkes Ovar	2	2 GGT->GAT
	6 peritoneale Implantate	6	4 Wt; 2 GGT->GAT
24	seröser LMP linkes Ovar	2	2 GGT->GTT
25	seröser LMP linkes Ovar	2	2 GGT->GTT
	seröser LMP rechtes Ovar	2	1 Wt; 1 GGT->GTT
	19 Implantate	19	7 Wt; 12 GGT->GTT

4.2.3 Ergebnisse der BRAF-Mutationsanalysen

Von den 25 untersuchten Patientenfällen war in 22 Fällen ein ovarieller Borderlinetumor mit zugehörigen extraovariellen Implantaten vorhanden. Von diesen 22 Fällen ergab sich in acht Fällen eine Mutation im ovariellen Tumor und den zugehörigen Implantaten. In vier Fällen fand sich zwar eine Mutation von BRAF in den Implantaten, jedoch nicht im Borderlinetumor. In drei Fällen zeigte der ovarielle Borderlinetumor eine BRAF-Mutation nicht aber die Implantate. Sieben Fälle besaßen weder im Tumor noch in den Implantaten eine Mutation von BRAF. Hierzu siehe auch Abbildung 4.7.

In zwei Patientenfällen waren keine Implantate zum ovariellen Borderlinetumor vorhanden, in einem weiteren Fall war kein ovarieller Borderlinetumor jedoch zahlreiche peritoneale Implantate vorhanden. In keinem dieser drei Fälle (Fall 10, 15 und 24) zeigte sich eine Mutation von BRAF. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der BRAF-Mutationsanalysen der einzelnen Fälle aufgeführt.

Das Ergebnis der Mutationsanalysen, bezogen auf die insgesamt untersuchten Gewebeproben veranschaulicht die Abbildung 4.8.

Abb. 4.7: Mutation von BRAF in Borderlinetumoren und zugehörigen Implantaten

LMP=Borderlinetumor
Wt=Wildtyp
Mut=Mutation

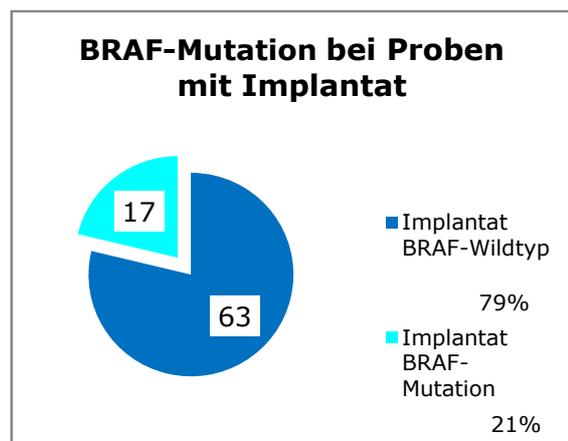
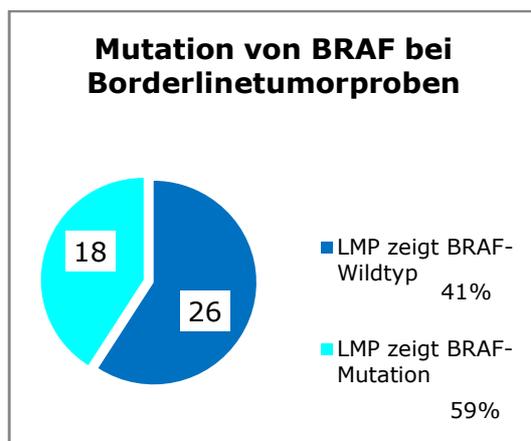
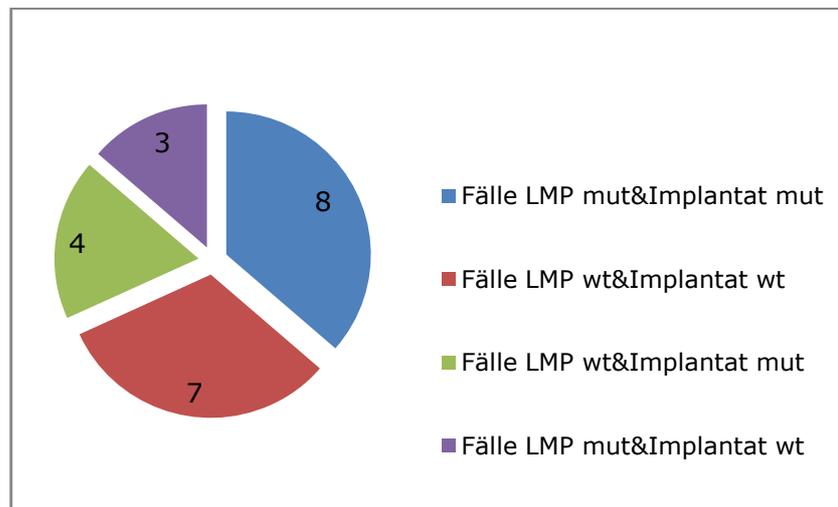


Abb. 4.8: Übersicht über Ergebnis der BRAF-Mutationsanalyse der Gewebeproben von Borderlinetumoren und peritonealen Implantaten

Ergebnisse

Tab. 7: Ergebnisse der BRAF-Mutationsanalysen der einzelnen Patientinnen;
LMP=Borderlinetumor, Wt=Wildtyp

Fallnr.	Art der Probe	Probenzahl	BRAF-Mutation
1	Seröser LMP linkes Ovar	1	Wt
	1 Peritoneales Implantat	1	Wt
2	seröser LMP linkes Ovar	2	1 Wt; 1 GTG->GAG
	seröser LMP rechtes Ovar	2	2 GTG->GAG
	4 peritoneale Implantate	4	3 Wt; 1 GTG->GAG
3	Seröser LMP rechtes Ovar	1	Wt
	2 peritoneale Implantate	2	2 Wt
4	Serös/muzinöser LMP rechtes Ovar	1	Wt
	1 Peritoneales Implantat	1	GTG->GAG
5	Seröser LMP rechtes Ovar	1	GTG->GAG
	2 peritoneale Implantate	2	2 Wt
6	Seröser LMP linkes Ovar	2	2 Wt
	4 peritoneale Implantate	4	4 Wt
7	Seröser LMP linkes Ovar	1	GTG->GAG
	2 peritoneale Implantate	2	2 Wt
8	seröser LMP linkes Ovar	1	GTG->GAG
	seröser LMP rechtes Ovar	1	GTG->GAG
	2 peritoneale Implantate	2	2 Wt
9	seröser LMP rechtes Ovar	2	2Wt
	4 peritoneale Implantate	4	4 Wt
10	seröser LMP linkes Ovar	2	2 Wt
	2 peritoneale Implantate	2	1 Wt; 1 GTG->GAG
11	seröser LMP linkes Ovar	2	1 Wt; 1 GTG->GAG
	2 peritoneale Implantate	2	1 Wt, 1 GTG->GAG
12	seröser LMP linkes Ovar	1	Wt
	3 peritoneale Implantate	3	3 Wt
13	seröser LMP linkes Ovar	1	Wt
	seröser LMP rechtes Ovar	1	Wt
	2 Implantate	2	2 Wt
14	seröser LMP rechtes Ovar	1	GTG->GAG
	2 peritoneale Implantate	2	1 Wt; 1 GTG->GAG
15	7 Implantate	7	7 Wt
16	seröser LMP Ovar	2	2 GTG->GAG
	2 peritoneale Implantate	2	1 Wt; 1 GTG->GAG
17	seröser LMP rechtes Ovar	1	GTG->GAG
	1 peritoneales Implantat	1	GTG->GAG
18	seröser LMP linkes Ovar	1	GTG->GAG
	seröser LMP rechtes Ovar	1	Wt
	2 peritoneale Implantate	2	2 GTG->GAG
19	seröser LMP rechtes Ovar	2	2 GTG->GAG
	seröser LMP linkes Ovar	2	2 GTG->GAG
	3 peritoneale Implantate	3	3 GTG->GAG
20	seröser LMP rechtes Ovar	1	Wt
	2 Implantate	2	2 GTG->GAG
21	seröser LMP linkes Ovar	1	Wt
	1 peritoneales Implantat	1	GTG->GAG
22	seröser LMP rechtes Ovar	2	2Wt
	6 peritoneale Implantate	6	6 Wt
23	seröser LMP linkes Ovar	2	2 Wt
	6 peritoneale Implantate	6	5 Wt; 1 GTG->GAG
24	seröser LMP linkes Ovar	2	2 Wt
	seröser LMP linkes Ovar	2	1 Wt; 1 GTG->GAG
25	seröser LMP rechtes Ovar	2	2 Wt
	19 Implantate	19	17 Wt; 2 GTG->GAG

4.3 Korrelation von KRAS- und BRAF-Mutationen und der Immunhistologie

Laut Literatur schließen sich KRAS- und BRAF-Mutationen gegenseitig aus, was bedeutet, dass eine Gewebeprobe nur eine der beiden Mutationen aufweist.

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 25 Fälle untersucht, wobei sich in 18 Fällen, was 72% entspricht, eine Mutation detektieren ließ.

