

Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**Immunhistochemische Analyse der Expression von K-Ras,
B-Raf und GPER in Borderlinetumoren des Ovars**

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

vorgelegt von
Alena Siegfried
aus Erlangen

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Doris Mayr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Stemmler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Beyhan Ataseven

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

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2016

1. Einleitung	5
1.1. Borderlinetumoren des Ovars.....	5
1.1.1. Epidemiologie und Definition	5
1.1.2. Klassifikation entsprechend WHO-Richtlinien, histologischen Kriterien und Nachweis von Mikroinvasionen, sowie Lymphknotenbeteiligung und Auftreten von Implantaten	6
1.1.2.1. WHO-Klassifikation	6
1.1.2.2. Histologische Kriterien und Nachweis von Mikroinvasionen.....	8
1.1.2.3. Lymphknotenbeteiligung und Auftreten von Implantaten	10
1.1.3. Pathogenese	11
1.1.4. Risikofaktoren.....	13
1.1.5. Klinik	14
1.1.6. Therapie.....	15
1.2. Der MAP-Kinase Signalweg.....	17
1.2.1. Mutationen im MAP-Kinase Signalweg	19
1.2.2. Ras.....	19
1.2.2.1 Aufbau und Varianten	19
1.2.2.2. Physiologisches Ras-Signaling.....	20
1.2.2.3. Mutationen in Ras	21
1.2.2.4. Ras wirkt kontextabhängig	21
1.2.3. Raf	21
1.2.3.1. Aufbau.....	22
1.2.3.2. Aktivierung.....	22
1.2.3.3. Mutationen in Raf	23
1.2.4. Ras und Raf.....	23
1.3. Der G-Protein-gekoppelte Östrogen-Rezeptor GPER	25
1.3.1. Östrogen allgemein.....	25
1.3.1.1. Langsame Östrogenwirkung (ER alpha und beta)	26
1.3.1.2. Schnelle Östrogenwirkung	26
1.3.2. Der GPER	27
1.3.2.1. Struktur und Aufbau.....	27
1.3.2.2. Funktion.....	28
1.3.2.3. Lokalisation.....	29
1.3.2.4. Zweifler	30
1.3.2.5. Ausblick in die Zukunft: GPER als therapeutisches Target?	31
1.4. Fragestellung.....	32
2. Material und Methoden	33
2.1. Patientenkollektiv	33
2.2. Untersuchungsmaterial	36
2.3. Geräte, Verbrauchsmaterial, Chemikalien	36
2.3.1. Geräte.....	36
2.3.2. GPER.....	36
2.3.2.1 Verbrauchsmaterial.....	36
2.3.2.2. Chemikalien.....	36
2.3.2.3. Färbe/Hybridisierungskit.....	37
2.3.2.4. Antikörper	37
2.3.3. K-Ras	37
2.3.3.1. Verbrauchsmaterial	37
2.3.3.2. Chemikalien.....	37
2.3.3.3. Färbe/Hybridisierungskit.....	37
2.3.3.4. Antikörper	38
2.3.4. B-Raf.....	38
2.3.4.1. Verbrauchsmaterial	38
2.3.4.2. Chemikalien.....	38
2.3.4.3. Färbe/Hybridisierungskit.....	38
2.3.4.4. Antikörper	38
2.4. Immunhistochemische Untersuchung.....	38
2.4.1. Grundlagen der Immunhistochemie	38

2.4.2.	GPER-Färbung.....	40
2.4.3.	K-Ras	41
2.4.4.	B-Raf.....	42
2.5.	Auswertung.....	42
2.5.1.	Klassifizierung nach Remmele und Stegner	42
2.5.2.	Statistische Auswertung.....	44
3.	Ergebnisse.....	44
3.1.	Auswertbarkeit der Untersuchung	44
3.2.	Ergebnisse der immunhistochemischen B-Raf Färbungen.....	44
3.3.	Ergebnisse der immunhistochemischen K-Ras Färbungen.....	45
3.4.	Korrelation der Expression von K-Ras und B-Raf.....	46
3.5.	Ergebnisse der immunhistochemischen GPER Färbungen.....	46
3.6.	Korrelationen von K-Ras, B-Raf und GPER.....	49
3.7.	Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von GPER, K-Ras und B-Raf ...	49
3.7.1.	Überleben in Abhängigkeit von GPER.....	49
3.7.2.	Überleben in Abhängigkeit von K-Ras	50
3.7.3.	Überleben in Abhängigkeit von B-Raf.....	51
4.	Diskussion.....	52
4.1.	Ausblick auf therapeutische Optionen in der Therapie ovarieller Tumoren	52
4.2.	B-Raf	53
4.3.	K-Ras	55
4.4.	Ras und Raf	55
4.5.	GPER.....	56
4.6.	Interpretation der Follow-Up-Daten.....	57
4.6.1.	Überleben bei ovariellen Borderlinetumoren in dieser Untersuchung	57
4.6.2.	Bedeutung der Ergebnisse der Überlebenskurven in Abhängigkeit von K-Ras, B-Raf und GPER.....	58
5.	Zusammenfassung.....	59
6.	Literaturverzeichnis.....	62
7.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	73
7.1.	Tabellen.....	73
7.2.	Abbildungen	73
8.	Eidesstattliche Versicherung.....	74

1. Einleitung

1.1. Borderlinetumoren des Ovars

1.1.1. Epidemiologie und Definition

Maligne Neubildungen sind eine der führenden Todesursachen weltweit und waren 2012 für 7,6 Millionen Sterbefälle ursächlich; darunter fallen 3,6 % Tumorerkrankungen der Eierstöcke. In Deutschland standen 2008 laut dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg maligne Ovarialtumoren an fünfter Stelle aller maligner Tumoren der Frau; sie machen damit 30% aller weiblichen Genitalkarzinome aus (DKFZ Heidelberg, Tavassoli und Devilee, 2003). Innerhalb der Ovarialtumoren beschrieb HC Taylor 1929 erstmals eine Tumorentität die er als „semi-maligne Tumoren“ bezeichnete (McCluggage, 2010), 1973 wurde von der WHO für diese Gruppe ovarieller Neoplasien der Begriff „Borderlinetumor“ eingeführt und folgendermaßen definiert: „an ovarian tumor (...) exhibiting an atypical epithelial proliferation greater than that seen in their benign counterparts but without destructive stromal invasion“ (Tavassoli und Devilee, 2003). Zu der so definierten Klasse von Tumoren gehören etwa 10% der Ovarialtumoren (Lalwani et al., 2011 und Trillsch et al., 2010), die auch als Tumoren mit niedrig malignem Potential (low malignant potential, LMP) bezeichnet wurden. Sie bilden eine Entität, die zwischen benignen und malignen Tumoren einzuordnen ist und je nach histologischem Subtyp unterschiedliche Transformationsprozesse zeigt.

Die aktuelle Forschung zur Pathogenese ovarieller Neoplasien hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht, die sich in der neuen WHO Leitlinie zur Klassifikation von ovariellen Tumoren niederschlägt (Kurman et al., 2014), jedoch nach wie vor nicht zu einem einheitlichen terminologischen Konzept für ovarielle Borderlinetumoren geführt hat. Dennoch wurde der Begriff aufgrund seiner langen und etablierten Verwendung beibehalten und die zusätzliche Bezeichnung „atypisch proliferierender Tumor“ eingeführt.

Patientinnen mit Borderlinetumoren sind durchschnittlich 10 bis 15 Jahre jünger als Patientinnen mit Ovarialkarzinomen (Tavassoli und Devilee, 2003, Sherman et al. 2004). Ein Drittel aller Borderlinetumor-Patientinnen ist jünger als 40 Jahre (Kurman et al., 2011), das Durchschnittsalter beträgt 49 Jahre, während Patientinnen mit Karzinomen des Ovars im Durchschnitt 58 Jahre alt sind (Hiddemann, 2010). Die Inzidenz der Borderlinetumoren beträgt in Deutschland insgesamt 2-4/100 000 pro Jahr (Trillsch et al., 2010). Patientinnen mit

Borderlinetumoren haben eine exzellente Prognose und damit eine nahezu gleiche Lebenserwartung wie die Normalbevölkerung.

1.1.2. Klassifikation entsprechend WHO-Richtlinien, histologischen Kriterien und Nachweis von Mikroinvasionen, sowie Lymphknotenbeteiligung und Auftreten von Implantaten

1.1.2.1. WHO-Klassifikation

Neben den Tumoren epithelialen Ursprungs können im Ovar weitere Untergruppen wie mesenchymale Tumoren, Keimzelltumoren, Keimstrangstromatumoren und andere Unterformen abgegrenzt werden. Innerhalb der häufigsten Gruppe der Tumoren epithelialen Ursprungs wird laut WHO zunächst histologisch zwischen serösen, muzinösen, endometrioiden, seromuzinösen, klarzelligen und Brenner-Tumoren unterschieden und weiter hinsichtlich der Dignität zwischen benignen Erkrankungen, Borderlinetumoren und malignen Tumoren differenziert. Im Folgenden ein Ausschnitt aus der WHO-Einteilung ovarieller Neoplasien mit einem Fokus auf die für diese Arbeit wichtigen epithelialen Neoplasien.

WHO-Einteilung der ovariellen Neoplasien (Kurman et al., 2014)

Epitheliale Tumoren

- a. Seröse Tumoren
 - i. Benigne
 - Seröses Zystadenom
 - Seröses Adenofibrom
 - Seröses Oberflächenpapillom
 - ii. Borderline
 - Seröser Borderlinetumor / Atypisch proliferierender seröser Tumor
 - Seröser Borderlinetumor – mikropapilläre Variante / nicht-invasives seröses Low-grade Karzinom
 - iii. Maligne
 - Seröses Low-grade Karzinom
 - Seröses High-grade Karzinom
- b. Muzinöse Tumoren

- i. Benigne
 - Muzinöses Zystadenom
 - Muzinöses Adenofibrom
 - ii. Borderline
 - Muzinöser Borderlinetumor / Atypisch proliferierender muzinöser Tumor
 - iii. Maligne
 - Muzinöses Karzinom
- c. Endometrioide Tumoren
- i. Benigne
 - Endometriose-Zyste
 - Endometrioides Zystadenom
 - Endometrioides Adenofibrom
 - ii. Borderline
 - Endometrioider Borderlinetumor / Atypisch proliferierender endometrioider Tumor
 - iii. Maligne
 - Endometrioides Karzinom
- d. Klarzellige Tumoren
- i. Benigne
 - Klarzelliges Zystadenom
 - Klarzelliges Adenofibrom
 - ii. Borderline
 - Klarzelliger Borderlinetumor / Atypisch proliferierender klarzelliger Tumor
 - iii. Maligne
 - Klarzelliges Karzinom
- e. Brennertumoren
- i. Benigne
 - Brennertumor
 - ii. Borderline
 - Borderline Brennertumor / Atypisch proliferierender Brennertumor
 - iii. Maligne

- Maligner Brennertumor
- f. Seromuzinöse Tumoren
 - i. Benigne
 - Seromuzinöses Zystadenom
 - Seromuzinöses Adenofibrom
 - ii. Borderline
 - Seromuzinöser Borderlinetumor / Atypisch proliferierender seromuzinöser Tumor
 - iii. Maligne
 - Seromuzinöses Karzinom
- g. Undifferenzierte Tumoren

Mesenchymale Tumoren

Gemischte epitheliale und mesenchymale Tumoren

Keimstrang-Stroma-Tumoren

Gemischte Keimstrang-Stroma-Tumoren

Keimzelltumoren

Monodermale Teratome

1.1.2.2. Histologische Kriterien und Nachweis von Mikroinvasionen

Borderlinetumoren weisen eine komplexe papilläre Architektur auf und zeigen einige, aber nicht alle Kriterien der Malignität. Zu ihren Merkmalen zählen:

1. Epitheliale Sprossung: Epitheliale Proliferationen in Form kleiner Papillen, die sich zum Lumen hin baumartig verzweigen
2. Mehrreihigkeit des Epithels mit abgelösten Zellverbänden
3. Mitotische Aktivität: Im Vergleich zu benignen Tumoren findet sich eine milde Zunahme der mitotischen Aktivität
4. In geringem Ausmaß sind Kernatypien im Sinne einer Verschiebung der Kern-Plasma-Relation (zugunsten des Kerns), Hyperchromasie und Polymorphie der Zellkerne zu finden
5. Fehlende Stromainvasion

Seröse Borderlinetumoren stellen 50-60 % aller Borderlinetumoren (Shih et al., 2005) und zeigen keine Assoziation zu den unter Anderem zu Mammakarzinomen und

Ovarialkarzinomen prädestinierenden Genen BRCA 1 und 2. Sie zeigen sich zumeist als zystische Ovarialtumoren mit einer Größe von über fünf Zentimetern und treten in 1/3 der Fälle bilateral auf. Mikroskopisch wird eine irreguläre papilläre Architektur mit mehrreihigem Epithel und hyperchromatischen Zellkernen beschrieben. In Abgrenzung zu den serösen Zystadenomen wird eine fokale Epithelproliferation in mehr als 10% des Epithelvolumens gefordert. Mikropapilläre Foci mit einem Wachstumsmuster ähnlich dem serösen Low-grade Karzinom aber einem Durchmesser kleiner fünf Millimetern werden ebenfalls zu den atypisch proliferierenden Borderlinetumoren gezählt. Auch kleine mikroinvasive Zellgruppen unter fünf Millimetern mit auffälligem eosinophilen Zytoplasma zählen noch zu den Borderlinetumoren, da sie einen niedrigen Proliferationsindex aufweisen, damit vermutlich seneszent sind und keine prognostische Bedeutung aufweisen.

Bei den serösen Tumoren existiert im Gegensatz zu den anderen histologischen Typen der Borderlinetumoren die Untergruppe des nicht-invasiven Low-grade Karzinoms, auch als mikropapilläre Variante des serösen Borderlinetumors bezeichnet. Diese Untergruppe zeichnet sich durch kleine, uniforme Zellkerne mit größerer Atypie und höherem mitotischen Index als bei den atypisch proliferierenden serösen Borderlinetumoren aus. Der Bereich mit mikropapillärem Charakter ist größer als fünf Millimeter und die Papillen zeigen sich fünffach länger als breit. Das nicht invasive Low-grade Karzinom stellt den Zwischenschritt in der Progression vom Borderlinetumor zum Low-grade Karzinom dar und tritt häufiger in bereits fortgeschrittenem Stadium auf. Zudem bestehen häufig bereits Absiedelungen eines Low-grade Karzinoms.

Muzinöse Borderlinetumoren, die rund 40 % aller Borderlinetumoren ausmachen, werden in 80-90% der Fälle im Stadium FIGO Grad I diagnostiziert. Laut Definition zeigen auch sie keine Stromainvasion. Ihre bisherige Aufteilung in den intestinalen und den endozervikalen Typ wurde mit der neuen WHO-Einteilung von 2014 aufgehoben. Bislang als muzinöse Borderlinetumoren vom endozervikalen oder Müller-Typ klassifizierte Tumoren erhalten nun die eigene Kategorie seromuzinöser Tumor; sie werden molekulargenetisch eher zu den endometrioiden Tumoren gezählt (Lax et al., 2014).

Für muzinöse ovarielle Tumoren wurde eine Adenom-Karzinom-Sequenz nachgewiesen, das häufig sehr heterogene histologische Bild muzinöser Tumoren ist dadurch verständlich: adenomatöse, Borderline-typische und neoplastische Bereiche liegen dicht nebeneinander, weswegen eine gründliche Probenentnahme und ausführliche histologische Untersuchung des Gewebes zur Unterscheidung der Dignität empfohlen wird (Lax et al., 2014). Tritt assoziiert mit einer Borderlineerkrankung ein Pseudomyxoma peritonei oder eine

Lymphknotenbeteiligung auf oder handelt es sich um einen bilateralen und auffallend kleinen (<10cm) Tumor, ist ein neoplastisches Geschehen primär außerhalb des Ovars wahrscheinlicher (Kurman et al., 2011, McCluggage, 2010). Der endometrioider Typ des Borderlinetumors entsteht häufig aus einem Endometriose-Herd (Kurman et al, 2011, Tavassoli und Devilee, 2003).

In serösen Borderlinetumoren werden gehäuft Psammom-Körperchen gefunden (McCluggage, 2010), während in muzinösen Tumoren histologisch Becherzellen und neuroendokrine Granula nachgewiesen werden können.