Eine Mutation im Borderlinetumor zeigte sich in 17 Fällen. Von diesen 17 Fällen schlossen sich die Mutationen von KRAS und BRAF in 14 gegenseitig aus, dies entspricht 82,3%. Lediglich drei Fälle zeigten beide der untersuchten Mutationen im selben Tumor (Fall 17, 19 und 25).

Von den insgesamt 80 untersuchten Implantaten zeigten 32 eine Mutation von KRAS oder BRAF, davon schlossen sich in 28 Implantaten die Mutationen gegenseitig aus, was 87,5% entspricht. Vier der untersuchten Implantate zeigten sowohl eine Mutation von KRAS als auch von BRAF (Fall Nr. 4, 18, 19 und 25) in derselben Probe.

Desweiteren wiesen einige Fälle unterschiedliche Mutationen im ovariellen Borderlinetumor und den zugehörigen Implantaten auf. Dies bedeutet, dass z.B. im Borderlinetumor eine KRAS-Mutation gefunden wurde, die zugehörigen Implantate aber sowohl eine Mutation von KRAS als auch von BRAF aufwiesen. Solche heterogenen Ergebnisse der Mutationsanalysen sind insgesamt in acht Fällen zu beobachten (Fall Nr. 4, 8, 17, 18, 20, 21, 23, 25).

Zur Veranschaulichung der Korrelation von KRAS- und BRAF-Mutation siehe Tabelle 8.

Bezüglich der Korrelation zwischen den Ergebnissen der Mutationsanalysen und der immunohistochemischen Expression von p16 ließen sich folgende Beobachtungen machen: Ein negatives Ergebnis der p16-Immunhistologie vergesellschaftet mit einer Mutation von KRAS oder BRAF fand sich bei den Implantaten in 5 Patientenfällen (Fallnr. 2, 8, 16, 21 und 25). Zwei Borderlinetumoren (Fallnr. 14 und 21) besaßen eine KRAS- oder BRAF-Mutation ohne das sich eine Expression von p16 zeigte. In weiteren neun Patientenfällen zeigte eine der untersuchten Gewebeproben des Borderlinetumors ein negatives Ergebnis der p16-Immunhistologie, jedoch ergab sich hier in keinem dieser Fälle eine Mutation von KRAS oder BRAF. In acht Patientenfällen ergab sich in den extraovariellen Implantaten eine starke bis mäßige Expression von p16 und zudem eine KRAS oder BRAF-Mutation (Fallnr. 4, 9, 11, 18, 19, 20, 23 und 25). Neun Patientenfälle wiesen im Borderlinetumor sowohl eine KRAS- oder BRAF-Mutation als auch eine stark bis mäßige Expression von p16 auf (Fallnr. 5, 7, 9, 11, 17, 18, 19, 22 und 24). Die p53-Immunhistologie ergab in vier Fällen eine p53-Expression des Borderlinetumors (Fallnr. 5, 19, 20 und 24) wobei die Expression nur in einem Fall stark positiv (Fallnr. 24) und in den anderen dreien mäßig positiv mit einem niedrigen Remmelescore. In einem Fall (Fallnr. 4) fand sich eine p53-Expression des Implantats. Von diesen fünf genannten Patientenfällen zeigten vier eine gleichzeitige p53-Expression zusammen mit einer Mutation von KRAS oder BRAF (siehe Tabelle 8).

Tab. 8: Zusammenstellung der gesamten Untersuchungsergebnisse

Fall Nr.	Ovar				Implantate			
	Histologie	KRAS/ BRAF	Immun- histologie p53	Immun- histologie p16	Histologie & Anzahl	KRAS/ BRAF	Immun- histologie p53	Immun- histologie p16
1	serös	wt	negativ	negativ	1 noninvasives	wt	negativ	negativ
2	serös bilateral	BRAF + bds.	negativ	schwach positiv	4 noninvasive	1 BRAF+	negativ	negativ
3	serös	wt	negativ	negativ	2 noninvasive	wt	negativ	mäßig positiv
4	serös & muzinös	KRAS +	negativ	mäßig positiv	1 noninvasives	KRAS/ BRAF+	stark positiv	stark positiv
5	serös	BRAF +	mäßig positiv	stark positiv	2 noninvasive	wt	schwach positiv	schwach positiv
6	serös	wt	negativ	mäßig positiv	4 noninvasive	wt	negativ	schwach positiv
7	serös	BRAF +	negativ	stark positiv	2 noninvasive	wt	schwach positiv	mäßig positiv
8	serös bilateral	BRAF + bds.	schwach positiv	schwach positiv	2 noninvasive	1 KRAS+	negativ	negativ
9	serös	KRAS +	negativ	stark positiv	4 noninvasive	1 KRAS+	negativ	stark positiv
10	serös	wt	schwach positiv	mäßig positiv	/	/	/	/
11	serös	BRAF +	negativ	stark positiv	2 noninvasive	1 BRAF+	negativ	stark positiv
12	serös	wt	schwach positiv	mäßig positiv	3 noninvasive	wt	negativ	stark positiv
13	serös bilateral	wt bds.	schwach positiv	schwach positiv	2 noninvasive	wt	schwach positiv	negativ
14	serös	BRAF +	negativ	negativ	2 noninvasive	1 BRAF+	negativ	mäßig positiv
15	serös	/	/	/	7 noninvasive	wt	schwach positiv	mäßig positiv
16	serös	BRAF +	negativ	schwach positiv	2 noninvasive	1 BRAF+	negativ	negativ
17	serös	KRAS/ BRAF+	negativ	stark positiv	1 noninvasives	BRAF +	schwach positiv	schwach positiv
18	serös bilateral	rechts KRAS +	negativ	mäßig positiv	2 noninvasive	1 KRAS/ BRAF +	negativ	stark positiv
		links BRAF +				1 BRAF+	negativ	mäßig positiv
19	serös bilateral	KRAS/ BRAF+	mäßig positiv	stark positiv	3 noninvasive	1 KRAS/ BRAF +	schwach positiv	stark positiv

Ergebnisse

		bds.				2 BRAF +	negativ	stark positiv
20	serös	wt	mäßig positiv	stark positiv	2 noninvasive	2 BRAF +	negativ	stark positiv
21	serös	KRAS +	schwach positiv	negativ	1 noninvasives	BRAF +	schwach positiv	negativ
22	serös	KRAS +	schwach positiv	mäßig positiv	6 noninvasive	wt	negativ	mäßig positiv
23	serös	KRAS +	negativ	schwach positiv	6 noninvasive	1 BRAF+	negativ	mäßig positiv
						2 KRAS+		
24	serös	KRAS +	stark positiv	stark positiv	/	/	/	/
25	serös bilateral	links KRAS/ BRAF+	negativ	schwach positiv	19 noninvasive	11 KRAS+	negativ	mäßig positiv
		links KRAS +	negativ	schwach positiv		1 BRAF+	negativ	stark positiv
		rechts KRAS +	negativ	schwach positiv		1 KRAS/ BRAF +	negativ	negativ

5 Diskussion

Borderlinetumoren nehmen rein histologisch eine Stellung zwischen den gutartigen Zystadenomen und den Karzinomen ein. Von den Oberflächenepithel-Stromatumoren, welche zwei Drittel der Ovarialtumoren ausmachen, entfallen 15-20% auf Borderlinetumoren (Faluyi 2010).

Bei Ovarialtumoren vom Borderlinetyp zeigt sich eine atypische Proliferation des Epithels im Gegensatz zu gutartigen Tumoren, jedoch ist in keinem Fall eine destruktive Invasion des Stromas nachzuweisen (Prat 2009). Obwohl ovarielle Borderlinetumoren keine Invasivität zeigen, kommen bei 30 bis 40% der Patientinnen sogenannte extraovarielle peritoneale Implantate vor.

Auf welchem Weg diese extraovariellen Implantate entstehen ist nach wie vor nicht genau geklärt. Die Datenlage zu Untersuchungen von ovariellen Borderlinetumoren und zugehörigen extraovariellen Implantaten der gleichen Patientin ist dazu bislang gering. Aus bisherigen Studien ergeben sich vor allem zwei Theorien zur Entstehung der extraovariellen Implantate, zum einen die der „metastasenartigen“, zum anderen die der eigenständigen, vom ovariellen Tumor unabhängigen Entstehung im Peritoneum selbst. Letztere basiert auf der Tatsache, dass das extraovarielle Mesothel des Peritoneums das Potential besitzt epitheliale Läsionen zu generieren (Remmele 1997). Das Auftreten von non-invasiven Implantaten ist insgesamt häufiger als das von Invasiven (Hart 2005). Generell sind extraovarielle Implantate eines Borderlinetumors mit einer erhöhten Rezidivrate, entweder in Form eines erneuten Borderlinetumors oder Karzinoms, und einer geringeren 5-Jahres-Überlebensrate der betroffenen Patientin verbunden (Longacre 2005; Silva 2006). Intention der vorliegenden Arbeit war es eine möglichst große Gruppe von Patientinnen mit ovariellm Borderlinetumor und zugehörigen extraovariellen Implantaten, sowohl immunhistochemisch als auch molekularbiologisch zu analysieren.

Eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 zählt zu den häufigsten genetischen Ereignissen bei Karzinomen des Ovars, und kommt in ca. 50 bis 80% der Fälle vor (Vang 2009). Für ovarielle Borderlinetumoren ist dagegen das Fehlen einer p53-Mutation charakteristisch (Wong 2010; Singer 2005). Der Nachweis einer Mutation von p53 kann mittels Immunhistochemie oder Mutationsanalyse erfolgen. Eine Immunhistochemische Untersuchung ist kostengünstig und automatisiert durchzuführen, die visuelle Auswertung lässt sich rasch erlernen. Die Korrelation beider Nachweismethoden wurde von Chan et al. (Chan 2000) als nicht ausreichend beschrieben, da sich bei 37% der immunhistochemisch p53-positiven Präparate keine Mutation von p53 in der Mutationsanalyse ergab. Umgekehrt betrachtet waren 29% der Präparate welche analytisch eine p53-Mutation zeigten immunhistochemisch negativ. Aus der Arbeit von Vang et al. (Vang 2009) geht hervor, dass obwohl die Korrelation zwischen immunhistochemischer Expression und des Mutationsstatus des Tumorsuppressorgens p53 suboptimal ist, lässt sich anhand der Immunhistochemie eindeutig zwischen den sog. „low-grade“ und „high-grade“ Tumoren des Ovars unterscheiden. Diese Aussage basiert auf der Studie von

O'Neill et al. (O'Neill 2005), in welcher sich in der Immunhistochemie ein signifikanter Unterschied zwischen schlecht und gut differenzierten Ovarialkarzinomen bezüglich des Expressionsverhaltens von p53 ergab. Hierbei zeigten die schlecht differenzierten Tumoren eine wesentlich höhere p53-Expression, als die gut differenzierten. Ähnlich den gut differenzierten Ovarialkarzinomen zeigen Ovarialtumoren vom Borderlinetyp generell selten eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53, was eine einheitliche Entstehungslinie vermuten lässt (Kurman 2010; Singer 2005). In der vorliegenden Arbeit ergab sich erwartungsgemäß für die meisten der untersuchten Borderlinetumoren und deren Implantate keine p53-Mutation. Wenige einzelne Präparate, darunter sowohl Borderlinetumoren als auch extraovarielle Implantate, zeigten jedoch eine stark positive Expression für p53 in der Immunhistochemie. In zwei Patientenfällen sind neben der p53-Mutation eine KRAS-Mutation bei einem Borderlinetumor und eine Mutation von KRAS und BRAF eines peritonealen Implantats zu beobachten (siehe Tabelle 7). Dies könnte auch technische Ursachen haben, laut Vang et al. (Vang 2009) ist die Immunhistochemie alleine nicht ausreichend, um eine Mutation von p53 gesichert zu detektieren. Zur genauen Bestimmung des Status der Mutation dieser Präparate, sollten Mutationsanalysen mittels Sequenzierung erfolgen, dies ist jedoch an unserem Institut nicht etabliert. Es muss hier jedoch auch erwähnt werden, dass Borderlinetumoren zwar selten eine Mutation von p53 aufweisen, so bedeutet dies jedoch nicht, dass p53 im Falle eines Borderlinetumors nie mutiert ist. Die Studie von Giordano et al. (Giordano 2008) zeigte in 2 von 13 immunhistochemisch untersuchten Borderlinetumoren eine Expression von p53, wie in der vorgelegten Arbeit wurden keine weiteren Mutationsanalysen durchgeführt. Chan et al. (Chan 2000) beobachteten in 5 von 27 immunhistochemisch untersuchten Borderlinetumoren die Expression von p53. Ebenso wurde in der Arbeit von Chan et al. die Mutation von p53 bei 19 Borderlinetumoren mittels Sequenzierung analysiert, hier ergab sich in einem Tumor eine p53-Mutation. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung des Tumorsuppressorgens p53 der vorgelegten Arbeit, schließen sich der Aussage an, dass eine p53-Mutation bei ovariellen Borderlinetumoren selten vorkommt (Kurman 2010; Prat 2009).

Desweiteren zählt der Funktionsverlust des Zellzyklusinhibitors p16 zu den häufigsten Ereignissen bei malignen Tumoren des Menschen (Konecny 2011). Die Gynäkopathologie betreffend ist p16 vor allem als Indikator einer HPV-Infektion (Humanes Papillomavirus) vom hoch-Risiko-Typ bekannt (McCluggage 2009). In Bezug auf das Ovar wurde der Marker bislang noch nicht extensiv untersucht, die Studien von O'Neill et al. und Vang et al. (O'Neill 2007; Vang 2009) zeigen eine vermehrte Expression von p16 bei schlecht differenzierten Ovarialkarzinomen. Die durch den Funktionsverlust von p16 herbeigeführte Dysregulation des CDK4-Cyclin D/p16-Rb-Signalwegs ist nach Konecny et al. (Konecny 2011) bei über 40% der Ovarialkarzinome vorhanden, was die Inhibition der CDK4/6 als eine neue vielversprechende Strategie zur Therapie dieser Erkrankung erscheinen

lässt. In Bezug auf bösartige Neubildungen der Gebärmutter und der Zervix, gibt es bereits mehrere Untersuchungen, welche sich mit der immunhistochemischen Expression von p16 beschäftigen. In einer retrospektiven Analyse von Hakverdi et al. (Hakverdi 2011), mit Patientinnen welche entweder die Diagnose eines Leiomyosarkoms, Leiomyoms oder ein unauffälliges Myometrium der Gebärmutter hatten, zeigte sich besonders bei den Leiomyosarkomen eine starke immunhistochemische Expression von p16. Die untersuchten Leiomyome wiesen eine schwache oder fokale p16-Expression, das normale Myometrium keine Expression von p16 auf. Dies lässt die Aussage zu, dass p16 durchaus als ein nützlicher immunhistochemischer Marker gesehen werden kann, der bei der Diagnostik eines bösartigen Tumors hilfreich ist (Hakverdi 2011). Gestützt wird diese Hypothese desweiteren durch Huang et al. (Huang 2011), die in ihrer Arbeit eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von p16 und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen bei bestehendem Zervixkarzinom aufzeigen. Zudem ergab sich bei den Fällen mit starker p16-Expression ein geringeres Überleben als wenn nur eine geringe oder keine Expression von p16 vorhanden war. Der Zellzyklusinhibitor wird demnach als wichtiger prädiktiver Faktor der Lymphknotenmetastasierung und Prognosefaktor bei Patientinnen mit Zervixkarzinom gesehen (Huang 2011).

Bezüglich der Expression von p16 in ovariellen Borderlinetumoren finden sich in der Literatur unterschiedliche Aussagen. Sui et al. (Sui 2000) wiesen in 13 von 23 untersuchten Borderlinetumoren eine Expression p16 nach. Armes et al. (Armes 2005) fanden hingegen in keinem der 10 untersuchten Borderlinetumoren eine Expression von p16. Die Diskrepanz der Ergebnisse bezüglich der p16-Expression in ovariellen Tumoren scheint unter anderem durch den Einsatz von unterschiedlichen Antikörpern in der Immunhistochemie bedingt zu sein (Khouja 2007).

O'Neill et al. (O'Neill 2007) fanden immunhistochemisch in 5 von 18 serösen Borderlinetumoren eine starke Expression von p16, ähnliche Zahlen ergaben sich für die „low-grade“ Ovarialkarzinome. Dagegen ergab sich im Falle der „high-grade“ Ovarialkarzinome eine wesentlich häufigere p16-Expression, was wiederum den Unterschied der zugrunde liegenden Pathogenese von Borderlinetumoren, Ovarialkarzinomen mit niedrigem Differenzierungsgrad und solchen mit hohem Differenzierungsgrad bestätigt. So kann die Immunhistochemie von p16, im Falle der schwierigen Histologie eines Ovarialtumors, bei der Diagnostik hilfreich sein (Vang 2009). Giordano et al. (Giordano 2008) analysierten in ihrer Studie mittels Immunhistochemie insgesamt 73 epitheliale Ovarialtumoren auf eine Expression von p16, von welchen 52 Ovarialkarzinome und 21 Borderlinetumoren waren. Die Einteilung des immunhistochemischen Färbeargebnisses erfolgte nach starker Reaktion und fokaler Reaktion. Eine p16-Expression fand sich demnach in 12 der Borderlinetumoren, was dem Ergebnis der vorgelegten Arbeit in etwa gleicht, die untersuchten Ovarialkarzinome zeigten in deutlich mehr Fällen eine Expression von p16. Bezüglich der p16-Expression in ovariellen Borderlinetumoren ergibt sich in der Studie von Giordano et al. (Giordano 2008) kein Unterschied zu der in

malignen Tumoren, eine starke Expression von p16 war signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

In der vorgelegten Arbeit fand sich in 15 Fällen der 24 untersuchten Borderlinetumoren eine mäßig bis starke Expression von p16. Insgesamt zeigte sich in 41 der 80 untersuchten extraovariellen Implantate eine mäßig bis starke Expression von p16, diese fanden sich in 16 der 23 Patientenfälle mit zugehörigen Implantaten. Die immunhistologischen Ergebnisse von Borderlinetumor und den zugehörigen Implantaten einer Patientin deckten sich in den meisten Fällen, was bedeutet wenn der Tumor eine p16-Expression zeigte fand sich diese ebenfalls in den Implantaten. In einzelnen Fällen kam es jedoch vor, dass zwar ein Implantat eine Expression von p16 aufwies nicht jedoch der Tumor (s. Tab.5 Fallnr. 2, 3, 14, 16, 23 und 25). Das Ergebnis der vorgelegten Arbeit die ovariellen Borderlinetumoren betreffend ist mit der aktuellen Literatur vereinbar. Eine vergleichende Arbeit in welcher ebenfalls extraovarielle Implantate eines Borderlinetumors bezüglich p16 immunhistochemisch untersucht wurden liegt leider nicht vor.