1.1.2.3. Lymphknotenbeteiligung und Auftreten von Implantaten

Eine hauptsächlich bei serösen Borderlinetumoren (Avril et al., 2012) auftretende Besonderheit sind Implantate. Als Implantate bezeichnet man in Zusammenhang mit einem ovariellen Tumorgeschehen auftretende Läsionen (Diebold, 2014), die sich am häufigsten im Omentum, den peritonealen Oberflächen oder dem Fimbrienkranz manifestieren, jedoch aufgrund ihres indolenten Charakters von Metastasen deutlich unterschieden werden müssen. Implantate treten in bis zu 60% der Patientinnen mit Borderlinetumoren auf (Mayr et al., 2006) und sind häufiger bei exophytischem Wachstum des Tumors anzutreffen.

Mit der Leitlinie von 2014 wurde nicht nur die Aufteilung in desmoplastische und epitheliale Implantate aufgegeben, sondern auch die Kategorie des invasiven Implantats abgeschafft. Implantate wachsen folglich stets nicht invasiv. Zeigt sich eine invasive Absiedelung des Borderlinetumors wird dies nach der neuen Klassifikation als Progression zum low-grade Karzinom gewertet. Patientinnen mit Implantaten zeigen häufiger Rezidive und haben ein entgegen der Normalbevölkerung minimal eingeschränktes 5-Jahres-Überleben von 95%. Die genaue Entstehung von Implantaten bleibt allerdings weiter ungeklärt. Eine mögliche Erklärung der Pathogenese geht von einem klonalen Mechanismus ähnlich der Metastasierung bei Karzinomen aus, hierzu müssten Implantat und dazugehöriger Tumor bezüglich ihrer Mutationen von K-Ras beziehungsweise B-Raf große Ähnlichkeit aufweisen. Dies konnten Heublein et al. (Heublein et al., 2013) in einer Gruppe von 15 Patientinnen mit nicht-invasiven Implantaten bei serösen Borderlinetumoren nicht nachweisen, wohingegen Ardighieri et al. in einer Gruppe von 45 Patientinnen eine Übereinstimmung zwischen Tumor und Implantat nachweisen konnten (Ardighieri et al., 2014). Geht man von einer parallelen Entstehung von Implantat und ovariellem Tumor im Sinne eines „Feldeffektes“ (Sherman et al., 2004) aus, könnte dies unterschiedliche Mutationen in Tumor und Implantat erklären. Ein weiterer Mechanismus könnte auch die Abtragung von benignen Tumorzellen sein, die erst

nach Verteilung im Peritoneum eine maligne Entwicklung zu invasiven Implantaten (nach der neuen Klassifikation also Low-grade Karzinomen) durchlaufen (Sherman et al., 2004).

Wie bei Implantaten ist auch bei der in bis zu 30% der Fälle zu beobachtenden Beteiligung der Lymphknoten (Trillsch et al., 2010, McCluggage 2010) unklar, ob es sich um ein klonales Geschehen handelt (Seidman et al., 2004). Ein Auftreten von befallenen Lymphknoten sollte zwar erwähnt werden, jedoch nicht als metastatisches Geschehen gewertet werden, da die Lymphknotenbeteiligung selbst zu keiner Veränderung der Prognose oder der Therapie führt. Trotzdem ist sie mit prognostisch ungünstigeren Faktoren wie einer häufigeren Progression zum Low-grade Karzinom assoziiert.

1.1.3. Pathogenese

Auf der Suche nach dem pathogenetischen Zusammenhang der verschiedenen vom ovariellen Oberflächenepithel ausgehenden neoplastischen Geschehen wurden bei Borderlinetumoren häufige Mutationen der beiden im MAP-Kinase-Signalweg beteiligten

Signaltransduktionsproteine K-Ras und B-Raf festgestellt. Dabei finden sich in etwa zwei Drittel aller serösen Borderlinetumoren entweder B-Raf oder K-Ras Mutationen, während bei muzinösen Tumoren in bis zu 60% der Fälle K-Ras Mutationen, jedoch keine B-Raf Mutationen nachgewiesen werden konnten (Avril et al., 2012, Bösmüller et al., 2013, McCluggage 2010). In endometrioiden Karzinomen und seinen Vorläufern finden sich häufiger Mutationen oder Loss-of-Heterozygosity in PTEN und β -Catenin, in klarzelligen Karzinomen sind K-Ras Mutationen nachweisbar (Shih et al., 2005).

Im Gegensatz zu den häufigen Mutationen von K-Ras und B-Raf in ovariellen Borderlinetumoren und in Low-grade Karzinomen konnten in Zystadenomen und High-grade Karzinomen keine Mutationen des MAPK-Signalweges nachgewiesen werden. In High-grade Karzinomen zeigen sich jedoch häufig Mutationen von p53 (Singer, 2005, Shih et al., 2004, Lalwani et al., 2011 Cheng et al., 2004).

Diese Forschungsergebnisse führten zu der mittlerweile durch die Änderung der WHO-Leitlinie anerkannten Aufteilung der ovariellen Neoplasien nach ihrer Genese. Zu den als Typ I klassifizierten Tumoren des „Low-grade Pathway“ zählen neben den Borderlinetumoren auch die Low-grade Karzinome und die muzinösen Karzinome.

Typ I Tumoren	Vorläufer	Bekannte molekulargenetische Veränderungen
Seröses Low-grade Karzinom	- Seröses Kystadenom - Borderlinetumor/ Atypischer proliferierender seröser Tumor - Mikropapillärer Borderlinetumor/ Nicht-invasives seröses Low-grade Karzinom	B-Raf und K-Ras Mutationen (67%)
Muzinöses Karzinom	Muzinöses Kystadenom Atypisch proliferierender muzinöser Tumor	K-Ras Mutationen (>60%)

Tabelle 1: Typ I Tumoren in Nik et al., 2014

Sie zeigen ein langsames Wachstum mit größeren Volumina und typischer Weise Mutationen von K-Ras und B-Raf (Nik et al., 2014). Es wird angenommen, dass es innerhalb dieser Gruppe zu einer Progression von Zystadenomen über Borderlinetumoren hin zu Low-grade Karzinomen kommen kann, deren Schlüsselereignis die Mutation von K-Ras oder B-Raf darstellt. In sehr seltenen Fällen kann es laut Dehari et al. auch zur Entstehung eines High-grade Karzinoms aus einem Low-Grade Karzinom kommen. In diesen Fällen lässt sich jedoch im High-grade Karzinom keine p53 Mutation nachweisen (Dehari et al., 2007).

In Abgrenzung dazu werden High-grade (Typ II-) Karzinome als eigene Entität klassifiziert; für sie existiert bisher kein Tumorprogressionsmodell, vielmehr wird eine *de-novo*-Entstehung beziehungsweise die Herkunft aus dem Fimbrienkranz (Nik et al., 2014, Schüler et al., 2013) diskutiert. High-grade Karzinome zeigen häufig Mutationen von p53.

Typ II Tumoren	Vorläufer	Bekannte molekulargenetische Veränderungen
Seröses High-grade Karzinom	Bis jetzt nicht identifiziert	p53-Mutation (50-80%) Amplifikation und Überexpression von HER2/neu (10-20%) und AKT2 (12-18%) Inaktivierung p16 (10-17%)

Tabelle 2: Typ II Tumoren in Nik et al., 2014

Typ II-Karzinome werden vielfach erst in einem späten Stadium diagnostiziert. Sie zeigen ein schnelles, aggressives Wachstum sowie eine deutlich ungünstigere Prognose (Shih et al., 2004). Zusätzlich werden weitere Gruppen an ovariellen Neoplasien abgegrenzt, die möglicher Weise aus Endometriose-Zysten entstehen (endometrioiden und klarzellige Karzinome, sowie die seromuzinösen Karzinome) und die Brenner-Tumoren.

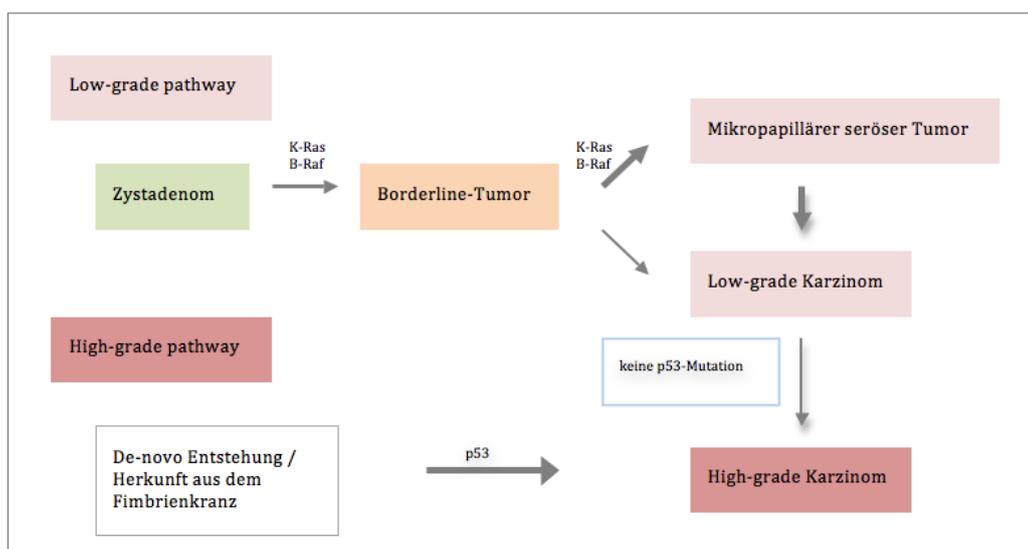


Abbildung 1: Pathogenese ovarieller Neoplasien

1.1.4. Risikofaktoren

Geht man davon aus, dass ovarielle Neoplasien von im Rahmen der Ovulation entstehenden Inklusionszysten ausgehen, erklärt sich, warum ovulations-hemmende Faktoren protektiv wirken. So senken Schwangerschaften, hormonelle Kontrazeptiva, Stillen, eine späte Menarche und frühe Menopause die Wahrscheinlichkeit einer ovariellen Neoplasie (Schüler et al., 2013). Vermutet wird, dass die nach jeder Follikelruptur stattfindenden Umbau- und Reparaturvorgänge Mutationen begünstigen (Hiddemann, 2010). Erwartungsgemäß gibt es Studien, die eine Risikozunahme für Tumoren des ovariellen Oberflächenepithels bei Frauen zeigen, die sich wegen unerfüllten Kinderwunsches einer hormonellen Therapie unterzogen haben. Dabei bleibt ungeklärt, ob dieser Risikoanstieg auf die hormonelle Therapie oder auf die Ursache der Infertilität zurückzuführen ist (Schüler et al., 2012). Neben dieser „Ovulationshypothese“ wird auch der Einfluss von Gonadotropinen auf die Entwicklung des ovariellen Oberflächenepithels diskutiert (Asante et al., 2013).

Eine unvollständige Resektion des Tumorgewebes, sei es aufgrund eines fertilitätserhaltenden Eingriffs oder aufgrund einer nicht vollständig durchgeführten Operation, ist ein starker Risikofaktor für das Wiederauftreten des Borderlinetumors (Avril et al., 2012). Für späte Rezidive konnte bisher allerdings nicht geklärt werden, ob es sich um eine Wiederkehr der gleichen Neoplasie handelt oder um ein neu entstandenes Tumorgeschehen (Avril et al., 2012). Auch das Auftreten von Implantaten ist ein Risikofaktor für Rezidive (Morice et al., 2012),

während mikropapilläres Wachstum in Borderlinetumoren als unabhängiger prognostischer Faktor keine Aussagekraft hat (Avril et al., 2012), und ein hoher soziökonomischer Status wie in vielen Fällen in der Onkologie als protektiver Faktor gilt (Stewart et al., 2013).

1.1.5. Klinik

In den meisten Fällen (78,9%) werden Tumoren mit niedrig malignem Potential im Stadium I nach FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) diagnostiziert und zeigen eine sehr günstige Prognose. Dabei gilt für Klassifikation und das Staging von Borderlinetumoren das gleiche Vorgehen wie bei ovariellen Karzinomen.

FIGO Stadium	Befundsituation
I	Tumor begrenzt auf Ovarien
IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Ovaroberfläche
IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt, Kapsel intakt
IC	Tumor begrenzt auf Ovarien mit Kapselruptur und/oder Tumor an der Ovaroberfläche und/oder maligne Zellen in Aszites oder Peritoneallavage
II	Tumor breitet sich im Becken aus
IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n)
IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
IIC	Ausbreitung im Becken und maligne Zellen in Aszites oder Peritoneallavage
III	Tumor breitet sich in der Peritonealhöhle außerhalb des Beckens aus und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
IIIB	Peritonealmetastasen < 2 cm jenseits des Beckens
IIIC	Peritonealmetastasen > 2 cm jenseits des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
IV	Fernmetastasen, Pleurametastasen

Tabelle 3: FIGO-Einteilung der Tumorstadien in Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, 2010

Die serösen Borderlinetumoren treten in einem Drittel der Fälle bilateral auf, während bei den muzinösen Borderlinetumoren das bilaterale Auftreten zum Ausschluss einer Metastasierung eines anderen Tumorprimarius führen sollte (Lax et al., 2014). Im FIGO-Stadium I und II haben Borderlinetumoren bei vollständiger operativer Therapie eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von bis zu 100%, in FIGO-Stadium III-IV eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 86-92%. Das FIGO-Stadium ist neben dem Nachweis der ehemals als invasiv wachsende Implantate bezeichneten Absiedelungen eines Low-grade Karzinoms der wichtigste prognostische Faktor (McCluggage 2010, Trillsch et al., 2010).

Klinisch können sich Borderlinetumoren durch eine abdominelle Vergrößerung oder eine schmerzhafte Torsion eines Ovars manifestieren, in einem Drittel der Fälle bleiben sie jedoch symptomlos (Kurman et al., 2011). Die endgültige Diagnose kann erst postoperativ gestellt werden, da sonographisch zwar eine hohe Sensitivität (88-100%) erreicht wird, jedoch die Abgrenzung zwischen benignen und malignen Tumoren der Histopathologie überlassen bleibt. Die Magnetresonanztomographie eignet sich gut, um zystische Strukturen und Septen innerhalb der Neoplasie einschätzen zu können, während computertomographisch besser die Operabilität und das präoperative Staging durchzuführen sind (Lalwani et al., 2011).

1.1.6. Therapie

Die Planung des therapeutischen Vorgehens bei Verdacht auf einen Borderlinetumor gestaltet sich schwierig, da meist erst das operative Staging eine Diagnosestellung erlaubt. Zwar vermitteln die bildgebenden Verfahren einen ersten Eindruck, aber für eine sichere Diagnosestellung reicht weder die Sonographie noch der in vielen Fällen erhöhte Serummarker CA 125. Es bleibt also häufig dem Operateur überlassen, zwischen einem laparoskopischen oder einem laparotomischen Eingriff zu wählen, wobei die Laparoskopie als Stagingmethode wegen der Gefahr eines unzureichenden Staging nicht immer ausreicht und mit einem höheren Rezidivrisiko verbunden ist. (Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie, 2011). Für einen laparotomischen Eingriff spricht die bessere Vermeidbarkeit einer Zystenruptur und Verteilung neoplastischer Zellen im Bauchraum, während die Laparoskopie geringere OP-Komplikationen verspricht und die Rate postoperativer Komplikationen beispielsweise durch Adhäsionen geringer ausfällt (Sherman et al., 2004). Entscheidend für die Art des operativen Vorgehens ist außerdem die Frage nach einer fertilitätserhaltenden Maßnahme. Bei bestehendem Kinderwunsch der Patientin kann bis zur endgültigen Diagnosestellung durch den Pathologen ein fertilitätserhaltendes Vorgehen gewählt werden. Auch der Erhalt des physiologischen Hormonhaushalts bei prämenopausalen Frauen spielt für die OP-Planung eine wichtige Rolle, und kann für den Erhalt zumindest eines Ovars sprechen. Diese Entscheidungen müssen nach der endgültigen Diagnose ein weiteres Mal überdacht werden, da je nach histologischem Ergebnis eine weitere, eventuell die Fertilität und den Hormonhaushalt einschränkende Operation angezeigt sein könnten. Nach Abschluss der Familienplanung sollte gemeinsam mit der Patientin aufgrund der Rezidivhäufigkeit über eine erneute, definitive Operation nachgedacht werden (Sherman et al., 2004).

Im Rahmen der durchzuführenden Staging-Operation wird empfohlen nach der gründlichen Inspektion des Abdomens eine Spülzytologie zu entnehmen und anschließend eine komplette Omentektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie durchzuführen. Alle makroskopisch sichtbaren Implantate sollten entfernt und systematisch peritoneale Biopsien entnommen werden. Ziel der operativen Therapie ist stets die komplette Tumorsektion. Bei einem muzinösen Tumor wird eine Appendektomie empfohlen, da sich bei muzinösen Tumoren des Ovars in einigen Fällen ein primär im Appendix vermiformis lokalisiertes malignes Geschehen nachweisen lässt (Trillsch et al., 2010), das auch für das häufig mit ovariellen Neoplasien in Verbindung gebrachte Pseudomyxoma peritonei verantwortlich ist.

Die inkomplette Resektion eines Borderlinetumors ist mit einer höheren Rezidivrate als bei kompletter Resektion behaftet, wobei das Rezidiv auch einen ungünstigen Effekt auf das Überleben zeigt. Die Rezidive treten im Median nach fünf Jahren auf, sind aber durch eine erneute Operation meist behandelbar (du Bois et al., 2013).

Ein radikaleres Vorgehen mit Hysterektomie und paraaortaler Lymphadenektomie zeigt nur ein fragliches Benefit (Menczer et al., 2012). Eine adjuvante Chemotherapie wird bei Borderlinetumoren nicht empfohlen, bei Nachweis eines Low-grade Karzinoms wird eine adjuvante Therapie kontrovers diskutiert (Leary et al., 2014, Shih und Kurman, 2005), laut S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumore kann auf eine adjuvante Chemotherapie nur bei Vorliegen eines Ovarialkarzinoms im Stadium IA Grad 1 verzichtet werden. Bei Vorliegen eines invasiven Rezidivs eines Borderlinetumors wird die gleiche Therapie wie für ovarielle Karzinome empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Die Rezidivrate beträgt innerhalb der ersten zehn Jahre 5-10%, danach werden Rezidive seltener. Es sollte jedoch auf eine gute, langfristige postoperative Betreuung der Patientinnen geachtet und jedes Rezidiv operativ angegangen werden (Kurman et al., 2011). Neben der operativen Therapie könnten medikamentöse Therapieformen, wie zum Beispiel die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor (Cetuximab, Panitumumab) oder von Proteinkinaseinhibitoren wie Vemurafenib in Zukunft in den Fokus der therapeutischen Optionen für Patientinnen mit ovariellen Borderlinetumoren rücken. Dies gilt insbesondere für Patientinnen, bei denen eine operative Therapie ausgeschlossen ist, die aufgrund eines fertilitätserhaltenden Eingriffs oder einer inkompletten Resektion eine zusätzliche postoperative Therapieoption benötigen, oder bei denen bereits ein Rezidiv aufgetreten ist und eine Therapieeskalation gewünscht wird.

Eine medikamentöse Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen EGFR wird bei Patienten mit Kolonkarzinomen bereits eingesetzt. Für eine solche Therapie kommen

allerdings nur Patienten in Betracht, die den Wildtyp des K-Ras Gens aufweisen, da die typische Mutation dieser Gene zu einer permanenten, rezeptorunabhängigen und irreversiblen Aktivierung der EGFR- nachgeschalteten Proliferationskaskade führt und die Blockierung des Rezeptors den Signalweg von K-Ras nicht unterbrechen kann (Van Cutsem et al., 2011). Im Gegensatz dazu ist Vemurafenib nur bei Patienten mit mutiertem B-Raf einsetzbar, da es sich um einen Proteinkinaseinhibitor handelt, der die bei Mutation konstitutiv aktivierte Proteinkinase B-Raf inhibiert. Vemurafenib wird aktuell nur bei Patienten mit metastasiertem oder inoperablem malignem Melanom eingesetzt (Chapman et al., 2011). In Anbetracht dieser neuartigen Therapiemöglichkeiten stellt sich die Notwendigkeit, eine einfache, schnelle und kostengünstige Methode zu finden, die Aufschluss über den Mutationsstatus bezüglich B-Raf und K-Ras einer Patientin gibt. Ein bedeutender Schritt auf diesem Weg ist die Beschreibung eines mutationspezifischen Antikörpers gegen B-Raf V600E durch die Forschungsgruppe Capper et al. (Capper et al., 2011). Mit den Mitteln der Immunhistochemie Aussagen über den Mutationsstatus machen zu können, wäre eine Option für die Auswahl geeigneter Patientinnen für eine medikamentöse Therapie von Patientinnen mit Borderlinetumoren. Eine Fragestellung der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeiten des immunhistochemischen Nachweises der Expression von K-Ras und B-Raf in ovariellen Borderlinetumoren abzugrenzen, da der Mutationsstatus bezüglich dieser Gene für die Therapieplanung eine entscheidende Rolle spielen könnte.

1.2. Der MAP-Kinase Signalweg

Auf die Rolle der Genprodukte von K-Ras und B-Raf als pathogenetisch interessante Proteine in der Entwicklung der ovariellen Neoplasien wurde bereits eingegangen. Beide Proteine sind Teil des MAP-Kinase Signalweges, der in gesunden Zellen zur kontrollierten Weitergabe von außen kommender Wachstumssignale in die Zelle verantwortlich ist. Dabei vermittelt ein extrazellulärer Wachstumsfaktor über einen membranständigen Rezeptor ein Signal ins Innere der Zelle, wo über Signalkaskaden die Information in den Zellkern weitergeleitet wird. Hier regulieren die dadurch aktivierten Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen, die für die Zellteilung notwendig sind (Pecorino, 2012).

Der für Überleben, Proliferation und Wachstum sowie Differenzierung einer Zelle am meisten erforschte Signalweg ist der Erk1/Erk2 Signalweg. Er ist der Prototyp eines MAPK (mitogen activated protein kinase) Signaltransduktionsweges, in dem eine Reihe von Kinasen Proteine phosphorylieren und so aktivieren. Die Aktivierung dieses Signalweges erfolgt beispielsweise

durch Bindung des Epidermal Growth Factor (EGF) an den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR; auch als ErbB1 beziehungsweise HER1 bezeichnet), den am genauesten bekannten Aktivator des MAPK Signaltransduktionsweges. Der EGFR gehört zu den Rezeptortyrosinkinasen mit einer außerhalb der Zelle gelegenen Bindungsstelle, einer singlepass Transmembrandomäne sowie einer in das Zytoplasma reichenden katalytischen Region. Bisher konnten insgesamt vier unterschiedliche EGF-Rezeptoren nachgewiesen werden (ErbB1-4) (Roskoski, 2004).

Nach der Bindung des Wachstumsfaktors EGF an den EGF-Rezeptor kommt es zu einer Dimerisierung zweier bis dahin monomerer EGF-Rezeptoren, die eine Autophosphorylierung der beiden Rezeptoren nach sich zieht. Der autoaktivierte EGF-Rezeptor bindet über seine SH2-Domäne an das intrazelluläre Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) welches über seine beiden SH3-Domänen das Austausch-Protein SOS aus dem Zytosol in die Nähe der Plasmamembran rekrutiert. Hier befindet sich auch das über Lipidanker in der Plasmamembran verankerte Ras (rat sarcoma viral oncogene). Ras ist eines der zentralen Proteine in der Regulation von Zellwachstum: Über diesen „Schalter“ läuft jedes über die Zellmembran ankommende Wachstumssignal. In seiner aktivierten Form interagiert es mit mehr als einem Dutzend Effektormolekülen um eine Reihe biologischer Prozesse zu steuern (Karreth et al., 2009). Ras ist ein G-Protein, das GTP-gebunden aktiv und GDP-gebunden inaktiv ist. Das Protein SOS dient nun der Überführung von Ras in seine aktive, GTP-gebundene Form. Einmal aktiv, bindet Ras das nachgeordnete Effektormolekül Raf, eine Serin/Threonin Kinase. Die Aktivierung erfolgt durch die Freigabe der katalytischen Domäne von Raf, die im inaktiven Zustand durch seine cystein-rich domain (CRD) autoinhibiert wird (Maurer et al., 2011). Im Folgenden dienen eine Reihe von mitogen aktivierten Proteinen (MAP) als Kinasen, die das Wachstumssignal schließlich von der Plasmamembran in den Zellkern tragen. Raf, als MAP3K (MAP Kinase Kinase Kinase), phosphoryliert als Erstes MEK (MAPK/ERK Kinase) eine MAP Kinase Kinase, die wiederum ERK (extracellular signal-regulated kinase), eine MAP Kinase, aktiviert. Das aktivierte ERK kann in den Zellkern translozieren (Peysonnaud et al., 2001). Dort reguliert es Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, Jun und Fos, die Gene kontrollieren, deren Expression für Zellproliferation und Differenzierung unverzichtbar sind. Die Bindung eines Wachstumsfaktors und die Weitergabe des Wachstumssignals führt zu einer veränderten Genexpression, die „letztlich eine dauerhafte Änderung der Zellaktivität bewirkt“ (Müller Esterl, 2004).

1.2.1. Mutationen im MAP-Kinase Signalweg

Mutationen in Genen, die für das Überleben und die Teilung einer Zelle entscheidend sind, bergen die Möglichkeit einer neoplastischen Entartung. Durch die zentrale Rolle im Schicksal einer Zelle sind Mutationen im Ras/Raf/MAP-Kinase Signalweg prädestiniert für die Entstehung neoplastischer Zellen. Borderlinetumoren sind typischer Weise mit RAS/RAF Mutationen assoziiert ((Avril et al., 2012, Bösmüller et al., 2013, Davies et al., 2002, McCluggage 2010,) und unterscheiden sich unter anderem dadurch von ovariellen High-grade Karzinomen, die einem anderen Prozess zellulärer Transformation unterworfen sind. Außerdem lassen die in LMP-Tumoren nachweisbar erhöhten Expressionslevels von Zellzyklus-assoziierten Proteinen wie DUSP4, DUSP6, SERPINA1 und anderen auf eine erhöhte Aktivität des MAPK-Signalweges schließen (Anglesio, 2008), der offensichtlich der onkogenen Aktivierung durch Ras beziehungsweise Raf unterliegt (Maurer et al., 2011).

1.2.2. Ras

1.2.2.1 Aufbau und Varianten

Das Genprodukt des Protoonkogens Ras ist ein monomeres G-Protein, dass in die Signaltransduktionskette von Wachstums- und Proliferationsvorgängen involviert ist. Es kann von zahlreichen Oberflächenrezeptoren, so unter anderem auch von EGFR, aktiviert werden. Als der zentrale Signalweg für Ras gilt der Raf/MAP-Kinase Signalweg, obwohl sich im Laufe der aktuellen Forschung auch andere Signalwege ergeben haben, deren Bedeutung für die physiologische und onkogene Entwicklung einer Zelle noch weiter zu klären sind. Es gibt insgesamt vier Varianten von Ras: H(arvey)-Ras, N(euroblastoma)-Ras, K(irsten)-Ras, wovon es wiederum zwei Isoformen gibt: K-Ras4A und K-Ras4B. Alle vier Formen sind in ihrer Aminosäuresequenz nahezu identisch, und alle sind in mutierter Form in der Lage NIH 3T3-Zellen (eine von Mausembryonen abstammende Fibroblasten-Zelllinie) zu Krebszellen zu transformieren. Dies hat zu der Annahme geführt, dass alle Ras Proteine ähnlich agieren. Seitdem aber gezeigt wurde, dass K-Ras Knock-out Mäuse im Gegensatz zu N- und H-Ras Knock-out Mäusen bereits *in utero* sterben, unterliegt diese Auffassung einem Wandel (Shields et al., 2000).

Als G-Protein wird Ras über die Bindung von GTP aktiviert und liegt GDP-gebunden im inaktiven Zustand vor. Ras selbst hat eine intrinsische GTPase-Aktivität, die aber unter

physiologischen Bedingungen zu langsam ist, weswegen es Proteine gibt, die diesen Prozess beschleunigen. Zu diesen GTPasen zählen der Guanin-nucleotid-exchange factor (GEF), der die Freisetzung von gebundenem GDP stimuliert, sodass stattdessen GTP gebunden werden kann, während GAP die intrinsische GTPase Fähigkeit von Ras stimuliert und Ras dadurch inaktiviert (Repasky et al., 2004).

1.2.2.2. Physiologisches Ras-Signaling

Anders als Raf, für den bisher als spezifischer Effektor nur MEK nachgewiesen wurde, verläuft die Signalweiterleitung von Ras auf verschiedenen Signalwegen. Als Ras-Effektoren kommen Moleküle in Frage, die eine starke spezifische Bindung zu GTP-gebundenem Ras aufweisen, deren Bindung die Aktivität von Ras modulieren kann und von deren Bindung Ras abhängig ist (Repasky et al., 2004). Insgesamt sind bisher drei Ras-Effektoren beschrieben worden, die die eben beschriebenen Kriterien erfüllen. Zu diesen zählt an prominentester Stelle Raf, dessen Aktivierung wiederum die MAP-Kinase Kaskade in Gang setzt. Obwohl sich in einfacher Darstellung Ras, Raf und Erk in einer linearen Anordnung zu aktivieren scheinen, kopiert die Aktivierung von Raf nicht nur die Effekte einer Ras-Aktivierung; weitere Effektoren von Ras erweitern die Wirkung des Ras-Signals oder sind eventuell für die vollständige Funktion notwendig (Repasky et al., 2004). Dennoch halten die Ras-Effektoren der Raf-Familie eine Schlüsselposition in allem durch Ras induzierten Geschehen. Dies liegt unter anderem in ihrer unbestrittenen onkogenen Rolle begründet (Repasky et al., 2004). Insgesamt gilt es zu verstehen, dass durch die unterschiedliche Aktivität von Ras und seinen Effektoren, eine große Anzahl verschiedener Pfade aktiviert werden kann und somit eine große Bandbreite an Informationen weitergegeben werden kann - bis hin zu eigentlich gegensätzlichen Auswirkungen einer zunächst einfachen Aktivierung eines einzelnen Proteins. Damit wird klar, warum Ras sich nicht mit einer geringeren Anzahl an Effektoren begnügt: Erst die Vielzahl an Möglichkeiten erlaubt eine ausreichende Komplexität, die der Regulierung der Zelle gerecht wird (Shields et al., 2000)

Einschränkend muss bedacht werden, dass die geschilderten Erkenntnisse schwerpunktmäßig in der Erforschung von H-Ras an embryonalen Maus-Fibroblasten gewonnen wurden. Dabei bleibt ungewiss, inwiefern diese Erkenntnisse auf K-Ras und humane Zellen übertragbar sind (Shields et al., 2000).

1.2.2.3. Mutationen in Ras

Die Annahme, dass Ras eine zentrale Rolle in der zellulären Transformation zur neoplastischen Zelle spielt beruht auf zwei Beobachtungen: Erstens finden sich in circa 30% aller humanen Tumoren Ras-Mutationen, wobei K-Ras das am häufigsten mutierte Mitglied dieser Familie ist (Niault und Baccharini, 2010) und zweitens konnte *in vitro* das neoplastische Transformationspotenzial infolge von K-Ras Veränderungen nachgewiesen werden (Tuveson et al., 2004). Ras-Mutationen werden in 70-90% aller Adenokarzinome des Pankreas und in 50% aller Kolonkarzinome gefunden, wobei es sich meist um „Missense Mutationen“ an den Stellen G12, G13 oder Q61 handelt, die zu einem Verlust der intrinsischen GTPase-Fähigkeit und damit zu einer konstitutionellen Aktivierung von Ras führen. Welche Ras-Variante mutiert vorliegt, ist abhängig vom Tumortyp; in ovariellen Tumoren finden sich häufig Mutationen in Kodon 12 oder 13 von K-Ras; diese führen zu einer Insensitivität von Ras gegenüber dem Ras deaktivierenden GAP (Repasky et al., 2004).

1.2.2.4. Ras wirkt kontextabhängig

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkung von aktiviertem Ras längst nicht so eindeutig ist, wie ein erster Eindruck vermitteln könnte. Das Ergebnis der Ras-Aktivierung ist sowohl abhängig von dem umgebenden Zellkontext, als auch von der Konzentrationsstärke in der Ras vorliegt. Dabei sind die Auswirkungen so unterschiedlich, dass auch kaum von einer Tumorart auf die andere geschlossen werden kann (Campbell et al., 2007).

1.2.3. Raf

Bei der Familie der Raf Proteine (rapidly accelerated fibrosarcoma proteins) handelt es sich um ubiquitär vorkommende Serin/Threonin-Proteinkinasen. Sie werden von dem an der Zellmembran liegenden Ras aktiviert (Maurer et al., 2011). Raf sind in niederen und höheren Eukaryonten zu finden, wobei nur in Säugetieren drei unterschiedliche Versionen von Raf zu finden sind: A-Raf, B-Raf und C-Raf (auch als Raf-1 bezeichnet). Die einzigen bisher nachgewiesenen Substrate von Raf sind MEK 1/2. Obwohl in der Vergangenheit wesentlich intensivere Forschung an Raf-1 betrieben wurde, kristallisiert sich immer mehr die Schlüsselrolle von B-Raf in der Kontrolle über den Erk-Signalweg heraus (Mercer und Pritchard, 2003), womit sich B-Raf als mögliches Zielmolekül für die Therapie von Krebs qualifiziert.