Ein Funktionsverlust von p16 geht mit einem negativen Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung einher (Montebugnoli 2010). In der vorgelegten Arbeit zeigte sich in elf der 25 Patientenfälle eine untersuchte Borderlinetumorprobe mit fehlender p16-Expression, jedoch nur in zwei Fällen konnte eine Mutation von BRAF oder KRAS nachgewiesen werden (s. Tab.8 Fallnr. 14 und 21). 14 der insgesamt 80 untersuchten Implantate zeigten ein negatives immunhistochemisches Ergebnis der Expression von p16. Fünf dieser 14 p16-negativen Implantate besaßen zusätzlich eine Mutation von KRAS oder BRAF. Die Betrachtung des Expressionsverhaltens von p16 und des Mutationsstatus von KRAS und BRAF ist insofern von Bedeutung, da beispielsweise Robinson et al. (Robinson 2010) in ihrer experimentellen Arbeit bei Mäusen welche bereits eine BRAF-Mutation trugen, die Entstehung von Gliomen getriggert durch den Funktionsverlust von p16 nachweisen konnten. Daraus lässt sich vermuten, dass sobald p16 seine Funktion als Zellzyklusinhibitor verliert, eine wesentliche Barriere einbricht welche bis dahin verhindert hat, dass aus einem Borderlinetumor eventuell tatsächlich ein Karzinom entsteht. Es mehren sich zudem die Aussagen in der Literatur, dass zumindest ein Teil der Ovarialkarzinome aus Borderlinetumoren hervorgehen, also eine „Adenom-Borderline-Karzinom-Sequenz“ ähnlich z.B. dem Kolonkarzinom. Die Ergebnisse der Untersuchung von Kriegl et al. (Kriegl 2011) lassen darauf schließen, dass in Polypen und Adenomen des Dickdarmes welche eine BRAF-Mutation und eine verstärkte p16-Expression aufweisen, diese Onkogene als nützlicher Marker für die Induktion der Seneszenz des Entwicklungsweges zum Karzinom dienen. Der Verlust der Expression von p16 geschieht während der malignen Transformation der Zellen und wird durch weitere molekularbiologische Vorgänge bedingt.

In der Literatur wird die Aktivierung der RAS-RAF-Kaskade durch eine Mutation von KRAS oder BRAF, als ein häufiges Ereignis der Tumorentwicklung bei

zahlreichen Neoplasien des Menschen beschrieben (Vakiani 2011). Einige molekulargenetische Untersuchungen zeigen, dass Borderlinetumoren und konventionelle Ovarialkarzinome jeweils einen separaten Weg der Pathogenese besitzen. Ovarielle Borderlinetumoren präsentieren häufig eine Mutation von KRAS oder BRAF, dagegen kommen diese selten in schlecht differenzierten Ovarialkarzinomen vor (Prat 2009). Man unterscheidet deswegen vor allem zwei Wege der ovariellen Tumorgenese, wobei KRAS- und BRAF-Mutationen besonders bei der Entwicklung von Borderlinetumoren und Ovarialkarzinomen mit niedrigem Differenzierungsgrad eine Rolle spielen (Bell DA 2005). Bei zwei Drittel der Borderlinetumoren und der „low-grade“ Ovarialkarzinome ist entweder das Kodon 12 oder 13 des KRAS-Gens, oder das Kodon 600 des BRAF-Gens mutiert (Shih 2005). Zu den Implantaten, welche im Zusammenhang mit ovariellen Borderlinetumoren vorkommen können, gibt es bislang nur wenige molekularbiologische Untersuchungen, wobei vermutlich in erster Linie der Materialmangel aufgrund der geringen Größe und Anzahl dieser Implantate eine maßgebliche Rolle spielt. In der vorgelegten Arbeit war es die Absicht möglichst viele Borderlinetumoren mit vorhandenen peritonealen Implantaten auf die Mutationen von KRAS und BRAF zu analysieren. Von den 25 untersuchten Borderlinetumoren ergab sich in 9 Fällen (36%) eine Mutation von KRAS wovon 6 Fälle KRAS-positive Implantate besaßen. Alvarez et al. (Alvarez 2001) untersuchten 6 Borderlinetumoren mit zugehörigen Müller'schen Inklusionszysten. Von 6 Tumoren zeigten 3 eine KRAS-Mutation, wobei zwei dieselbe Mutation in der zugehörigen Inklusionszyste aufwiesen. In der Studie von Diebold et al. (Diebold 2003) wurden 10 ovarielle Borderlinetumoren anhand mehrerer Gewebeproben desselben Tumors untersucht, bei 6 dieser Tumoren waren extrovarielle Implantate verfügbar. Acht der Borderlinetumoren waren KRAS-positiv, 4 dieser Tumoren zeigten eine identische Mutation in den zugehörigen Implantaten. Mayr et al. (Mayr 2006) analysierten in ihrer Studie neben anderen Karzinomen 18 seröse Borderlinetumoren, davon 5 mit extraovariellen Implantaten. Zusätzlich wurden zwei Fälle in welchen ausschließlich Implantate vorhanden waren mit untersucht. Die Borderlinetumoren zeigten in 4 Fällen (22,22%) eine KRAS-Mutation und in 5 Fällen (31,25%) eine BRAF-Mutation, in keinem der untersuchten Implantate ergab sich eine Mutation. Diebold et al. (Diebold 2003) fanden in einem Fall ein KRAS-positives Implantat ohne das Auftreten der gleichen Mutation im Borderlinetumor. In der vorgelegten Arbeit fand sich in einem Fall (Fallnr.8) ein KRAS-positives Implantat, der ovarielle Borderlinetumor war dagegen KRAS-negativ und zeigte eine BRAF-Mutation in beiden analysierten Gewebeproben (s.Tab.5 und 6).

Eine BRAF-Mutation des Borderlinetumors wurde in der vorgelegten Arbeit in 11 Fällen (44%) detektiert, 8 Fälle zeigten ebenfalls eine Mutation von BRAF in ihren extraovariellen Implantaten. Sieben et al. (Sieben 2004) konnten von 89 untersuchten serösen Borderlinetumoren in 33 Fällen (37%) eine BRAF-Mutation sichern, 26 Fälle (29,21%) zeigten eine KRAS-Mutation. Wong et al. (Wong 2010) detektierten bei einer Gruppe von 30 serösen Borderlinetumoren in 9

Fällen (30%) eine BRAF-Mutation, und eine Mutation von KRAS in 5 Fällen (17%). In ihrer neueren Arbeit untersuchten Sieben et al. (Sieben et al 2006) 10 Fälle mit ovariellen Borderlinetumor und zugehörigen extraovariellen Implantaten, wobei 4 Fälle eine KRAS-Mutation und 2 Fälle eine BRAF-Mutation aufwiesen, die detektierten Mutationen fanden sich sowohl im Tumor als auch den Implantaten. In unserer Arbeit fanden sich in der BRAF-Mutationsanalyse 4 Fälle, welche BRAF-positive Implantate aufwiesen, jedoch keine BRAF-Mutation im Tumor (Fall Nr. 4, 20, 21 und 23). Bei Fall Nr. 4 handelt es sich um einen gemischten Borderlinetumor vom serös-muzinösen Typ welcher KRAS-positiv ist und ein Implantat mit sowohl KRAS- als auch BRAF-Mutation besitzt. In den anderen genannten drei Fällen handelt es sich um ovarielle Borderlinetumoren vom serösen Typ und weisen im Fall Nr. 20 die Wildtypform von KRAS und BRAF auf, Fall Nr. 21 und 23 präsentieren Borderlinetumoren mit KRAS-Mutation. Derart heterogene Ergebnisse finden sich in keiner vorangegangenen Arbeit. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass sich KRAS- und BRAF-Mutationen gegenseitig ausschließen (Stefanius 2010). In der vorgelegten Arbeit schlossen sich die Mutationen bei den analysierten Proben der Borderlinetumoren in 82,3% gegenseitig aus. In drei Fällen (Fall Nr. 17, 19 und 25) kamen beide Mutationen in derselben Gewebeprobe eines Tumors vor. In der Mutationsanalyse der Implantate schlossen sich die Mutationen in 87,5% gegenseitig aus, vier Implantate aus vier Fällen (Fall Nr. 4, 18, 19 und 25) zeigten eine gleichzeitige Mutation von KRAS und BRAF. Die im ovariellen Primärtumor detektierte Mutationsfolge entsprach der Mutationsfolge in den Implantaten. Über das gemeinsame Auftreten der beiden Mutationen berichteten Pollock et al. (Pollock 2002) im Rahmen von Mutationsanalysen an einer großen Reihe von Hautnävi. Hier zeigten drei Proben sowohl eine NRAS- als auch BRAF-Mutation. Desweiteren beschrieben Sieben et al. (Sieben 2004) das überraschende Ergebnis der gemeinsamen KRAS/BRAF-Mutation in zwei Borderlinetumoren als eine mögliche Koexistenz in denselben neoplastischen Zellen, jedoch kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die Mutationen in zwei verschiedenen neoplastischen Klonen des gleichen Tumors präsent waren. In der vorgelegten Arbeit zeigte sich das Vorkommen von KRAS- und BRAF-Mutation in manchen Borderlinetumoren gleichzeitig, nur in einer der Gewebeproben (Fall Nr.19) waren sämtliche Proben des ovariellen Borderlinetumors KRAS/BRAF positiv, was ein zufälliges Ergebnis weniger wahrscheinlich werden lässt. Zudem wiesen doch einige Implantate ebenfalls eine gemeinsame Mutation von KRAS und BRAF auf, wobei die geringe Größe dieser Strukturen und die damit geringe verfügbare Zellzahl, eine Koexistenz von neoplastischen Klonen als wenig wahrscheinlich erscheinen lässt.