1.2.3.1. Aufbau

Alle drei Isoformen von Raf enthalten konservierte, homologe Bereiche. Conserved region CR1 und CR2 sind im N-Terminus gelegene regulatorische Domänen. Sie beinhalten sowohl die Ras-binding domain (RBD) als auch die cystein-rich domain (CRD) die für die Inhibierung der katalytischen Domäne in CR3 verantwortlich ist. Diese im C-Terminus liegende CR3 Domäne weist die größte Homologie unter den drei Raf-Proteinen auf.

1.2.3.2. Aktivierung

Die Aktivierung von Raf wird, wie oben bereits kurz dargestellt, durch Aufhebung der Inhibition der katalytischen Domäne durch die N-terminal gelegene regulatorische Domäne erlaubt (Maurer et al., 2011). Es wird angenommen, dass eine negative Ladung in Serin445 die Aktivierung vorbereitet und B-Raf infolgedessen einfacher zu aktivieren ist als A- und C-Raf, deren Aktivierung deutlich komplexer verläuft und verschiedene Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsschritte benötigt (Garnett et al., 2004). So ist B-Raf in Serin338 konstitutiv phosphoryliert, während A-Raf und C-Raf an dieser Stelle erst während des Aktivierungsvorganges phosphoryliert werden müssen (Rushworth et al., 2006).

Mag der bisher dargestellte Signalweg als eine lineare Abfolge aktivierender Schritte hin zur Expression proliferativer Genen erscheinen, so lässt dies die komplexe Kommunikation unter den verschiedenen Isoformen der beteiligten Proteine, und den Einfluss von zahlreichen, im Umfeld des Signalwegs aktiven „scaffolding proteins“ außer Acht. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass C-Raf und B-Raf Heterodimere bilden, die eine deutlich höhere Aktivität als ihre Mono- und Homodimeren aufweisen, falls die Menge an beteiligten Heterodimeren mit der Menge an Monomeren vergleichbar ist (Rushworth et al., 2006). Selbst Heterodimere aus aufgrund von Mutationen inaktivem C-Raf oder B-Raf gepaart mit einer aktiven Kinase zeigten eine insgesamt erhöhte Kinaseaktivität. Folglich ist eine intakte Kinasedomäne ausreichend für die Aktivität eines Heterodimers. Dabei kommt es weniger auf die Kinaseaktivität des betreffenden Proteins an, als auf die pure Anwesenheit einer zweiten Kinase (Rushworth et al., 2006). Die sich damit offenbarende Komplexität wird durch die Regulation der Heterodimerisierung zusätzlich gesteigert. So scheint die Erk-Aktivierung zu einem negativen Feed-back zu führen, das die gebildeten Heterodimere destabilisiert. Die Bildung von Heterodimeren kann außerdem durch das Raf kinase inhibitor protein RKIP und durch 14-3-3 Proteine reguliert werden. Multipliziert man nur die sich aus den verschiedenen Heterodimeren ergebenden Paarungen mit den sich durch die verschiedenen Isoformen von Erk, Ras und Raf ergebenden Bindungsmöglichkeiten werden schon 1152 verschiedene

Konstellationen möglich. Bedenkt man zusätzlich die Regulierung dieser Möglichkeiten durch die umgebenden Proteine, so zeigt sich der ERK Signalweg als ein stark verzweigter, streng regulierter Prozess (Roskosky, 2010).

1.2.3.3. Mutationen in Raf

B-Raf Mutationen finden sich in 7% aller Karzinome, darunter in 27-70% aller Melanome, 36-53% aller Schilddrüsenkarzinome, 5-22% aller kolorektalen Karzinome (Garnett et al., 2004) sowie in 100% aller Haarzelleukämien und in circa 34% aller ovariellen Borderlinetumoren (Long et al., 2013). Dabei ist einerseits nicht klar, warum bestimmte Gewebe für diese Mutationen anfälliger zu sein scheinen, und andererseits warum B-Raf so deutlich häufiger mutiert als seine beiden anderen Formen A-Raf und C-Raf. Eine mögliche Erklärung für letztere Beobachtung könnte die basale Kinaseaktivität (die Aktivität einer Kinase in ihrer eigentlich deaktivierten Form) der drei Raf-Proteine sein. Diese liegt bei B-Raf deutlich höher als bei seinen beiden Isoformen, was an dem bei B-Raf konstitutiv phosphorylierten Serin 445 und dem Asparaginsäurerest an der Stelle 448 liegen könnte (Mercer und Pritchard, 2003). Zudem benötigt B-Raf in seiner Synthetisierung deutlich weniger posttranslationale Modifikationen, die eine erhöhte Sicherheit gegen onkogene Mutationen mit sich bringen. In der Untersuchung der B-Raf Mutationen konnte festgestellt werden, dass sich 90% aller Mutationen im gleichen Genlocus ereignen: An der Position 600 wird Valin durch Glutaminsäure ersetzt (Davies et al., 2002). Diese Mutation imitiert vermutlich eine dauerhafte Phosphorylierung (d.h. Aktivierung) indem sie eine negative Ladung neben der regulatorischen Domäne einführt und erklärt damit eine bis zu 700-fach erhöhte, permanente Aktivierung des Erk-Signaling. Damit erfüllt die Punktmutante V600E von B-Raf die Eigenschaften eines Onkogens (Wan et al., 2004). Insgesamt wurden bisher über 30 verschiedene B-Raf Mutationen festgestellt, die in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. Zu der Gruppe der „high activity mutants“ zählt auch B-Raf V600E, dessen Mutation die höchste basale Kinaseaktivität aufweist (Wan et al., 2004).

1.2.4. Ras und Raf

In Studien konnte in weniger als 1% der Fälle eine gleichzeitig auftretende Mutation von Ras und Raf nachgewiesen werden (Vang et al., 2009). In diesem seltenen Fall liegt jedoch meist kein typischer Aminosäureaustausch an Position V600E in B-Raf vor. Trotzdem ist festzuhalten, dass Ras- und Raf-Mutationen in ähnlichen Arten von Tumorgeweben

vorkommen, was zu der Annahme führt, dass Raf- und Ras- Mutationen in ihrem tumorigenen Effekt vergleichbar sein könnten. Es könnte als Beweis gewertet werden, dass beide Onkogene in der Entwicklung humaner Tumoren über die Deregulation der Erk-Aktivität beteiligt sind (Mercer und Pritchard., 2003). Andererseits ist unklar, ob B-Raf Mutationen tatsächlich äquivalent zu Ras Mutationen sind. Forschung an Melanom-Zellen zeigt etwa, dass Störungen in anderen Ras-Effektorwegen nötig sein könnten, um die Raf-Aktivierung zu komplettieren. Das heißt, dass eine ausschließliche Raf -Mutation nicht ausreicht, um alle tumorigenen Effekte einer Ras Mutation durchzusetzen (Repasky et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für das seltene gemeinsame Auftreten von Ras- und Raf-Mutationen in einem Tumorgewebe könnte in der Regulation des Erk-Signalings liegen. Um Proliferation zu stimulieren, ist eine vorsichtige Modulierung des Erk-Signaling notwendig. Möglicherweise ist eine sinnvolle Stimulierung bei gleichzeitiger Mutation von sowohl Raf als auch Ras gar nicht mehr möglich, und in solcher Art mutierte Zellen treten daher selten in Erscheinung (Garnett et al., 2004).

Wie bereits beschrieben, werden neue Möglichkeiten der Therapie von ovariellen Tumoren mit monoklonalen Antikörpern beziehungsweise Medikamenten wie Vemurafenib diskutiert. Für die sinnvolle Behandlung eines Tumors mit diesen Medikamenten ist die Kenntnis des Mutationsstatus bezüglich K-Ras bzw. B-Raf Voraussetzung. Daher ergibt sich die Notwendigkeit eine sensitive, schnelle und kostengünstige Methode zu finden, die Aufschluss über den Mutationsstatus verschafft, und an die Möglichkeiten möglichst vieler Labore angepasst ist (Rodriguez, 2014).

Für den Nachweis des mutierten B-Raf konnten Capper et al. (Capper et al., 2011) einen mutationsspezifischen Antikörper für den Einsatz in der Immunhistochemie einführen. Das heißt, dass die in der Immunhistochemie festgestellte Färbeintensität ein direkter Nachweis für die Quantität des mutierten B-Raf Proteins ist.

Dagegen gestaltet sich die Analyse des Mutationsstatus von K-Ras derzeit noch deutlich schwieriger. Dies liegt auch daran, dass verschiedene Mutationen an unterschiedlichen Kodons (u.A. Kodon 12, 13, 61) vorliegen, deren pathogenetische Bedeutung bisher nicht vollständig verstanden ist. Bisher existiert keine standardisierte Methode zum Nachweis der Mutation von K-Ras, vielmehr existieren mehrere Möglichkeiten die alle von der PCR-Amplifikation der K-Ras Zielsequenz ausgehen. (Chretien, 2013). In der folgenden Tabelle werden verschiedene aktuell in Verwendung befindliche Methoden verglichen:

Method	Kit (Hersteller)	Dauer bis zum Ergebnis	Vorteile	Nachteile
Didesoxymethode nach Sanger	BigDye Terminator Sequencing Kit (Life Technologies Corp, Grand Island, NY)	Ca 1 Woche	Kann in einem Thermocycler automatisiert werden	Laborintensiv Niedrige Sensitivität
Pyrosequenzierung	PyroMark KRAS v2.0 test (Qiagen, Manchester, UK)	schnell	Großer Durchsatz Auch einsetzbar für teilweise zerstörte Proben	Mäßige Sensitivität Teuer
Echt-Zeit PCR mit Schmelzkurvenanalyse	cobas KRAS Mutation Test (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA)	<8h	Automatisierte Software	Mäßige Sensitivität Separates Essay für jede Mutation
Echt-Zeit PCR mit allelspezifischen Primern	therascreen KRAS RGQ PCR Kit (Qiagen)	2d	Schnelle Ergebnisse Hohe Sensitivität	Beste Sensitivität Sehr teuer Braucht viel Gewebe Entdeckt nur sieben häufige Mutationen

Tabelle 4: Methoden der K-Ras Mutationsanalyse in Rodriguez et al, 2014

Aberrationen im Ras-Gen führen zu einer gesteigerten, unkontrollierten Zellproliferation mit einer folgenden Zunahme der Zellen, die das mutierte Gen exprimieren. Die Expression und die Lokalisation von Biomarkern im Gewebe kann mit den Mitteln der Immunhistochemie untersucht werden. Daher könnte mit dem immunhistochemischen Nachweis einer Überexpression von K-Ras eine zwar vorläufige, aber schnelle und kostengünstige Aussage über den Mutationsstatus erhoben werden. Diese müsste im weiteren diagnostischen Verlauf durch PCR-Untersuchungen bestätigt werden, weil die Immunhistochemie keine endgültige Aussage über den Mutationsstatus des K-Ras Gens erlaubt (Elsabah et al., 2013), da eine direkte Korrelation der Mutation von K-Ras mit einer immunhistochemisch nachweisbaren Überexpression von K-Ras bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. In einer Studie von Malhotra et. al. konnte in Gewebe aus Kolonkarzinomen gezeigt werden, dass die Expression von K-Ras mit fortschreitender Entdifferenzierung zunimmt und es einen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen gesundem und neoplastischen Gewebe gibt (Malhotra et al., 2013). Auch eine finnische Studie zeigt unter 134 Frauen mit Rektumkarzinomen einen Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und der Expression von K-Ras (Servoma et al., 2000).

1.3. Der G-Protein-gekoppelte Östrogen-Rezeptor GPER

1.3.1. Östrogen allgemein

Östrogene sind Steroidhormone, die hauptsächlich in den Ovarien, zu einem geringen Teil in den Nebennieren, aber auch im Nebenhoden des Mannes synthetisiert werden. Dabei

katalysiert das im Fettgewebe befindliche Enzym Aromatase die Entstehung von Östrogen aus seinem Vorläufer Testosteron. Östrogen übt seine Wirkung auf eine große Bandbreite verschiedener Gewebe aus. So übernehmen Östrogene kardiovaskuläre Funktionen, Aufgaben im zentralen Nervensystem und regulieren die Knochenstruktur, wobei die vielleicht wichtigste Aufgabe die Entwicklung und Erhaltung des reproduktiven Gewebes der Frau sowie die Regulation eines physiologischen weiblichen Zyklus ist. Aufgrund der herausragenden Bedeutung für die Entwicklung der weiblichen Reproduktionsorgane lässt sich aber auch der Einfluss der Östrogene auf Entstehung, Wachstum und Überleben von aus diesem Gewebe stammenden Neoplasien folgern (Filardo et al., 2000). Das östrogen-gesteuerte Wachstum von ovariellen Karzinomen wird dabei häufig mit der durch den ER α regulierten Transkription entscheidender Zellfunktionsgene in Verbindung gebracht (Albanito et al., 2007).

1.3.1.1. Langsame Östrogenwirkung (ER alpha und beta)

Die Wirkung der Östrogene wurde bisher den beiden klassischen Steroidhormonrezeptoren ER α und ER β zugeschrieben. Diese vermitteln als liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren ihr Signal direkt in den Zellkern und tragen als Promotorregion zur Expressionsregulation von Östrogen-abhängigen Genen bei. Trotz der Umgehung des Second-messenger-Signaling und der vergleichsweise direkten Einflussnahme gilt diese Art der Signaltransduktion als „langsame Östrogenwirkung“ die Stunden bis Tage für ihre Umsetzung benötigt. Ob alle vorher beschriebenen Östrogenwirkungen tatsächlich ausschließlich auf die beiden Östrogenrezeptoren ER α und ER β zurückzuführen sind, ist bisher noch nicht endgültig geklärt (Filardo et al., 2000).

1.3.1.2. Schnelle Östrogenwirkung

Tatsächlich kann neben der „langsamen“ auch eine schnelle Östrogenwirkung beobachtet werden, die eine Beteiligung von Second-Messenger-Signalwegen aufweist. Zu den schnellen Wirkungen von Östrogen zählen der Einstrom von Kalzium, die Produktion von cAMP, NO und PIP3 sowie die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 (Filardo et al., 2000). Da die schnelle Östrogenwirkung innerhalb von Minuten eintritt, wird davon ausgegangen, dass es sich nicht um transkriptionelle Regulation handeln kann. Vielmehr wird ein Prozess angenommen, der seinen Ausgang an der Plasmamembran nimmt und keine ER-vermittelte Gentranskription einschließt (Filardo et al., 2000). Da 17 β -Estradiol (E2) aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften zellmembrangängig ist, gilt es als unwahrscheinlich, dass die

schnelle Östrogenwirkung von E2 über einen Rezeptor der Zellmembran ausgelöst wird. Trotzdem wurden die beschriebenen schnellen, östrogen-induzierten Wirkungen beobachtet und deswegen ein Östrogenrezeptor vermutet, der über Second-Messenger Signalwege für diese Wirkungen zuständig sein könnte (Mizukami, 2010). Heute glaubt man diesen Rezeptor in dem G-Protein gekoppelten Östrogen-Rezeptor GPER gefunden zu haben, da die Expression des GPER mit der Östrogen-vermittelten Erk-Aktivierung korreliert (Revankar et al., 2005). Die schnelle Aktivierung von Second-Messenger-Signalwegen wird häufig durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermittelt, deswegen könnten GPCR durchaus für die schnelle Wirkung von Steroidhormonen verantwortlich sein (Filardo et al., 2000) und GPER als schneller Östrogenrezeptor wirken.

1.3.2. Der GPER

Immer wieder gibt es Hinweise darauf, dass der GPER mit der Proliferation von Krebszellen im Zusammenhang steht. Die Expression von GPER konnte im neoplastischen Geschehen von verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, dazu zählen neben Schilddrüsenkarzinomen auch Mammakarzinome und ovarielle Karzinome (Wang et al., 2010).

1.3.2.1. Struktur und Aufbau

Der G-Protein gekoppelte Östrogen-Rezeptor GPER wurde 2005 erstmals als ein Östrogen-bindendes G-Protein identifiziert und wird seit 2007 in der offiziellen Nomenklatur der G-Proteine aufgeführt (Barton et al., 2012). GPER zählt zu den heterotrimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Signale über die Freisetzung aktivierter Untereinheiten des G-Proteins ins Innere der Zelle weiterleiten. Dabei wirkt der Rezeptor als GTP-Austauschfaktor, der in der α -Untereinheit des G-Proteins einen Austausch von GDP gegen GTP auslöst. Diese Aktivierung führt zur Abspaltung der α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit, die nun unabhängig voneinander auf verschiedene Effektoren im Sinne eines Second-messenger-Signaling im Inneren der Zelle einwirken können. Das GPER-Gen ist auf Chromosom 7p22.3 lokalisiert und liegt in vier unterschiedlichen transkriptionellen Spleißvarianten vor. Wie alle GPCR zeichnet sich auch der GPER durch eine 7-Transmembrandomäne aus (Wang et al., 2010).

1.3.2.2. Funktion

Über die genauen Aufgaben des GPER sowie seine Bedeutung für neoplastische Geschehen besteht bisher keine Einigkeit in der wissenschaftlichen Literatur, dafür ist die aktuelle Studienlage noch nicht ausreichend (Barton et al., 2012). Konsens ist jedoch, dass die Aktivierung des GPER Einfluss auf die Regulation des Zellwachstums nimmt, indem sie in Signalkaskaden eingreift. Eine häufig anzutreffende Beobachtung in der Regulation von Wachstumssignalen ist die Integration von mehreren Signalwegen, um das Ergebnis eines Signals genauer einstellen zu können (Albanito et al., 2008). Sowohl EGF (Epidermal Growth Factor) als auch der GPER-Agonist Östrogen sind für das Wachstum und das Überleben von östrogen-abhängigen Geweben notwendig und scheinen sich gegenseitig in ihrer Wirkung zu beeinflussen. So gibt es Hinweise, dass der GPER mittels einer Transaktivierung der EGFR-Signalachse die Proliferation von Zellen fördert. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von GPER zur Freisetzung von HB-EGF (Ignatov et al., 2013; Filardo et al., 2000) und durch Matrix-Metalloproteinasen induzierte Freisetzung von EGF-ähnlichen Liganden führt (Albanito et al., 2008) und darüber eine Aktivierung der ERK-Signalkaskade hervorruft. Zudem konnte gezeigt werden, dass EGF zu einer erhöhten Expression von GPER führt, EGF also den GPER benutzt um das Potenzial des EGFR-Netzwerkes zu verstärken und außerdem in Östrogen-Rezeptor negativen Mammakarzinomen Östrogen den GPER als Schlupfwinkel nutzt um via GPER eine östrogenabhängige Stimulation der Proliferation zu ermöglichen (Albanito et al., 2008).

Tamoxifen ist ein Östrogenrezeptor-Antagonist, jedoch ein Agonist des GPER. Niedrige Ansprechraten auf Tamoxifen von nur 10-17% in Ovarialkarzinomen (Yan et al., 2013) und die Entwicklung von Therapieresistenz von Mammakarzinomen unter Tamoxifen-Therapie könnten durch die Aktivierung des GPER und die damit gekoppelte Aktivierung des wachstumsinduzierenden EGFR-Signalweges erklärbar sein (Lappano et al., 2013). Dem muss entgegengesetzt werden, dass auch eine intratumorale Heterogenität bezüglich des Östrogenrezeptorstatus möglich ist oder die Östrogenrezeptoren im Laufe der Therapie einem Mutationsdruck hin zu einer geringeren Tamoxifen-Affinität unterliegen könnten (Albanito et al., 2008).

Dies alles deutet daraufhin, dass der GPER eine Rolle in der Induktion von Zellwachstum spielt. Gleichwohl gibt es Forschungsergebnisse die in eine andere Richtung deuten. Die Forschungsgruppe Filardo und Kollegen zeigte 2002, dass die Aktivierung des GPER über eine Induktion der Adenylylzyklase zu einer Erniedrigung des cAMP-Spiegels und damit zu einer erniedrigten ERK-Aktivität führt (Filardo et al., 2002, *Molecular Endocrinology*).

Ausgehend von diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Tumorzellen mit geringer GPER-Expression weniger Möglichkeiten haben, den ERK-Spiegel auf basale Werte zurückzuführen und somit ein Mangel an GPER zu einer dauerhaften Anregung der Proliferation führt. Dies passt zu Forschungsergebnissen von Ignatov et al. aus dem Jahr 2013, die zeigen, dass die Expression von GPER in Karzinomen niedriger ist als in Borderlinetumoren und dass der GPER die Proliferation von Zellen hemmt. Folglich wird der Verlust der GPER-Expression als ein Schritt in Richtung Malignität im Rahmen der Tumorgenese diskutiert und der GPER als ein Tumorsuppressor vorgeschlagen (Ignatov et al., 2013). Diese gegensätzlichen Ergebnisse werden durch sich widersprechende Ergebnisse bezüglich der Förderung von Invasion und Migration durch GPER weiter verkompliziert (Ignatov et al., 2013, Yan et al., 2013), auch die Studienlage zum Einfluss von GPER auf das Überleben von Tumorpatienten ist bisher völlig uneinheitlich. Smith et al. zeigten 2009, dass der GPER ein negativer prognostischer Faktor in ovariellen Karzinomen ist, während Kolkova et al. 2012 keine Korrelation zwischen Überleben und GPER-Expression zeigen konnten. Fujiwara et al., 2012 postulieren ein schlechteres Überleben bei Koexpression mit EGFR (Fujiwara et al., 2012). Es zeigt sich aktuell ein uneinheitliches Feld mit widersprüchlichen Ergebnissen in der Erforschung der Wirkung und Funktion des GPER.

1.3.2.3. Lokalisation

Bisherige Forschung hat ergeben, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an der Plasmamembran gebunden vorliegen, dort einen Liganden binden und nach wiederholter oder dauerhafter Stimulation desensibilisiert werden und es im Zuge dessen zu einer Internalisierung mittels „clathrin-coated-vesicles“ kommt. In den letzten Jahren häufen sich jedoch die Hinweise, dass GPCR nicht nur von der Plasmamembran aus Signale in die Zelle weiterleiten können, sondern auch von intrazellulären Orten, wie zum Beispiel dem endoplasmatischen Retikulum, zur Signaltransduktion befähigt sind (Boivin et al., 2008). Tatsächlich konnte die Internalisierung von GPER mittels „clathrin-coated vesicles“ gezeigt (Filardo et al., 2007), jedoch kein Konsens zur genauen Lokalisation des GPER in der Zelle erreicht werden. Tatsächlich besteht auch die Möglichkeit, dass GPER unter pathologischen und unter physiologischen Bedingungen unterschiedliche Lokalisationen aufweist (Funakoshi et al., 2006), oder eine Modulation der GPER-Aktivität über die Präsenz des Rezeptors an der Plasmamembran erreicht wird (Cheng et al., 2011).

Insgesamt muss auf der Suche nach der Lokalisation des GPER Vorsicht walten, da die Überexpression von exogenen Genen häufig zu einer Akkumulation des Genprodukts im endoplasmatischen Retikulum führt (Mizukami et al., 2010, Funakoshi et al., 2006), was für

eine Vielzahl der durchgeführten Experimente gilt. Auch könnte es sein, dass die Epitop-Sequenz am N-Terminus in Folge posttranslationaler Modifikation im Golgi-Apparat verändert wird und der GPER deswegen in der Plasmamembran unentdeckt bleibt. Ein Antikörper, der zum Nachweis von GPER tauglich sein soll, muss folglich in der Lage sein auch glykosyliertes GPER zu erkennen (Mizukami et al., 2010).

Trotzdem haben verschiedene Forschungsgruppen den Nachweis geführt, dass GPER an das endoplasmatische Retikulum gebunden vorliegt. Hierzu wurde GFP (grün fluoreszierendes Protein) - markierter GPER in COS7 Zellen überexprimiert und konnte in einem tubuloretikularen Netzwerk gefunden werden, wobei der für das endoplasmatische Retikulum spezifische Antikörper KDEL eine nahezu vollständige Kollokalisierung mit dem markierten GPER aufwies (Revankar et al., 2005). Auch die Forschungsgruppe um Otto et al., 2008 wies die Kollokalisierung mit KDEL nach und nimmt deswegen eine Lokalisation des GPER im endoplasmatischen Retikulum an.

Im Widerspruch dazu führten Thomas et al., 2005 den immunzytochemischen Nachweis, dass GPER an der Zellmembran zu finden ist. Auch Funakoshi et al., 2006 konnten mit einem im eigenen Labor hergestellten Antikörper GPER in der Zellmembran nachweisen, wobei sie eine Translokation des Rezeptors eine Sekunde nach Aktivierung mit E2 ins Zytoplasma beobachteten. Tatsächlich würde der E2 induzierte Ca^{2+} -Einstrom einige Minuten brauchen, wenn der Rezeptor an das endoplasmatische Retikulum gebunden wäre. Der beobachtete Zeitraum von wenigen Sekunden spricht viel eher für eine Lokalisation an der Zellmembran (Funakoshi et al., 2006), weswegen eine mögliche Hypothese wäre, dass der E2-Rezeptor GPER an der Zellmembran lokalisiert ist und nach seiner Aktivierung internalisiert wird (Filardo et al., 2007).

1.3.2.4. Zweifler

Trotz zahlreicher, sich auch in ihren Ergebnissen deckenden Publikationen, gibt es nachhaltige Kritik an dem Konzept eines G-Protein-gekoppelten Östrogenrezeptors. So kritisieren einige Autoren, dass zwar viele Zelllinien-basierte Studien den Nachweis geführt haben, dass es sich bei GPR30 um einen Östrogen-Rezeptor handelt, bisher jedoch wenige Beweise erbracht werden konnten, dass dies auch für Versuche *in vivo* gilt (Levin et al., 2011). Langer et al. führen 2010 in ihrem Review „A critical review on fundamental controversies in the field of GPR30 research“ zahlreiche Fehler in der bisherigen Forschungsarbeit an, die zu einem vermeintlichen Beweis der spezifischen Bindung von E2 an GPER geführt haben. Dazu zählt beispielsweise die Lösung von Östrogen in Ethanol in

den Versuchen von Filardo et al. 2007, wobei Ethanol selbst schon eine Aktivierung von Erk1/2 auslösen kann, und somit der Nachweis eines Zusammenhanges fragwürdig erscheint. Außerdem werden verschiedene Widersprüche betreffend der Ergebnisse innerhalb der Forschungsarbeit einzelner Gruppen nachgewiesen oder der Goldstandard eines Experiments vermisst.

Auch gibt es einige Arbeiten, die die bisher dargelegten Ergebnisse nicht wiederholen können, beziehungsweise zu anderen Ergebnissen kommen. So konnten Otto et al., 2009 keine spezifische Bindung von E2 an GPER finden und zeigen außerdem, dass GPER Knockout-Mäuse keinerlei Abnormalitäten in der Entwicklung aufweisen und deswegen GPER für die Weitergabe von Östrogen-vermittelten Effekten keine Rolle spielen könne. Wie können diese Forschungsergebnisse auf einen Nenner gebracht werden? Könnte es sein, dass E2 ER α an der Zellmembran bindet und dann erst GPER aktiviert? Könnte GPER Teil eines größeren Signalosoms sein, zu dem noch weitere Proteine wie Shc, Src, Threonin/Serinkinasen und eventuell auch EGFR zählen? Es bleibt Diskussionsbedarf darüber, ob eine Aktivierung von G-Proteinen durch einen fraglichen membranständigen ER α -Rezeptor von GPER abhängig sein könnte.

1.3.2.5. Ausblick in die Zukunft: GPER als therapeutisches Target?

In etwa der Hälfte der ER-positiven Brustkrebspatientinnen wirkt die anti-östrogene Therapie mit Tamoxifen von Anfang an nicht, viele andere Patientinnen entwickeln später eine Resistenz gegen diese Therapie. Diese Tamoxifen-resistente Proliferation blieb bisher unverstanden, könnte aber zum Beispiel durch alternatives E2-Signaling via GPER erklärt werden (Maggiolini et al., 2004). Auch blieb bisher unklar, inwiefern GPER Invasion und Migration innerhalb von Tumorgeschehen beeinflusst (Yan et al., 2013, Ignatov et al., 2013) und ob die Wirkung des GPER sich mehr in Richtung Wachstumsinduktion oder mehr in Richtung Wachstumsinhibition richtet. Insofern bleibt eine zukünftige Nutzung des GPER als therapeutisches Target offen. Nur fundierte und einheitliche Ergebnisse über die mit dem GPER verbundenen Zellmechanismen können eine Entwicklung von therapeutischen Optionen mit Hilfe von GPER ermöglichen.

1.4. Fragestellung

1. Besteht technisch die Möglichkeit mittels der Immunhistochemie die Expression von K-Ras und B-Raf zu untersuchen?
2. Falls ja, entsprechen die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen von K-Ras und B-Raf den nach der Literatur zu erwartenden Ergebnissen der Mutationsanalyse und eignet sich die Immunhistochemie somit als einfache und kostengünstige Diagnostik zur Untersuchung des Mutationsstatus bei Borderlinetumoren?
3. Schließen sich bei der immunhistochemischen Untersuchung die Expression von K-Ras und B-Raf aus?
4. Hat die Expression von K-Ras und B-Raf eine Bedeutung für das Überleben?
5. Wird der GPER in ovariellen Borderlinetumoren exprimiert?
6. Wenn ja, hat die Expression von GPER eine Bedeutung für das Überleben?
7. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von GPER und den Signaltransduktionsproteinen K-Ras und B-Raf?

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Die insgesamt 86 für diese Arbeit verwendeten Fälle stammen aus den Archiven des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die ausgewählten Patientinnen wurden entweder in der Frauenklinik des Klinikums Großhadern oder in der Frauenklinik Maistraße im Zeitraum von 1986 bis 2009 operiert. Die Tumorklassifikation der für diese Arbeit verwendeten Fälle entspricht dem Stand der WHO Leitlinie von 2003. Das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation variierte zwischen 18 und 84 Jahren, das Durchschnittsalter am Operationstag betrug 52 Jahre.

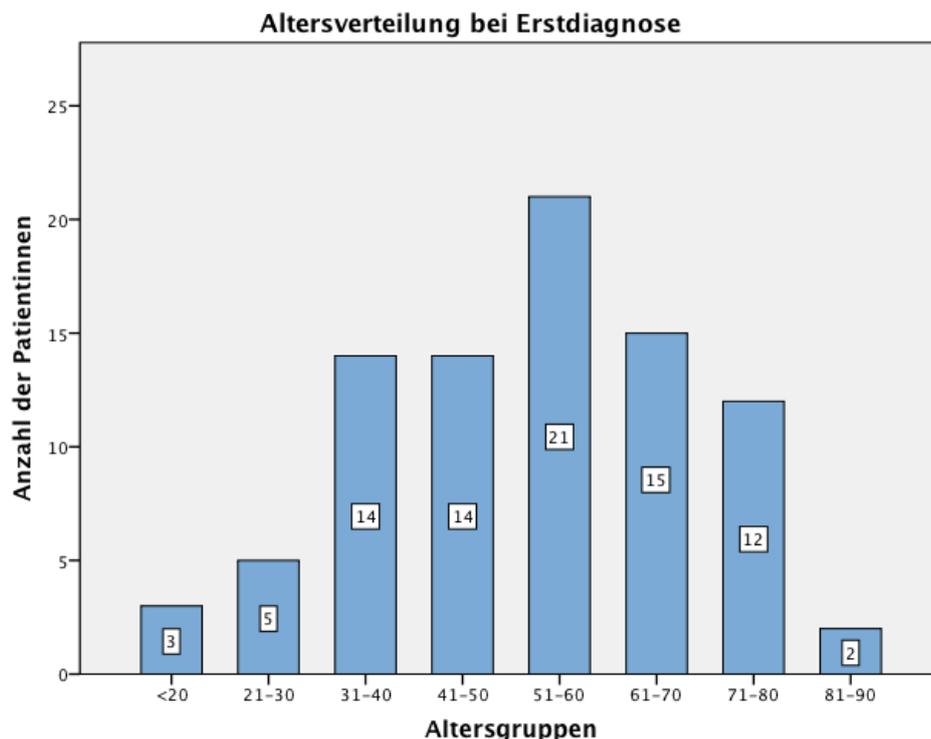


Abbildung 2: Altersverteilung der Patientinnen bei Erstdiagnose

Die Daten für das Follow-Up wurden im Tumorregister München am IBE der LMU recherchiert, dabei konnten in neun Fällen keine Follow-Up-Daten erhoben werden, 25 Patientinnen starben. Innerhalb der Todesfälle starben 14 Patientinnen unabhängig von der Diagnose einer ovariellen Neoplasie, zu einem Todesfall konnten keine weiteren Informationen zur Todesursache gefunden werden. In zehn Fällen starben die Patientinnen im Rahmen eines ovariellen Tumorgeschehens, dabei handelte es sich in sechs Fällen um einen muzinösen Tumor, in einem Fall um einen gemischten Tumor und in drei Fällen um seröse

Tumoren. Eine dieser Patientinnen (Fall 10) zeigte zum Zeitpunkt der Diagnose sowohl einen Borderlinetumor als auch ein Ovarialkarzinom, bei den beiden anderen Fällen (Fälle 30 und 39) wurde zuerst ein Borderlinetumor und Jahre später ein Ovarialkarzinom diagnostiziert. Bei den Fällen mit muzinösen Neoplasien starben zwei Patientinnen ausschließlich an der Diagnose einer muzinösen Borderlineneoplasie, die anderen zeigten bereits zum Diagnosezeitpunkt neben dem Borderlinetumor ein muzinöses Adenokarzinom. Aktuell leben von den Patientinnen die nachverfolgt werden konnten noch 52 Patientinnen aus dem Untersuchungskollektiv. Das Überleben betrug zwischen null und 22 Jahren mit einem mittleren Überleben von 5,4 Jahren.