Die Mutationen von KRAS und BRAF wurden am Kolonkarzinom ausgiebig untersucht. Man ging bisher davon aus, dass Metastasen eines Tumors mit positivem Mutationsstatus ebenfalls eine Mutation aufweisen. In Studien welche auch Metastasen des Kolonkarzinoms auf diese Mutationen analysierten, wurden Fälle mit einer KRAS- oder BRAF-Mutation des Primärtumors, ohne dass diese in den Metastasen auftraten beschrieben (Giannini 2007; Italiano 2010; Baldus

2010). Eine Ursache für diese Diskonkordanz zwischen Primärtumor und dessen Metastasen kann zum einen eine fehlerhafte Sequenzierung aufgrund eines inkorrekten Standards des Cyclers sein. Zum anderen könnte dieser Umstand für ein Neuauftreten der Mutation während des Metastasierungsvorganges sprechen (Giannini 2007). Baldus et al. (Baldus 2010) untersuchten 100 Kolonkarzinome mit Metastasen. Wenn sich keine Mutation im Primärtumor aber in den Metastasen fand, wurden erneut Schnitte aus anderen Regionen des Primärtumors analysiert. In einigen Tumoren konnte daraufhin eine Mutation nachgewiesen werden, woraus sich die Theorie ergibt, dass die Metastase diesem Tumorareal entstammt und die Mutation während oder durch die Metastasierung entstand. Weiterhin könnte bei der Bildung von Metastasen eine klonale Selektion stattfinden, weshalb sich diese dann in ihrem Mutationsstatus unterscheiden (Baldus 2010). Dies bringt uns zu dem Schluss, dass bei denjenigen Fällen der vorgelegten Arbeit in welchen sich der Mutationsstatus von Borderlinetumor und zugehörigen Implantaten unterscheidet, eine Mutationsanalyse an weiteren Schnitten des ovariellen Primärtumors hilfreich sein könnte.

Nach Betrachtung der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass für die Entstehung der extraovariellen peritonealen Implantate im Zusammenhang mit ovariellen Borderlinetumoren eine Mutation von KRAS oder BRAF nicht obligat ist. Zudem lässt sich keine der Entstehungstheorien zu den Implantaten bestätigen, wobei die Detektion der gleichen Mutation des Borderlinetumors in einigen der zugehörigen extraovariellen Implantate auf eine „metastasenartige“ Natur hinweist. Da sich jedoch keine einheitlichen Ergebnisse darstellen ließen, ist zu vermuten, dass offenbar andere nach wie vor unbekannte genetische Ereignisse eine Rolle spielen, welche die Entstehung von Implantaten initialisieren.

6 Zusammenfassung

Borderlinetumoren des Ovars nehmen rein histomorphologisch eine Stellung zwischen den gutartigen Zystadenomen und den Karzinomen ein. Sie zählen zu den Oberflächenepithel-Stromatumoren des Ovars, welche 90% der bösartigen Ovarialneoplasien in der westlichen Welt und zwei Drittel der Ovarialtumoren überhaupt ausmachen (Prat 2009). Von diesen Oberflächenepithel-Stromatumoren entfallen 15-20% auf ovarielle Borderlinetumoren (Faluyi 2010), welche in etwa einem Drittel der Fälle in beiden Ovarien auftreten, kein invasives Wachstum zeigen und im Vergleich zu den Karzinomen eine wesentlich bessere Prognose besitzen (Prat 2009). Trotz der fehlenden Invasivität kommen bei ca. 30-40% der Patientinnen mit einem ovariellen Borderlinetumor zudem extraovarielle Läsionen in Form von sogenannten Implantaten vor, welche in 83-96% der Fälle histologisch vom non-invasiven Typ sind (Hart 2005). Das Vorhandensein von extraovariellen Implantaten wirkt sich auf das Tumorstadium und auch auf die Prognose einer Patientin aus. Im Zusammenhang mit Implantaten sind Rezidive in Form von Karzinomen oder erneuten Borderlinetumoren des Ovars möglich (Silva 2006). Der genaue Entstehungsweg der Implantate ist unklar. Es existiert zum einen die Theorie der „metastasenartigen“ Entstehung, nach welcher die Implantate kleine Tochtergeschwülste des Borderlinetumors sind (Sieben 2006; Moore 2000). Zum anderen gibt es die Theorie der multifokalen Genese der Implantate im Peritoneum, wonach diese eher unabhängige Herde einer primären peritonealen Neoplasie sind (Gu 2001; Smith Shedev 2003). Ebenso wird jedoch eine Koexistenz der beiden oben genannten Entstehungswege nicht ausgeschlossen (Diebold 2003).

Für Borderlinetumoren des Ovars ist das Fehlen der, für das klassische Ovarialkarzinom typischen, Mutation des p53 Tumorsuppressorgens charakteristisch (Wong 2010; Prat 2009). Desweiteren zeichnen sich ovarielle Tumoren vom Borderlinetyp durch das häufige Vorkommen der Mutationen von KRAS und BRAF aus (Kurman 2010). Die Aussagen zum Verhalten von p16, dessen Funktionsverlust und die damit einhergehende Dysregulation des Zellzyklus zu den häufigsten Ereignissen bei bösartigen Tumoren zählt (Konecny 2011), sind ovarielle Borderlinetumoren betreffend relativ unterschiedlich. Eindeutig ist jedoch, dass bei einer immunhistochemische Untersuchung von p16 in malignen Ovarialtumoren häufiger eine Expression von p16 nachzuweisen ist, als in Borderlinetumoren (Vang 2009). Die Datenlage zu molekularbiologischen Untersuchungen an ovariellen Borderlinetumoren und zugehörigen extraovariellen Implantaten ist bislang eher gering, was maßgeblich durch den Materialmangel aufgrund der meist geringen Größe der Implantate bedingt ist. Ziel der Arbeit war es an einem größeren Kollektiv KRAS- und BRAF-Mutationsanalysen jeweils am ovariellen Borderlinetumor und den zugehörigen extraovariellen Implantaten durchzuführen und desweiteren das Expressionsverhalten der Tumorsuppressorgene p53 und p16 zu untersuchen. Hierzu wurden 124 Gewebeproben von insgesamt 25 Patientinnen untersucht,

von welchen 22 Patientinnen einen ovariellen Borderlinetumor und zugehörige Implantate besaßen. In zwei Fällen lag nur ein ovarieller Borderlinetumor ohne Implantate vor, ein Fall wies zahlreiche Implantate jedoch keinen ovariellen Primärtumor auf. Die Implantate waren in allen Fällen vom non-invasiven Typ. Zunächst wurden die immunhistochemischen Untersuchungen zur Frage einer p53- und p16-Expression an neuangefertigten Schnittpräparaten der Gewebeproben durchgeführt. Anschließend erfolgte an ebenfalls neuen Schnittpräparaten die Mikrodissektion der Tumor- und Implantatzellen zur Extraktion der DNA, welche nach abgelaufener PCR mittels der Technik der Pyrosequenzierung diagnostisch auf eine Mutation von KRAS und BRAF untersucht wurde. Eine Expression von p53 ließ sich nur bei vier Patientenfällen in einer der untersuchten Gewebeproben des Borderlinetumors nachweisen, wobei einer dieser Fälle eine Mutation von BRAF, ein Fall eine Mutation von KRAS und ein Fall mit bilateralem Borderlinetumor auf jeder Seite sowohl eine Mutation von KRAS als auch BRAF in der gleichen Probe zeigte. Im Falle der Implantate fand sich in sechs Patientenfällen eine p53-Expression, nur in einem Fall zeigte ein Implantat eine gleichzeitige KRAS- und BRAF-Mutation. In mehr Fällen konnte eine p16-Expression nachgewiesen werden: in 15 Fällen wies der Borderlinetumor und in 16 Fällen die Implantate eine stark bis mäßige Expression von p16 auf. Eine fehlende p16-Expression wurde bei 11 Patientenfällen in zumindest einer Borderlinetumor-Gewebeprobe beobachtet, drei dieser Fälle zeigten eine Mutation von BRAF und zwei eine Mutation von KRAS. Insgesamt waren 14 der untersuchten Implantate p16 negativ, diese Implantate fanden sich in 10 Patientenfällen. Bei drei der p16-negativen Implantate wurde zusätzlich eine BRAF-Mutation detektiert, ein Implantat besaß eine KRAS-Mutation und eines der Implantate zeigte eine gleichzeitige Mutation von KRAS und BRAF. Die KRAS-Mutationsanalysen ergaben von den 22 Fällen mit ovariellm Borderlinetumor und zugehörigen Implantaten in sechs Fällen eine KRAS-Mutation, von gleicher Mutationsfolge, im Tumor und den Implantaten, in drei Fällen fand sich zwar im Borderlinetumor eine KRAS-Mutation, nicht jedoch in den Implantaten. Ein Fall zeigte eine KRAS-Mutation im Implantat aber nicht im Tumor. Bei 12 Fällen war weder beim Tumor noch den Implantaten eine KRAS-Mutation nachzuweisen. Bezüglich der BRAF-Mutationsanalysen ergab sich von den 22 Fällen mit Borderlinetumor und Implantaten in acht Fällen eine Mutation von BRAF im Tumor und den Implantaten. Vier Fälle zeigten eine BRAF-Mutation in den Implantaten, nicht jedoch im Tumor und drei Fälle wiesen die BRAF-Mutation im Borderlinetumor aber nicht in den Implantaten auf. In 18 der 25 untersuchten Fälle wurde eine Mutation entweder im ovariellen Tumor, oder den Implantaten detektiert. Bei den Borderlinetumoren schlossen sich die Mutationen von KRAS und BRAF in 82,3% der Fälle gegenseitig aus, drei Patientenfälle zeigten die Mutation in derselben Tumorprobe. Bei den Implantaten schlossen sich die beiden Mutationen in 87,5% der Fälle gegenseitig aus, vier Implantate wiesen sowohl eine Mutation von KRAS als auch BRAF auf.