86 Fälle insgesamt		
25 Pat. gestorben	Davon:	
	14 tumorunabhängig	
	10 tumorabhängig	
	Davon:	
	6 muzinöse Tumoren	
	3 seröse Tumoren	
	1 gemischt seromuzinöser Tumor	
	1 Fall ohne Information zur Todesart	
9 Pat. ohne Follow-Up		
52 Pat. leben		

Tabelle 5: Auflistung der Daten des Follow-Up

Die histologische Einteilung erfolgte nach den Klassifikationsrichtlinien der UICC und FIGO von 2003. Von den insgesamt 86 Fällen mit Borderlinetumor waren 52 Fälle (60,5%) serös, 31 Fälle muzinös (36,0%), 2 Fälle (2,3%) wurden als gemischt klassifiziert und 1 Fall (1,2%) wurde dem endometrioiden Typ zugeordnet.

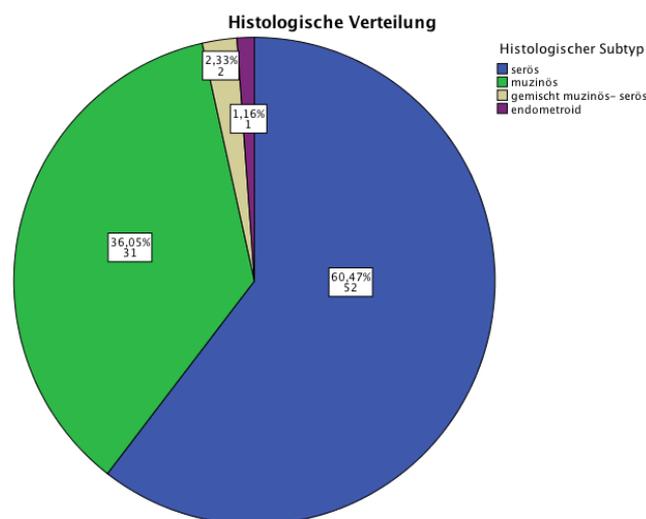


Abbildung 3: Verteilung der histologischen Subtypen

Im Folgenden beispielhaft Bilder je eines serösen und eines muzinösen Falles.

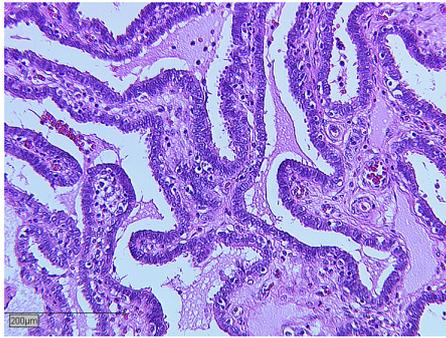


Abbildung 4: Fall 19, HE Färbung, 100 fache Vergrößerung, seröser Borderlinetumor

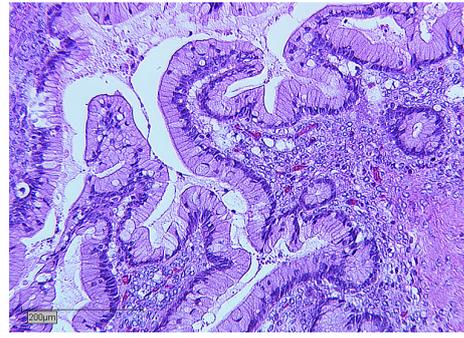


Abbildung 5: Fall 28, HE Färbung, 100 fache Vergrößerung, muzinöser Borderlinetumor

Die Einteilung des Tumorstadiums wurde entsprechend den Leitlinien der AGO nach den FIGO-Kriterien durchgeführt. Wie es für Borderlinetumoren typisch ist, wurde die Diagnose in der überwiegenden Mehrheit der Fälle (65%) bereits im Tumorstadium IA gestellt.

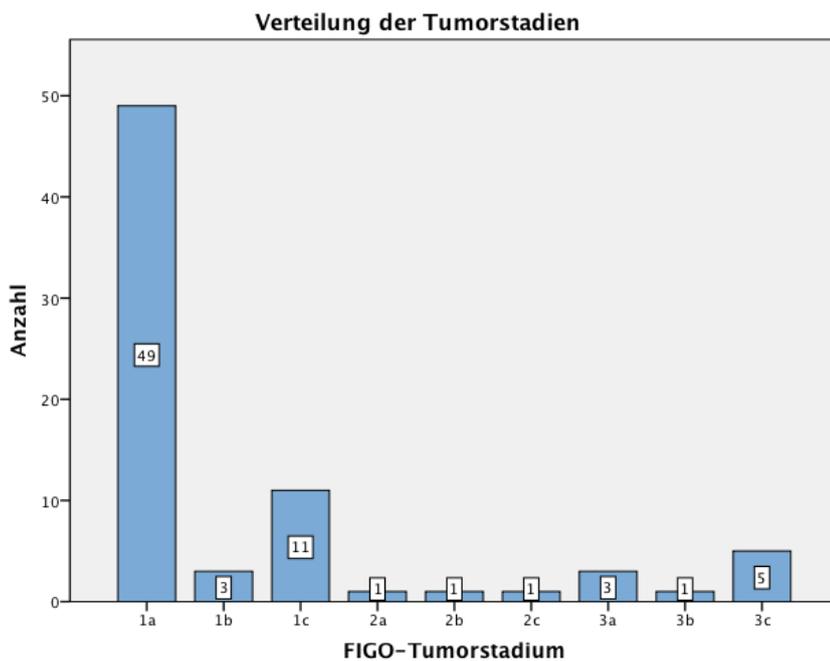


Abbildung 6: Verteilung der Tumorstadien

2.2. Untersuchungsmaterial

Von allen 86 für die Untersuchung ausgewählten Patientinnen standen Paraffinblöcke mit Anteilen des ovariellen Tumorgewebes zur Verfügung. Anhand der dazugehörigen Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitte wurde von jeder Patientin der Paraffinblock mit dem größten Anteil an Borderlinetumor ausgewählt.

2.3. Geräte, Verbrauchsmaterial, Chemikalien

2.3.1. Geräte

Pipetten:	Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop:	Leica DM 2500, Wetzlar, Deutschland
Vollautomatisches Färbesystem:	Ventana Benchmark, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany

2.3.2. GPER

2.3.2.1 Verbrauchsmaterial

Objektträger:	Thermo Scientific Superfrost Plus, Menzel GmbH&Co KG, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser:	Menzel-Gläser, Menzel GmbH&Co KG, Braunschweig, Deutschland
Eindeck-Kitt:	Consul-Mount, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Pipettenspitzen:	Eppendorf Standard, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.3.2.2. Chemikalien

Xylol:	CLN GmbH, Freising, Deutschland
Ethanol:	Klinikapotheke der Universitätsfrauenklinik München, Deutschland
Aqua dest.:	Friedrich Noll, München, Deutschland
H ₂ O ₂ :	Prolabo BDH, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun nach Mayer:	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Chromogensystem:	Liquid DAB, Dako, Carpinteria, CA, USA
PBS:	450g NaCl, Sigma, München, Deutschland 71,65g Na ₂ HPO ₄ , Merck, Darmstadt, Deutschland

13,35g KH₂PO₄, Merck, Darmstadt,
Deutschland
5000 ml Aqua dest., Friedrich Noll,
München, Deutschland

Citrat-Puffer:

Lösung A:
21,01g 0,1 M Citronensäure-Monohydrat,
Merck, Darmstadt, Deutschland
in 1l Aqua dest.
plus
Lösung B:
29,41g Natrium-Citrat, Merck, Darmstadt,
Deutschland
in 1l Aqua dest

2.3.2.3.Färbe/Hybridisierungskit

Detektionssystem:

Vectastain Elite rabbit IgG Kit, Linaris
GmbH, Wertheim, Deutschland

2.3.2.4. Antikörper

Lifespan Biosciences, Biozol Eching, Deutschland; Lot ID: 18386

2.3.3. K-Ras

2.3.3.1.Verbrauchsmaterial

Deckgläser:

Menzel-Gläser, Menzel GmbH & Co KG,
Braunschweig, Deutschland

Eindeckmedium:

Kaisers Glyceringelatine, Merck, Darmstadt,
Deutschland

Pipettenspitzen:

Eppendorf Standard, Eppendorf, Hamburg,
Deutschland

2.3.3.2. Chemikalien

Demaskierungslösung G:

Biologo, Kronshagen, Deutschland, Cat.No.
DE007

Ethanol:

Klinikapotheke der Universitätsfrauenklinik
München, Deutschland

Aqua dest.:

Friedrich Noll, München, Deutschland

H₂O₂:

Prolabo BDH, VWR International GmbH,
Darmstadt, Deutschland

Chromogensystem:

AEC, Dako, Carpinteria, CA, USA, Cat.No.
K3461

Hämatoxylin:

Hematoxylin Gill's Formula, Linaris GmbH,
Wertheim, Deutschland, Cat.No. H-3401

2.3.3.3. Färbe/Hybridisierungskit

Detektionssystem:

Vectastain ABC Kit Elite Universal, Linaris
GmbH, Wertheim, Deutschland

2.3.3.4. Antikörper

Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany, Cat. No. AP15627PU-N

2.3.4. B-Raf

2.3.4.1. Verbrauchsmaterial

Deckgläser:	Menzel-Gläser, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Eindeck-Kit:	Kaisers Glyceringelatine, Merck, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen:	Eppendorf Standard, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.3.4.2. Chemikalien

Epitope Retrieval Solution pH8:	Novocastra, Leica Microsystems, Wetzlar Germany, Cat.No.RE7116
Protein Blocker:	Dako, Carpinteria, CA, USA, Cat.No. X0909
Chromogen:	Chromogen Red, Dako, Carpinteria, CA, USA, entnommen aus Real Detection System APAAP, Cat.No. K5000
Hämatoxylin:	Gill's Formula, Vector Laboratories, California, USA, Cat. No. H-3401

2.3.4.3. Färbe/Hybridisierungskit

Detektionssystem:	MACH 3 Mouse AP Polymer Detection, Biocare, Cat. No. M3M532H)
-------------------	--

2.3.4.4. Antikörper

Spring Bioscience, Basel, Schweiz Cat. No.: E19292

2.4. Immunhistochemische Untersuchung

2.4.1. Grundlagen der Immunhistochemie

Mit den Methoden der Immunhistochemie können in Zellen befindliche Strukturen wie beispielsweise Proteine durch die Bindung und spezifische Färbung von Antikörpern sichtbar gemacht werden. Damit kann gezeigt werden, ob ein bestimmtes Protein in einer Zelle vorhanden ist und gleichzeitig die Lokalisation dieses Proteins in der Zelle bestimmt werden (membranär, nukleär, zytoplasmatisch). Dabei hat sich die Immunhistochemie insbesondere

in der Identifikation und Klassifikation von Tumorzellen bewährt. Zur Untersuchung eignen sich Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel aus Punktaten oder in Zellkulturen gewachsene Zellen, aber auch in Paraffin eingebettete Gewebe, wie sie für diese Arbeit verwendet wurden. Bevor der Antikörper auf das Untersuchungsgut aufgebracht werden kann, müssen verschiedene vorbereitende Schritte unternommen werden, die das Antigen einerseits überhaupt für den Antikörper zugänglich machen, aber auch die Spezifität der Antigen-Antikörper Verbindung erhöhen und die Farbreaktion eindeutig zuweisbar machen. Um die Gewebeschnitte für die verwendeten Chemikalien erreichbar zu machen, muss zunächst das im Gewebe befindliche Paraffin mittels Xylol herausgelöst werden. Außerdem müssen die natürlich vorkommenden Enzyme blockiert werden, die später nicht mehr von den von außen hinzugefügten Enzymen zu unterscheiden sind, aber die lokale Farbreaktion katalysieren und so das Antigen sichtbar machen könnten. Da in dieser Arbeit als Enzym Meerrettichperoxidase verwendet wurde, wurden die endogenen Peroxidasen durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid blockiert.

Außerdem entstehen durch die Formalinfixierung Aldehydverbindungen, die eine Antigen-Antikörper-Verbindung verhindern können. Die Aufhebung dieser Verbindungen erfolgt entweder mittels eines Enzyms (Neuraminidase, Protease, Trypsin) oder durch Hitze in einer Mikrowelle, einem Schnellkochtopf oder in einem Autoklaven und wird auch als „Demaskierung“ genannt.

Zusätzlich werden die Präparate mit Normalserum behandelt, um elektrostatische Ladungen im Gewebe durch die Bindung von Normalserum auszugleichen, sonst könnte der Antikörper auch an diesen elektrostatisch geladenen Stellen binden und damit die Genauigkeit der Färbung beeinflussen. Das Normalserum ist das Serum eines nicht-immunisierten Tieres, das also keine Antikörper gegen das Antigen gebildet hat und ist meist Bestandteil des verwendeten Kits. Gibt man nun den eigentlichen Primärantikörper auf das Präparat bindet er nur an den Stellen, die eine passende Antigenbindungsstelle aufweisen. Dabei ist darauf zu achten, dass das Serum aus der gleichen Spezies sein muss wie der verwendete Primärantikörper.

Die eigentliche Markierung des Antigens erfolgt in der Immunhistochemie häufig mit dem sogenannten ABC-Komplex. Bei der ABC-Methode wird zunächst der gegen das zu färbende Epitop gerichtete Antikörper (Primärantikörper) auf die Schnitte aufgebracht. An diesen ersten Antikörper bindet ein Brückenantikörper (Sekundärantikörper), der biotinyliert, das heißt mit Biotin markiert ist. Anschließend wird der ABC-Komplex zugegeben. Dieser enthält Streptavidin, das mit hoher Affinität an Biotin bindet, und an ein Enzym (zum Beispiel

Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist, das das später verwendete Chromogen oxidieren und damit sichtbar machen wird. Streptavidin ist bereits an drei von vier möglichen Stellen mit biotinylierter Peroxidase besetzt und bindet nun den biotinylierten Sekundärantikörper. Das anschließend zugegebene Chromogen (z.B. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) oder 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)) wird durch die am ABC-Komplex lokalisierte Peroxidase oxidiert und dadurch farbig sichtbar gemacht.

Abschließend werden die Präparate einer Gegenfärbung unterzogen und eingedeckt.

2.4.2. GPER-Färbung

Die immunhistochemische Färbung des GPER erfolgte im immunhistochemischen Labor der Universitätsfrauenklinik der LMU, Maistraße 11, München.