Aus den genannten Ergebnissen geht wie in vorangegangenen Studien hervor, dass bei Borderlinetumoren in der Regel keine Mutation des p53-

Tumorsuppressorgens zu beobachten ist. Im Falle von p16 fiel auf, dass bei Vorliegen einer KRAS- oder BRAF-Mutation, gleichzeitig eine mäßig bis starke p16-Expression im Tumor nachzuweisen ist. In den Patientenfällen in welchen die Mutationsanalysen von KRAS oder BRAF Wildtyp ergaben, fiel die p16 Immunhistologie negativ bis schwach aus. Dies lässt den Schluss zu, dass p16 vor allem bei einer bereits vorliegenden Mutation als wichtige Barriere vor der malignen Transformation fungiert. Die Detektion der gleichen Mutation des Borderlinetumors in einigen der zugehörigen Implantate weist zumindest teilweise auf eine „metastasenartige“ Entstehung dieser extraovariellen Läsionen hin. Unter dem Gesichtspunkt, dass Metastasen einzelnen Regionen des Primärtumors entstammen, wären weitere Mutationsanalysen an Gewebeproben aus anderen Regionen bei denjenigen Borderlinetumoren welche eine andere oder keine Mutation im Gegensatz zu den Implantaten aufweisen, aufschlussreich. Das Vorkommen einer Mutation von KRAS oder BRAF ist zwar durchaus typisch für Borderlinetumoren, jedoch für deren Entstehung offensichtlich nicht obligat. Es spielen hierbei offenbar andere unbekannte genetische Ereignisse eine Rolle.

7 Literaturverzeichnis

1. **Alvarez AA., Moore WF., Robboy SJ., Bentley RC., Gumbs C., Futreal A., and Berchuck A. 2001.** KRAS Mutations in Müllerian Inclusion Cysts Associated with Serous Borderline Tumors of the Ovary. *Gynecologic Oncology*. 2001, 80; 201-206.
2. **Armes JE., Lourie R., de Silva M., Stamaratis G., Boyd A., Kumar B., Price G., Hyde S., Allen D., Grant P., and Venter DJ. 2005.** Abnormalities of the RB1 Pathway in Ovarian Serous Papillary Carcinoma as Determined by Overexpression of the p16(INK4A) Protein. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2005, 24:363–368.
3. **Baldus SE., Schaefer KL., Engers R. et al. 2010.** Prevalence and Heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA Mutations in Primary Colorectal Adenocarcinomas and Their Corresponding Metastases. *Clinical Cancer Research*. 2010, 16:790-799.
4. **Bell DA. 2005.** Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Modern Pathology*. 2005, 18, S19-S32.
5. **Bell DA. Weinstock MA. Scully RE. 1988.** Peritoneal Implants of Ovarian Serous Borderline Tumors, Histologic features and prognosis. *Cancer*. 1988, 62:2212-2222.
6. **Bell KA., Smith Sehdev AE., Kurman RJ., 2001.** Refined Diagnostic Criteria for Implants Associated With Ovarian Atypical Proliferative Serous Tumors (Borderline) and Micropapillary Serous Carcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2001, 25(4): 419–432.
7. **Biscotti CV., Hart WR. 1992.** Peritoneal serous papillomatosis of low malignant potential (serous borderline tumors of the peritoneum). A clinicopathologic study of 17 cases. *The American Journal of Surgical Pathology*. 1992, 16(5): 467-475.
8. **Brose MS., Volpe P., Feldman M. et al. 2002.** BRAF and RAS Mutations in Human Lung Cancer and Melanoma. *Cancer Research*. 2002, 62: 6997-7000.
9. **Chan WY., Cheung KK., Schorge JO., Huang LW., Welch WR., Bell DA., Berkowitz RS., and Mok SC. 2000.** Bcl-2 and p53 Protein Expression, Apoptosis, and p53 Mutation in Human Epithelial Ovarian Cancers. *American Journal of Pathology*. 2000, February No. 2; 156: 409-417.
10. **Chang F., Syrjänen S., Syrjänen K. 1995.** Implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene in Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*. 1995, Vol 13, No 4 (April) : pp 1009-1022.
11. **Coumbos A., Sehouli J., Chekerov R., Schaedel D., Oskay-Oezcelik G., Lichtenegger W., and Kuehn W. 2009.** Clinical Management of borderline tumours of the ovary: results of a multicentre survey of 323 clinics in Germany. *British Journal of Cancer*. 2009, 100, 1731-1738.
12. **Davies H., et al. 2002.** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002, Vol. 417; 27 June 2002.

13. **Dehari R. Kurman RJ. Logani S. Shih IM. 2007.** The Development of High-grade Serous Carcinoma From Atypical Proliferative (Borderline) Serous Tumors and Low-grade Micropapillary Serous Carcinoma, A Morphologic and Molecular Genetic Analysis. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2007, 31:1007–1012.
14. **Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2007.** Krebshäufigkeit - Die aktuellen Zahlen. 2007.
15. **Diebold J. 1998.** Molekulargenetik der epithelialen Ovarialneoplasien: Korrelation zum Phänotyp und biologischen Verhalten. *Pathologe*. 1998, 2.98, 19:95–103.
16. **Diebold J., Seemüller F., Löhrs U., 2003.** K-RAS Mutations in ovarian and extraovarian lesions of serous tumors of borderline malignancy. *Laboratory Investigation*. 2003, Vol. 83, No. 2, p. 251.
17. **Barnhill DR. O´Connor DM. 1991.** Management of ovarian neoplasms of low malignant potential. *Oncology (Williston Park)*. 1991, Apr. 5 (4) : 21-6.
18. **Elishaev E., Gilks C.B., Miller D., Srodon M., Kurman RJ., and Ronnett BM., 2005.** Synchronous and Metachronous Endocervical and Ovarian Neoplasms; Evidence Supporting Interpretation of the Ovarian Neoplasms as Metastatic Endocervical Adenocarcinomas Simulating Primary Ovarian Surface Epithelial Neoplasms. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2005, 29:281–294.
19. **Faluyi et al. 2010.** *Interventions for the treatment of borderline ovarian tumors*. s.l. : The Cochrane Collaboration, The Cochrane Library, 2010. Vol. Issue 9.
20. **Gemignani and Schlaerth. 2003.** Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinomas. *Gynecologic Oncology*. 2003, 90; 378-381.
21. **Gershenson DM., Silva EG., Levy L., Burke TW., Wolf JK., Tornos C., 1998.** Ovarian Serous Borderline Tumors with Invasive Peritoneal Implants. *Cancer*. 1998, 82:1096–103.
22. **Gershenson DM., Silva EG., Tortolero-Luna G., Levenback C., Morris M., Tornos C., 1998.** Serous Borderline Tumors of the Ovary with Noninvasive Peritoneal Implants. *Cancer*. 1998, 83:2157–63.
23. **Giannini R., Ugolini C., Lupi C., et al. 2007.** The Heterogeneous Distribution of BRAF Mutation Supports the Independent Clonal Origin of Distinct Tumor Foci in Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007, 92(9):3511–3516.
24. **Giordano G., Azzoni C., D´Adda T., Rocco A., Gnetti L., Froio E., Merisio C., Melpignano M., 2008.** Human papilloma virus (HPV) status, p16INK4a, and p53 overexpression in epithelial malignant and borderline ovarian neoplasms. *Pathology – Research and Practice*. 2008, 204: 163–174.
25. **Gu J., Roth LM., Younger C., Michael H., Abdul-Karim FW., Zhang S., Ulbright TM., Eble JN., Cheng L., 2001.** Molecular Evidence for the Independent Origin of Extra-ovarian Papillary Serous Tumors of Low Malignant Potential. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001, Vol. 93, No. 15, August 1.

26. **Hakverdi S, Güngören S, Yaldiz M, Hakverdi AU, Toprak S., 2011.** Immunohistochemical analysis of p16 overexpression in uterine smooth muscle tumors. *European journal of gynecological oncology*. 2011, 32(5):513-5.
27. **Hart WR. 2005.** Borderline epithelial tumors of the ovary. *Modern Pathology*. 2005, 18, S33-S50.
28. **Ho C-L, Kurman RJ, Dehari R, Wang T-L, Shih I-M. 2004.** Mutations of BRAF and KRAS Precede the Development of Ovarian Serous Borderline Tumours. *Cancer Research*. 2004, 64, 6915-6918, October 1.
29. **Huang LW., Lee CC., 2011.** P16 INK4A overexpression predicts lymphnode metastasis in cervical carcinomas. *Journal of Clinical Pathology*. 2011, Oct 19[Epub ahead of print].
30. **Interdisziplinäre S2k-Leitlinie. 2007.** *Interdisziplinäre Leitlinie der deutschen Krebsgesellschaft e.V. und der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe*. s.l. : AWMF, 2007.
31. **International Union Against Cancer (UICC). 2009.** *TNM Classification of Malignant Tumours*. s.l. : Wiley-Liss, New York, 2009. Vol. 7th Edition.
32. **Italiano A., Hostein I., Soubeyran I., Fabas T., et al. 2010.** KRAS and BRAF Mutational Status in Primary Colorectal Tumors and Related Metastatic Sites: Biological and Clinical Implications. *Annals of Surgical Oncology*. 2010, 17:1429-1434.
33. **James V. Lacey Jr., Mark E. Sherman., 2009.** Ovarian neoplasia: epidemiology and etiology. [book auth.] Stanley J. Robboy, et al. *Robboy´s - Pathology of The Female Reproductive Tract*. s.l. : Churchill Livingstone; Elsevier, 2009, Vol. 2nd Edition.
34. **Kane A. Uzan C. Rey A. Gouy S. Camatte S. Pautier P. LHommé C. Haie-Meder C. Duvillard P. Morice P. 2009.** Prognostic Factors in Patients with Ovarian Serous Low Malignant Potential (Borderline) Tumors with Peritoneal Implants. *The Oncologist; Gynecologic Oncology*. 2009, 14:591-600.
35. **Kennedy AW., Hart WR., 1996.** Ovarian Papillary Serous Tumors of Low Malignant Potential (Serous Borderline Tumors); A Long Term Follow-Up Study, Including Patients with Microinvasion, Lymph Node Metastasis, and Transformation to Invasive Serous Carcinoma. *Cancer*. 1996, 78:278-86.
36. **Khouja MH., Baekelandt M., Nesland JM. and Holm R., 2007.** The Clinical Importance of Ki-67, p16, p14, and p57 Expression in Patients With Advanced Ovarian Carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2007, 26: 418-425.
37. **Klemi PJ., Takahashi S., Joensuu H., Kiilholma P., Narimatsu E., and Mori M., 1994.** Immunohistochemical Detection of p53 Protein in Borderline and Malignant Serous Ovarian Tumors. *International Journal of Gynecological Pathologists*. 1994, 13:228-233.

38. **Konecny GE., Winterhoff B., Kolarova T.,. 2011.** Expression of p16 and Retinoblastoma Determines Response to CDK 4/6 Inhibition in Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011, Published OnlineFirst January 28.
39. **Kriegl L, Neumann J, Vieth M, Greten FR, Reu S, Jung A, Kirchner T.,. 2011.** Up and down regulation of p16(Ink4a) expression in BRAF-mutated polyps/adenomas indicates a senescence barrier in the serrated route to colon cancer. *Modern Pathology*. 2011, Jul; 24(7):1015-22
doi:10.1038/modpathol.2011.43.
40. **Krishnamurti U., Sasatomi E., Swalsky PA., Jones MW., Finkelstein SD.,. 2004.** Microdissection-Based Mutational Genotyping of Serous Borderline Tumors of the Ovary. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2004, No. 1, January; Vol. 24: 56-61.
41. **Kurman et al. 2010.** The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer: A Proposed Unifying Theory. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2010, 34:433-443.
42. **Kurman RJ. Seidman J. Shih IM. 2005.** Serous borderline tumours of the ovary. *Histopathology*. 2005, 47, 310–318.
43. **Kurman RJ., and Shih IM.,. 2008.** Pathogenesis of Ovarian Cancer. Lessons from Morphology and Molecular Biology and their Clinical Implications. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2008, April; 27(2): 151-160.
44. **Liggett WH., and Sidransky D. 1998.** Role of the p16 Tumor Suppressor Gene in Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1998, Vol 16, No 3 (March): pp 1197-1206.
45. **Löffler. Petrides. 2003.** *Biochemie & Pathobiochemie*. s.l. : Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2003. Vol. 7.Auflage.
46. **Longacre TA, McKenney JK, Tazelaar HD, Kempson RL and Hendrickson MR.,. 2005.** Ovarian Serous Tumors of Low Malignant Potential (Borderline Tumors); Outcome-Based Study of 276 Patients With Long-Term (>5 Year) Follow-Up. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2005, 29:707–723.
47. **Lu KH., Bell DA., Welch WR. et al.,. 1998.** Evidence for the Multifocal Origin of Bilateral and Advanced Human Serous Borderline Ovarian Tumors. *Cancer Research*. 1998, 1998;58:2328-2330.
48. **Mayr D., Hirschmann A., Löhrs U., Diebold J. 2006.** KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: A comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecologic Oncology*. 2006, 103 (2006) 883–887.
49. **Mayr D., Pannekamp U., Baretton GB., Gropp M., Meier W., Flens MJ., Scheper R., and Diebold J. 2000.** Immunohistochemical Analysis of Drug Resistance Associated Proteins in Ovarian Carcinomas. *Pathology - Research and Practice*. 2000, 196: 469-475.
50. **McCluggage WG. 2009.** Immunohistochemical and Functional Biomarkers of Value in Female Genital Tract Lesions. [book auth.] Mutter G., Prat J., Bentley

RC., Russel P., Anderson M., (Hrsg.) Robboy SJ. *Robboy's - Pathology of the Female Reproductive Tract*. s.l. : Churchill Livingstone; Elsevier, 2009, Vol. 2nd Edition.

51. **Mok SCH, Bell DA, Knapp RC, Fishbaugh PM, Welch WR, Muto MG, Berkowitz RS, Tsao S. 1993.** Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy. *Cancer Research*. 1993, 53:1489-1492.
52. **Montebugnoli L., Cervellati F., Cocchi R., Farnedi A., Pennesi MG., Flammino F. and Foschini MP. 2010.** Immunohistochemical expression of p16/INK4A protein as a helpful marker of a subset of potentially malignant oral epithelial lesions: study on a series with long-term follow up. *Histopathology*. 2010, 57: 528-534.
53. **Moore WF., Bentley RC., Berchuck A., and Stanley JR. 2000.** Some Müllerian Inclusion Cysts in Lymph Nodes May sometimes Be Metastases From Serous Borderline Tumors of the Ovary. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2000, 24(5): 710-718.
54. **Nakayama N., Nakayama K., Yeasmin S., Ishibashi M., Katagiri A., Iida K., Fukumoto M. and Miyazaki K. 2008.** KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 2008, 99 (12), 2020-2028.
55. **O' Neill CJ., and McCluggage WG. 2006.** p16 Expression in the Female Genital Tract and Its Value in Diagnosis. *Advances in Anatomic Pathology*. 2006, January ,Volume 13, Number 1, 13:8-15.
56. **O' Neill CJ., Deavers MT., Malpica A., et al. 2005.** An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB1, BCL2, HER-2/neu, and C-KIT in high-grade neoplasms. *American Journal of Surgical Pathology*. 2005, 29:1034-1041.
57. **O' Neill CJ., McBride HA., Connolly LE., Deavers MT., Malpica A., and McCluggage WG. 2007.** High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour. *Histopathology*. 2007, 50: 773-779.
58. **Paik JH., Jeon YK., Park SS., Kim YA., Kim JE., Huh J., Lee S-S., Kim WH and Kim CW. 2005.** Expression and prognostic implications of cell cycle regulatory molecules, p16, p21, p27, p14 and p53 in germinal centre and non-germinal centre B-like diffuse large B-cell lymphomas. *Histopathology*. 2005, 47, 281-291.
59. **Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B., Karandikar M., Berman K. and Cobb MH. 2001.** Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*. 2001, 22(2): 153-183.
60. **Pollock PM., Harper UL., Hansen KS. et al. 2002.** High frequency of BRAF mutations in nevi. 2002, 33: 19-20.