1. Entparaffinierung: 20 min Xylol.
2. Zweifaches Waschen in absolutem Ethanol.
3. Blockierung der endogenen Peroxidase: 20 min in 0,9%igem H_2O_2 in Ethanol
4. Waschen in absteigender Alkoholreihe (100%, 70%, 50%)
5. Aqua dest.
6. Hitzeinduzierte Antigendemaskierung in Citratpuffer: Hierzu wurden die Schnitte in den bereits kochenden Natrium-Citratpuffer mit pH6 gegeben. Der Puffer wurde jeweils kurz vor Gebrauch frisch aus 18 ml Lösung A und 82 ml Lösung B in 900ml Aqua dest. hergestellt. Die Schnitte wurden für 5 min in einem Dampfkochtopf gekocht; nach der Kochzeit wurden die Proben mit Leitungswasser abgekühlt und 10 min in PBS gewaschen.
7. Blockierung der elektrostatischen Ladungen: Inkubation in Blockierungsserum aus dem Vectastain-Kit für 20 min. Dafür wurden drei Tropfen des Blockierungsserums zu 10 ml sterilem PBS zugegeben.
8. Primärantikörper GPER: Verdünnung 1:600 in sterilem PBS, Inkubation für 16h bei 4°C
9. 10 min waschen in PBS
10. Sekundärantikörper: 30 min biotinylierter Sekundärantikörper aus dem Vectastain-Kit (3 Tropfen Normalserum auf 1 Tropfen Anti-rabbit-IgG plus 10 ml PBS)
11. 10 min waschen in PBS
12. ABC-Komplex: 30 min

13. DAB-Substratfärbung: 2 gtt DAB Chromogen auf 2ml DAB-Puffer für 30s
14. Reinigung in Aqua dest.
15. Gegenfärbung: 2 min in saurem Hämalaun nach Mayer. Das Bläuen und Herauswaschen der Säurereste fand in fließendem Leitungswasser statt und dauerte 5 min.
16. Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis Xylol
17. Eindecken: Consul-Mount

Als Positivkontrollen wurden Mammakarzinome mitgeführt.

2.4.3. K-Ras

Die immunhistochemische Färbung des K-Ras erfolgte im immunhistochemischen Labor der Pathologie der LMU, Thalkirchnerstraße 36, München.

1. Entparaffinierung: 20 min Xylol
2. Antigendemaskierung: Mikrowelle bei 750 W, 2 x 15 min, gleichzeitige Inkubation mit Demaskierungslösung G
3. Waschen: 2 x 5 min TRIS-Puffer, pH7,5
4. Blockierung der endogenen Peroxidase: 10 min in 7,5%igem, wässrigen H₂O₂
5. Waschen für 10 min in fließendem Wasser, 2 x 5 min TRIS-Puffer
6. Blockierung der elektrostatischen Ladungen: 20 min Blockierungsserum aus dem Vectastain-Kit
7. Primärantikörper K-Ras: Verdünnung 1:100, Dauer: 10 min bei Raumtemperatur
8. Waschen: 2 x 5min TRIS-Puffer
9. Sekundärantikörper: 30 min biotinylierter Sekundärantikörper aus dem Vectastain-Kit
10. Waschen: 2 x 5min TRIS-Puffer
11. ABC-Komplex: 30 min ABC-Komplex aus dem Vectastain-Kit
12. Waschen: 2 x 5min TRIS-Puffer
13. Chromogenfärbung: 10 min AEC+
14. Waschen: 10 min in fließendem Wasser
15. Gegenfärbung: 10 s Hematoxylin Gill's Formula
16. Waschen: 10 min in fließendem Wasser
17. Eindecken: Kaiser's Glyceringelatine

2.4.4. B-Raf

Die immunhistochemische Färbung des B-Raf erfolgte zunächst vollautomatisch. Aufgrund unspezifischer Färbereaktionen wurde dieser Versuch verworfen und eine erneute Färbung ebenfalls im immunhistochemischen Labor der Pathologie der LMU, Thalkirchnerstraße 36, München durchgeführt.

1. Entparaffinierung: 20 min Xylol
2. Vorbehandlung:
 - a. Mikrowelle 750W: Epitope Retrieval Solution pH8
 - b. Kochzeit: 2x15 min
 - c. 20 min bei RT abkühlen lassen
3. 2x5 min spülen in TRIS-Puffer pH7,5
4. 10 min Proteinblock
5. Überstand abkippen
6. Primär-Antikörper BRAF 1:50 in Antibody Diluent V
7. Inkubationszeit: 60 min bei Raumtemperatur
8. 2x5 min spülen in TRIS-Puffer
9. 30 min MACH 3 Probe
10. 2x5 min waschen in TRIS-Puffer
11. 30 min MACH 3 AP-Polymer
12. 2x5 min waschen in TRIS-Puffer
13. Chromogen: 10 min Chromogen Red
14. 10 min fließend wässern
15. Gegenfärbung: 10 s Hematoxylin Gill's Formula
16. 10 min fließend wässern
17. Eindecken: Kaisers Glyceringelatine

2.5. Auswertung

2.5.1. Klassifizierung nach Remmele und Stegner

Für jeden Fall wurden immunhistochemische Reaktionen jeweils für K-Ras, B-Raf und GPER vorgenommen, um die Expression der dazugehörigen Proteine zu untersuchen. Die Auswertung der Ergebnisse aller Färbungen erfolgte nach dem von Remmele und Stegner

vorgeschlagenen Schema (Remmele et al., 1987). Der Score errechnet sich aus dem Produkt der Intensität der Färbung (0-3) und dem prozentualen Anteil der positiven Zellen (0-4) (siehe Abbildung 5) und erreicht somit einen Wert zwischen 0 und 12. Als positive Expression wurden, analog der beim Mammakarzinom etablierten Hormonrezeptor-Auswertung, IR-Score-Werte >2 gewertet.



Abbildung 7: Einteilung der Prozentangaben für den Score nach Remmele und Stegner aus <https://www.pathologie-vechta.de>, abgerufen am 12.11.2015

Der für diese Untersuchung verwendete B-Raf Antikörper wurde von Capper et al. 2011 als B-Raf V600E mutationsspezifischer Antikörper für die Verwendung in der Immunhistochemie beschrieben. Capper et al. werteten eine Färbung positiv, wenn eine eindeutige zytoplasmatische Färbung für einen bedeutenden Teil der in Betracht kommenden Tumorzellen beobachtet werden konnte. In den positiven Fällen wurde eine Aufteilung in schwache, mittlere und starke Färbung durchgeführt. Eine diffuse Färbung, isolierte nukleäre Färbungen, einzeln vorliegende angefärbte Zellen und die Färbung von Makrophagen und Monozyten wurden als negativ gewertet (Capper et al., 2012). Diese Art der Auswertung ist vergleichbar mit dem für diese Arbeit verwendeten Remmele-Score.

Da die immunhistochemische Färbung von K-Ras und GPER an ovariellen Gewebe bisher noch nicht etabliert war, stand keine standardisierte Auswertungsmethode zur Verfügung. In vergleichbaren Untersuchungen wurde für die immunhistochemische Bewertung von K-Ras Färbungen entweder eine Quantifizierung nach der Menge der positiven Zellen in Prozent (Apple et al., 1999) oder nach der Intensität der Färbung (Malhotra et al., 2013) vorgenommen, was eine ähnliche qualitative Auswertungsmethode wie der in dieser Arbeit verwendete Remmele-Score darstellt.

Für die Auswertung des Scores des GPER stellte sich das Problem der genauen Lokalisation dieses Rezeptors. Wie bereits unter 1.3.2.3 dargestellt, ist die Lokalisation noch nicht eindeutig geklärt. Zwar wird er häufig als mit der Zellmembran assoziiert beschrieben, ist jedoch auch nukleär oder am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert beschrieben worden (Tian et al, 2013). In dieser Arbeit wurden diesbezüglich keine Unterscheidung eingeführt.

2.5.2. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistik-Programm SPSS Version 20. Zur Anwendung kamen Korrelationsanalysen nach Spearman. Zur Berechnung des Überlebens wurden Kaplan-Meier Kurven angefertigt, deren Signifikanz durch den Log Rank Test bestätigt wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Auswertbarkeit der Untersuchung

Für alle 86 Fälle wurden jeweils immunhistochemische Färbungen mit B-Raf, K-Ras und GPER durchgeführt und nach dem IR-Score ausgewertet. Ein Fall, bei dem aufgrund schlechter Erhaltung des Paraffinblocks keine immunhistochemische Färbung durchgeführt werden konnte wurde komplett ausgeschlossen.

3.2. Ergebnisse der immunhistochemischen B-Raf Färbungen

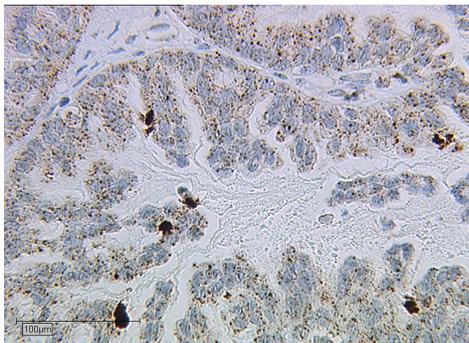


Abbildung 8: Fall 86, vollautomatische B-Raf Färbung, 200-fache Vergrößerung

Die immunhistochemische Färbung von B-Raf erfolgte zunächst vollautomatisch (VentanaBenchmark). Bei dieser Färbung zeigten sich unspezifische Färbereaktionen sowie eine starke Hintergrundfärbung (siehe Abbildung 8). Daher wurde eine erneute Färbung mit einem manuellen System durchgeführt. Die Ergebnisse der manuellen Färbung ergaben eine positive

Expression von B-Raf in 13 von 52 Fällen seröser Tumoren (25%). Sowohl die 31 muzinösen Tumoren als auch die beiden Fälle gemischter Tumoren und der eine endometrioiden Tumor zeigten keine Expression von B-Raf. Abbildung 9 und Abbildung 10 geben zwei Beispiele für die Auswertung der Färbeintensität.

Abbildung 10 wurde mit einem IR-Score von 12 bewertet, Abbildung 9 mit einem IR-Score von 0.

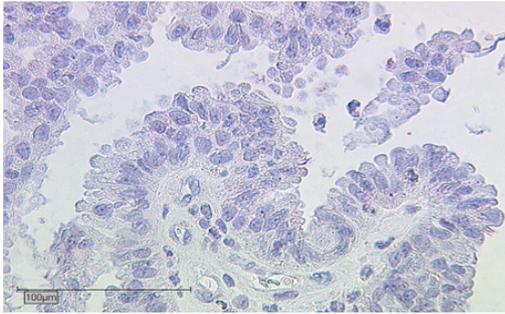


Abbildung 9: Fall 1, B-Raf, 200 fache Vergrößerung, IR-Score 0

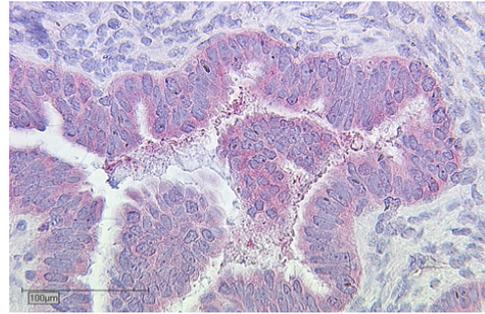


Abbildung 10: Fall 76, B-Raf, 200-fache Vergrößerung, IR-Score 12

B-Raf (IR-Score)	Negativ (0-2)	Positiv (3-12)
Serös (Fallzahl)	75,0% (39)	25,0% (13)
Muzinös	100% (31)	0% (0)
Gemischt	100% (2)	0% (0)
endometrioid	100% (1)	0% (0)
Gesamt	84,9% (73)	15,1% (13)

Tabelle 6: Ergebnisse der B-Raf Färbung

3.3. Ergebnisse der immunhistochemischen K-Ras Färbungen

Alle 86 Fälle konnten ausgewertet werden, es zeigte sich eine positive Expression von K-Ras bei 35 von 52 Fällen seröser Tumoren (67,3%) und in 21 von 31 Fällen muzinöser Tumoren (67,7%). Die gemischt muzinös-serösen Tumoren zeigten beide eine positive Expression, während der eine endometrioiden Fall keine Expression von K-Ras zeigte. Die Abbildungen 11 und 12 zeigen beispielhaft zwei Fälle mit stärkster und schwächster Färbung.

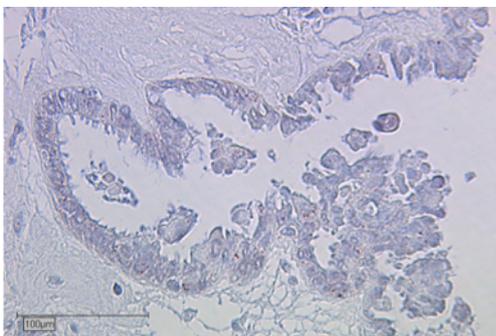


Abbildung 11: Fall 24, K-Ras, 200-fache Vergrößerung, IR-Score 0

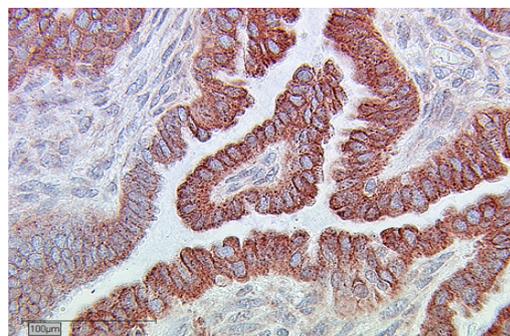


Abbildung 12: Fall 76, K-Ras, 200-fache Vergrößerung, IR-Score 12

K-Ras (IR-Score)	Negativ (0-2)	Positiv (3-12)
Serös (Fallzahl)	32,7% (17)	67,3% (35)
Muzinös	32,3% (10)	67,7% (21)
Gemischt	0% (0)	100% (2)
endometrioid	100% (1)	0% (0)
Gesamt	32,6% (28)	67,4% (58)

Tabelle 7: Ergebnisse der K-Ras Färbung

3.4. Korrelation der Expression von K-Ras und B-Raf

In den Fällen Nummer 20, 45, 48, 49, 59, 62, 74, und 76 ergab sich eine gleichzeitige positive Expression von K-Ras und B-Raf. Somit schlossen sich in der vorliegenden Arbeit die Expression beider Proteine in 90,7% der Fälle aus, die acht Fälle die für beide Proteine eine positive Expression zeigten, waren alle vom serösen Typ.

3.5. Ergebnisse der immunhistochemischen GPER Färbungen

Die immunhistochemische Färbung des GPER zeigte in allen Fällen eine positive Expression des GPER sowie eine vollständige Färbung des Tumorgewebes, sodass sich die Färbung des GPER auf die drei Stufen 4, 8 und 12 des IR-Score reduziert. Beispielhaft zwei Fälle mit stärkster und schwächster Färbung in Abbildungen 13 und 14.