61. **Prat J. 2009.** Ovarian serous and mucinous epithelial-stromal tumors. [book auth.] Stanley J. Robboy, et al. *Robboy's - Pathology of the female reproductive tract.* s.l. : Churchill Livingstone; Elsevier, 2009, Vol. 2nd Edition.
62. **Prat J. 1999.** Ovarian tumors of borderline malignancy. *Advances in Anatomic Pathology.* 1999, Vol.6, No.5, pp.247-274.
63. **Prat J., DeNictolis M. 2002.** Serous borderline tumors of the ovary: a long-term follow-up study of 137 cases, including 18 with a micropapillary pattern and 20 with microinvasion. *The American Journal of surgical Pathology.* 2002, September; 26(9):1111-28.
64. **Remmele W and Stegner H.E. 1987.** Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe.* 1987, 8 (3) : 138-40.
65. **Remmele W. (Hrsg.), Bässler R., Böcker W., Dallenbach-Hellweg G., Dietel M., Harms D. Klöppel G., Müntefering H., Poldleck J., Saeger W., Schmid K. W., Schmidt D., Vogel M. 1997.** *Pathologie Bd. 4. Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen; Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen; Tumoren des Kindesalters; Endokrine Organe (S. 90-123).* s.l. : 2., neubearbeitete Auflage, 1997. Vols. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
66. **Riede U-N., Werner M., Schaefer H-E., (Hrsg.). 2004.** *Allgemeine und spezielle Pathologie.* s.l. : Georg Thieme Verlag; Stuttgart, 2004. Vols. 5., komplett überarbeitete Auflage.
67. **Robert Koch Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin. 2010.** Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. 2010, 7. überarbeitete Ausgabe.
68. **Robinson JP, VanBrocklin MW, Guilbeault AR, Signorelli DL, Brandner S, Holmen SL. 2010.** Activated BRAF induces gliomas in mice when combined with Ink4A/Arf loss or Akt activation. *Oncogene.* 2010, Jan 21, 29(3):335-44.
69. **Rocco JW., and Sidransky D.,. 2001.** p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in Cancer Progression. *Experimental Cell Research.* 2001, 264, 42-55.
70. **Russel SE., McCluggage WG. 2004.** A multistep model for ovarian tumorigenesis: the value of mutation analysis in the KRAS and BRAF genes. *The Journal of Pathology.* 2004, Juny; 203(2):617-9.
71. **Segal GH., and Hart WR. 1992.** Ovarian serous tumors of low malignant potential (serous borderline tumors). The relationship of exophytic surface tumor to peritoneal "implants". *The American Journal of surgical Pathology.* 1992, Juni: 16(6):577-83.
72. **Seidman JD., and Kurman RJ. 1996.** Subclassification of Serous Borderline Tumors of the Ovary into Benign Malignant Types: A Clinicopathologic Study of 65 Advanced Stage Cases. *The American Journal of Surgical Pathology.* 1996, November ;20(11):1331-45.

73. **Seidman JD., Kurman RJ. 2000.** Ovarian serous borderline tumors: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators. *Human Pathology*. 2000, 31: 539-557.
74. **Shih IM., Kurman RJ. 2005.** Molecular Pathogenesis of Ovarian Borderline Tumors: New Insights and Old Challenges. *Human Cancer Biology*. 2005, 2005; 11(20) October 15,.
75. **Sieben NL., Macropoulos P., Roemen G., Kolkman-Uljee SM., Fleuren GJ., Houmadi R., Diss T., Warren B., Adnani MA., de Goeji A., Krausz T. et al. 2004.** In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low- grade serous tumors. *Journal of Pathology*. 2004, J Pathol 2004; 202: 336–340.
76. **Sieben NL., Roemen GMJM, Oosting J, Fleuren GJ, Engeland M van, Prat J. 2006.** Clonal analysis favours a monoclonal origin for serous for serous borderlinetumors with peritoneal implants. *Journal of Pathology*. 2006, J Pathol 2006; 210: 405–411.
77. **Sieben NL., Sandra M., Kolkman-Uljee SM. 2003.** Molecular genetic evidence for monoclonal origin of bilateral ovarian serous borderline tumors. *American Journal of pathology*. 2003, April, Vol. 162, No.4.
78. **Silva EG., Gershenson DM., Malpica A., Deavers M. 2006.** The Recurrence and the Overall Survival Rates of Ovarian Serous Borderline Neoplasms With Noninvasive Implants is Time Dependent. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2006, 30:1367-1371.
79. **Singer G., Kurman RJ, Chang HW, Cho SK, Shih IM. 2002.** Diverse Tumorigenic Pathways in Ovarian Serous Carcinoma. *American Journal of Pathology*. 2002, Vol. 160, No. 4, April 2002.
80. **Singer G., Oldt R., Cohen Y., Wang BG., Sidransky D., Kurman RJ., Shih IM. 2003.** Mutation in BRAF and KRAS characterize the Development of Low-Grade Ovarian Serous Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003, Vol. 95, No 6, March 19, 2003.
81. **Singer G., Stöhr R., Cope L., Dehari R., Hartmann A., Cao DF., Wang TL., Kurman RJ., Shih IM. 2005.** Patterns of p53 Mutations Separate Ovarian Serous Borderline Tumors and Low- and High-grade Carcinomas and Provide Support for a New Model of Ovarian Carcinogenesis; A mutational analysis with immunohistochemical Correlation. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2005, 29: 218-224.
82. **Smith Sehdev AE., Sehdev PS., and Kurman RJ. 2003.** Noninvasive and Invasive Micropapillary (Low-Grade) Serous Carcinoma of the Ovary; A Clinicopathologic Analysis of 135 Cases. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2003, 27(6): 725–736.
83. **Stefanius K., et al. 2010.** Frequent mutations of KRAS in addition to BRAF in colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2010, 58, 679-692.

84. **Sui L., Dong Y., Ohno M., Goto M., Inohara T., Sugimoto K., Tai Y., Hando T., and Tokuda M. 2000.** Inverse Expression of Cdk4 and p16 in Epithelial Ovarian Tumors. 2000, 79: 230-237.
85. **Tavassoli F.A., Devilee P., (Hrsg). 2003.** *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.* s.l. : IARC Press, Lyon, 2003.
86. **Ueda M., Toji E., Nunobiki O., Izuma S., Okamoto Y., Torii K. and Noda S. 2008.** Mutational analysis of the BRAF gene in human tumor cells. *Human Cell.* 2008, 21: 13-17.
87. **Uzan C., Kane A., Rey A., Gouy S., Pautier P., Lhommé C., Duvillard P., and Morice P. 2010.** How to follow up advance-stage borderline tumours? Mode of diagnosis of recurrence in a large series stage II-III serous borderline tumours of the ovary. *Annals of Oncology.* 2010, August 16, 2010.
88. **Vakiani E. and Solit DB. 2011.** KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *Journal of Pathology.* 2011, 223: 219-229.
89. **Vang R., Gown AM., Farinola M., Barry TS., Wheeler DT., Yemelyanova A., Seidman JD., Judson K., and Ronnett BM. 2007.** p16 Expression in Primary Ovarian Mucinous and Endometrioid Tumors and Metastatic Adenocarcinomas in the Ovary; Utility for Identification of Metastatic HPV-Related Endocervical Adenocarcinomas. *The American Journal of surgical Pathology.* 2007, May, Volume 31, Number 5, 31: 653-663.
90. **Vang R., Shih IM, Kurman RJ. 2009.** Ovarian Low-grade and High-grade Serous Carcinoma; Pathogenesis, Clinicopathologic and Molecular Biologic Features and Diagnostic Problems. *Advances in Anatomic Pathology.* 2009, 16:267-282.
91. **Wong KK., Tsang YTM., Deavers MT., Mok SC., Zu Z., Sun C., Malpica A., Wolfk JK., Lu KH., and Gershenson DM. 2010.** BRAF Mutation is rare in Advanced-Stage Low-Grade Ovarian Serous Carcinomas. *American Journal of Pathology.* 2010, October No. 4 ; 177: 1611-1617.
92. **Yachida S., Mudali S., Martin SA., Montgomery EA., and Iacobuzio-Donahue CA. 2009.** Beta-Catenin Nuclear Labeling is a Common Feature of Sessile Serrated Adenomas and correlates with Early Neoplastic Progression Following BRAF Activation. *American Journal of Surgical Pathology.* 2009, 33 (12): 1823-1832.
93. **Zanotti KM., Hart WR., Kennedy AW., Belinson JL., and Casey G. 1999.** Allelic imbalance on chromosome 17p13 in borderline (low malignant potential) epithelial ovarian tumors. *International Journal of Gynecological Pathology.* 1999, 18: 247-253.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katinka Jutta Luise Grasse
Geburtsdatum: 30.04.1985
Geburtsort: Neumarkt i.d.Opf.
Familienstand: ledig

Schulbildung

1991-1995 Grundschule in Pilsach
1995-2004 Europäisch-Ungarisches-Gymnasium in Kastl

Schulabschluss Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

Oktober 2004 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
19.09.2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19.10.2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit 01.02.2011 tätig als Assistenzärztin in der Abteilung Anästhesiologie & Intensivmedizin des Klinikums Neumarkt i.d.Opf.

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med T. Kirchner für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Institutsleitung durchzuführen.

Bei Frau PD Dr. med D. Mayr bedanke ich mich für die zuverlässige Betreuung dieser Doktorarbeit, ihre Anregungen sowie stetige Hilfsbereitschaft bei jeglichen Fragen und Problemen.

Ich danke Frau Jutta Hügl-Tegge und Frau Gabriele Charell für die Unterstützung im praktischen Teil der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung vor und während meines Studiums, meinem Bruder für die Hilfestellung bei computertechnischen Problemen und Martin, der an mir und meiner Arbeit nie einen Zweifel aufkommen ließ.