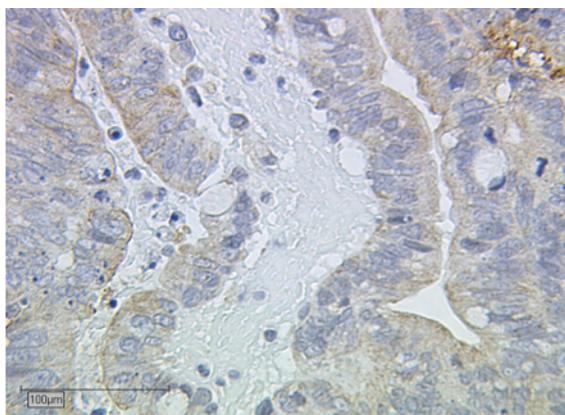


Abbildung 13: Fall 54, GPER, 200-fache Vergrößerung, IR-Score 4

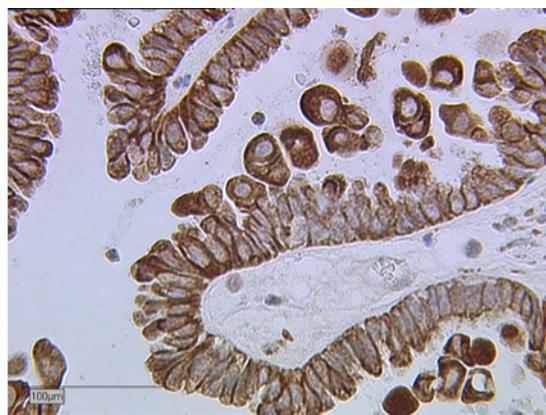


Abbildung 14: Fall 4, GPER, 200-fache Vergrößerung, IR-Score 12

GPER IR-Score	Negativ (0-2)	Positiv (3-12)
Serös	0%	100% (52)
Muzinös	0%	100% (31)
Gemischt	0%	100% (2)
endometrioid	0%	100% (1)
Gesamt	0%	100% (86)

Tabelle 8: Ergebnisse der GPER-Färbung

Im Folgenden eine Fallaufstellung mit den Ergebnissen der Immunhistochemie und den Follow-Up-Daten:

Fall	Alter bei ED	Histotyp	IRS B-Raf	IRS K-Ras	IRS GPER	Status	Jahre Follow-Up
1	56	serös	0	6	12	lebt	20
2	88	serös	0	0	12	tot	14
3	62	muzinös	0	4	12	lebt	19
4	30	serös	2	4	12	lebt	22
5	74	muzinös	0	0	8	tot	9
6	72	muzinös	0	2	8	lebt	12
7	74	muzinös	0	6	8	lebt	16
8	76	gemischt	0	3	12	lebt	12
9	36	serös	0	2	8	lebt	11
10	48	serös	0	8	12	tot	4
11	56	serös	0	6	8	lebt	11
12	67	serös	0	4	8	tot	6
13	58	muzinös	0	3	8	lebt	10
14	52	serös	0	12	12	lebt	8
15	63	serös	0	6	12	lebt	5
16	69	endometrioid	0	1	8	tot	12
17	59	serös	0	8	8	lebt	12
18	68	gemischt	0	3	12	tot	0
19	30	serös	4	2	12	lebt	11
20	57	serös	0	6	12	lebt	7
21	77	serös	0	6	12	tot	8
22	37	muzinös	0	8	8	tot	3
23	54	muzinös	0	1	8	lebt	6
24	23	serös	0	0	12	lebt	0
25	58	serös	0	0	8	lebt	10
26	39	muzinös	0	8	12	tot	6
27	47	muzinös	0	6	12	tot	1
28	62	muzinös	0	6	8	lebt	9
29	31	serös	0	0	12	lebt	9
30	43	serös	0	1	12	tot	8
31	72	serös	0	0	8	tot	1
32	37	muzinös	0	1	12	lost	

33	20	serös	4	6	12	lost	
34	20	serös	4	1	12	lebt	4
35	25	serös	0	1	12	lost	
36	34	serös	0	2	12	lebt	3
37	36	serös	4	0	12	lebt	1
38	43	serös	0	0	8	tot	3
39	47	serös	0	2	12	tot	5
40	55	serös	0	0	8	tot	1
41	67	serös	4	2	12	tot	3
42	55	muzinös	0	4	12	lebt	8
43	66	muzinös	0	0	4	tot	1
44	76	muzinös	0	4	12	lost	
45	36	serös	4	3	12	lebt	0
46	50	serös	0	6	12	lebt	3
47	51	serös	4	2	12	lebt	2
48	52	serös	3	4	12	lebt	6
49	62	serös	4	8	8	lost	
50	71	serös	0	8	12	tot	1
51	38	muzinös	0	0	8	tot	2
52	43	muzinös	0	0	8	lost	
53	54	muzinös	0	2	8	lebt	7
54	56	muzinös	0	4	4	tot	2
55	58	muzinös	0	0	8	lebt	3
56	66	muzinös	0	4	12	tot	4
57	79	muzinös	0	1	8	tot	3
58	75	serös	0	6	8	lost	
59	21	serös	4	6	8	lebt	7
60	41	serös	0	6	12	lebt	2
61	51	serös	0	8	12	lebt	1
62	58	serös	6	4	12	lebt	1
63	60	serös	0	4	8	lebt	0
64	61	serös	0	8	8	lebt	2
65	63	serös	0	12	8	lebt	2
66	64	serös	0	6	8	tot	2
67	75	serös	0	4	8	lost	
68	35	muzinös	0	8	8	lost	
69	64	serös	0	12	8	lebt	0
70	40	muzinös	0	4	8	lebt	0
71	34	serös	0	8	8	lebt	11
72	18	muzinös	0	8	8	lebt	0
73	50	muzinös	0	8	8	lebt	0
74	37	serös	6	12	12	lebt	4
75	41	serös	0	8	8	lebt	3
76	45	serös	12	12	12	lebt	3
77	50	serös	0	3	8	tot	2
78	51	serös	0	12	12	lebt	5

79	55	serös	0	8	12	lebt	0
80	75	serös	1	12	12	lebt	4
81	35	muzinös	0	12	8	lebt	5
82	41	muzinös	0	6	8	lebt	5
83	60	muzinös	0	8	12	lebt	5
84	63	muzinös	0	8	8	lebt	5
85	84	muzinös	0	12	12	tot	0
86	48	muzinös	0	9	8	lebt	3

Tabelle 9: Fallaufstellung mit Ergebnissen

3.6. Korrelationen von K-Ras, B-Raf und GPER

Insgesamt zeigte sich in 58 Fällen eine positive Expression von K-Ras, in 13 Fällen eine positive Expression von B-Raf und in allen 86 Fällen eine positive Expression von GPER. Eine mit Spearman's Korrelationskoeffizienten durchgeführte Korrelationsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten zwischen K-Ras und B-Raf von 0,133, und damit keine Signifikanz. Eine Korrelationsanalyse zwischen B-Raf und K-Ras mit GPER ist bei einer 100%igen Positivität des GPER nicht sinnvoll.

3.7. Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von GPER, K-Ras und B-Raf

Für die Berechnung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden die Fälle ausgeschlossen, bei denen gleichzeitig ein Ovarialkarzinom und ein Borderlinetumor auftraten. Zum einen ist in diesen Fällen nicht sicher zu sagen, ob eine Progression des Tumors auftrat und zum anderen zeigen ovarielle Karzinome ein deutlich schlechteres Überleben, sodass die Ergebnisse einer solchen Auswertung verfälscht wären. Ausgeschlossen wurden folglich die Fälle 10, 18, 26, 30, 39, 43, 54 und 85.

3.7.1. Überleben in Abhängigkeit von GPER

Die durchgeführten Analysen zur Abhängigkeit des Überlebens von der Expression des GPER zeigten im Log-Rank-Test ein positives Chi-Quadrat von 0,810 mit einem Signifikanzniveau von 0,368.

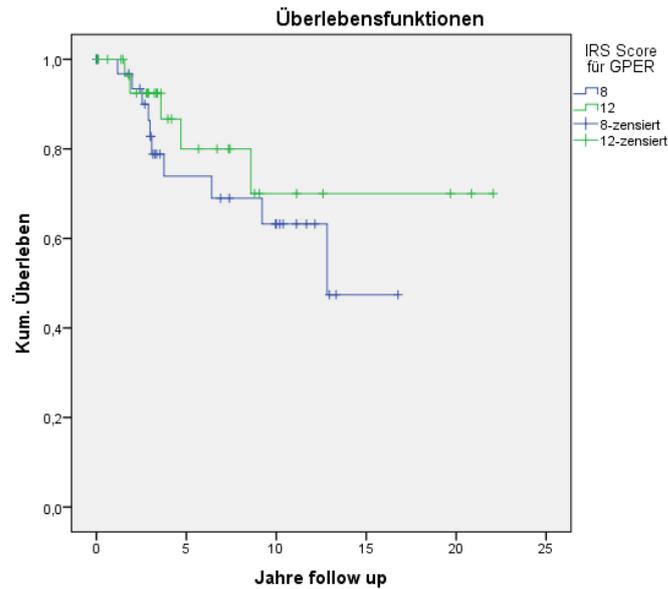


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von GPER

3.7.2. Überleben in Abhängigkeit von K-Ras

Die durchgeführten Analysen zur Abhängigkeit des Überlebens von der Expression des K-Ras zeigten im Log-Rank-Test ein positives Chi-Quadrat von 1,415 mit einem Signifikanzniveau von 0,234.

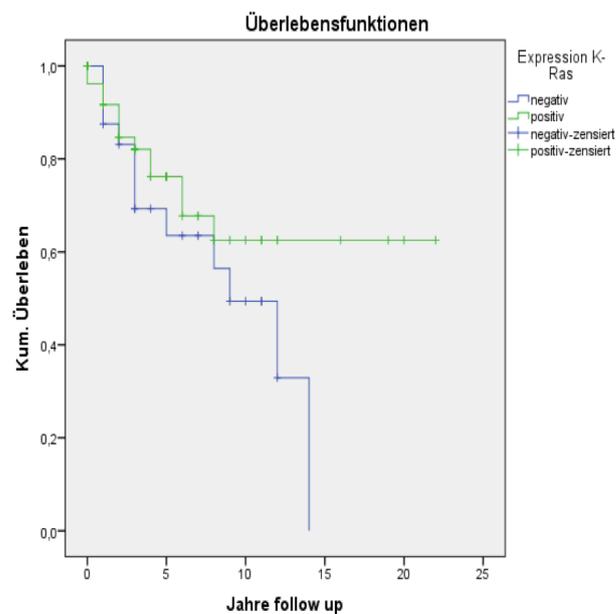


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von K-Ras

3.7.3. Überleben in Abhängigkeit von B-Raf

Die durchgeführten Analysen zur Abhängigkeit des Überlebens von der Expression des K-Ras zeigten im Log-Rank-Test ein positives Chi-Quadrat von 0,17 mit einem Signifikanzniveau von 0,897.

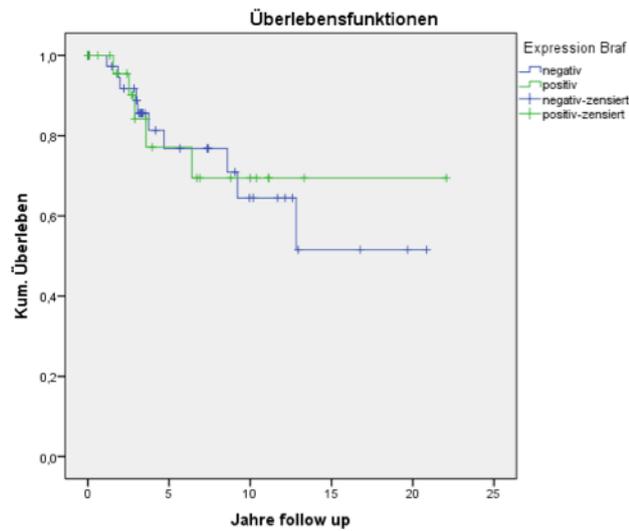


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von B-Raf

4. Diskussion

4.1. Ausblick auf therapeutische Optionen in der Therapie ovarieller Tumoren

Bei den serösen epithelialen Tumoren des Ovars handelt es sich histologisch in etwa 2% der Fälle um Borderlinetumoren, während 78% benigne Tumoren und 20% invasive Karzinome darstellen (Boyd et al., 2013). Dabei nehmen seröse ovarielle Borderlinetumoren aufgrund ihrer molekularbiologischen Eigenschaften eine besondere Rolle in der Erforschung der Pathogenese ovarieller Neoplasien ein, da sie zwar histomorphologisch eine Zwischenstufe, aber tumorgenetisch nur bei den Low-grade (Typ I Tumoren) eine Zwischenstufe zwischen benignen Tumoren und malignen Low-grade Tumoren darstellen.

Dafür sprechen Mutationsanalysen in serösen ovariellen Neoplasien, die innerhalb der Typ-I genannten Tumoren in zwei Drittel der Fälle Mutationen von B-Raf oder K-Ras nachgewiesen haben, im Gegensatz zu einer Typ-II genannten Tumorkategorie die statt K-Ras- und B-Raf-Mutationen typischer Weise Mutationen von p53 aufweisen (Boyd et al., 2013, Dehari et al., 2007). Dieses duale Klassifikationssystem geht für die serösen Typ-I Tumoren von einem Tumorprogressionsmodell aus, in dessen Verlauf sich aus Zystadenomen nicht-invasiv wachsende mikropapilläre Borderlinetumoren und invasiv wachsende Low-grade Karzinome entwickeln. Davon werden deutlich die als Typ-II klassifizierten Tumoren unterschieden, deren Entstehung aus dem Fimbrienkranz der Tube oder *de-novo* diskutiert wird. Diese Tumoren weisen völlig andere Mutationshäufigkeiten auf (Nik et al., 2014, Vang et al 2009).

Muzinöse Borderlinetumoren stellen dagegen eine seltenere Entität mit deutlich besserer Prognose dar als seröse Borderlinetumoren, weshalb deutlich weniger Forschung zu diesem Thema betrieben wird (Kurman et al., 2013). Sowohl benigne muzinöse Tumoren, Borderlinetumoren als auch muzinöse Karzinome werden wegen ihres gutartigen Verlaufs zu den Typ I Tumoren gezählt. Aufgrund der auffallenden Heterogenität innerhalb der muzinösen Tumoren und dem Nachweis derselben Mutation von K-Ras in nebeneinander liegenden Arealen unterschiedlicher Dignität geht man bei muzinösen Tumoren des Ovars von einer sequenziellen malignen Transformation aus, bei der die Mutation von K-Ras einen frühen Schritt in der Karzinogenese darstellt (Gemignani et al., 2003, Hart et al., 2005, Lax et al., 2014). Die Mutation von B-Raf findet sich bei muzinösen Tumoren nicht.

Die Aufklärung der Pathogenese und die Einteilung der Entitäten in pathogenetisch passende Kategorien ist ein wichtiges Anliegen, da eine eindeutige Festlegung des Tumortyps eine im Sinne der personalisierten Medizin auf die jeweiligen Patientinnen zugeschnittene Therapie ermöglichen könnte. Dies würde eine entscheidende Verbesserung der Therapieoptionen bedeuten (Vang et al., 2009). Für Patientinnen mit Borderlinetumoren oder serösen Low-grade Karzinomen, die ohnehin aufgrund ihrer niedrigen Proliferationsrate ein schlechtes Ansprechen auf Chemotherapie zeigen (Kurman, 2013) könnten beispielsweise Inhibitoren von B-Raf, K-Ras und MAP/ERK-Kinasen (MEK) eine Therapieoption darstellen (Jones et al., 2012). So zeigten Pohl et al. 2005, dass die Inhibition der MEK durch CI-1040 eine deutliche Wachstumsinhibition sowie gesteigerte Apoptose bei ovariellen Tumoren bewirken kann (Pohl et al., 2005). Auf dem Markt befindet sich mit Vemurafenib bereits ein spezifischer B-Raf Inhibitor, der als Tyrosinkinaseinhibitor nur bei Patienten mit malignem Melanom eingesetzt wird und der EGFR-Inhibitor Cetuximab, der als monoklonaler Antikörper gegen den EGF-Rezeptor bei Patienten mit Kolonkarzinomen Einsatz findet. Für die Verwendung beider Medikamente ist die Kenntnis des Mutationsstatus zwingende Voraussetzung, da Vemurafenib nur bei Mutation von B-Raf wirkt und Cetuximab nur bei Wildtyp des EGF-Rezeptors. Daher ist für den sinnvollen Einsatz dieser neuen Therapieoptionen eine einfache, schnelle und kostengünstige Routine-Diagnostik des B-Raf und K-Ras Mutationsstatus wünschenswert. Hier könnte die Immunhistochemie eine schnelle und kostengünstige methodische Vorstufe zur zeitintensiveren Mutationsanalyse darstellen, und einen schnellen Therapiebeginn ermöglichen. Zudem erlaubt die Immunhistochemie eine Visualisierung des Expressionsmusters im Tumor und kann auch für das Screening von großen Tumorarealen eingesetzt werden. Die immunhistochemische Analyse könnte auch in Situationen von Vorteil sein, in der keine Mutationsanalyse durchführbar ist, wie zum Beispiel bei schlechter Qualität oder Quantität der extrahierten DNA oder bei großen Arealen mit Tumornekrose (Capper et al., 2011).

4.2. B-Raf

Von Capper et al. wurde 2011 der B-Raf V600E mutationsspezifische Antikörper VE1 beschrieben, dessen Sensitivität und Spezifität für die Immunhistochemie bisher vor Allem in intrazerebralen Melanometastasen und papillären Schilddrüsenkarzinomen getestet wurde. Hier zeigte sich eine exzellente Korrelation von Gensequenzierung und Immunhistochemie, die auch in anderen Arbeiten bestätigt werden konnte (Capper et al., 2012, Ilie et al., 2012;

Long et al., 2013; Koperek et al., 2012; Skorokhod et al., 2012). An serösen ovariellen Tumoren durchgeführte vergleichende Untersuchungen zeigten ebenfalls eine hohe Sensitivität und Spezifität der Immunhistochemie im Vergleich zu Allel-spezifischer PCR (Bösmüller et al., 2012).

Die für diese Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen mit dem VE1 mutationsspezifischen B-Raf Antikörper wurden zunächst vollautomatisch durchgeführt. Bei dieser Färbung zeigte sich eine starke Hintergrundfärbung (siehe Abbildung 8) sowie eine Positivität von muzinösen Tumoren die in der Literatur nicht beschrieben wird. Aufgrund dieser zweifelhaften Ergebnisse wurden diese Ergebnisse verworfen und stattdessen eine manuelle Färbung durchgeführt, die eine eindeutige Negativität aller muzinösen Tumoren zeigte sowie deutlich spezifischere Ergebnisse aufwies.

In der manuellen Färbung zeigte sich eine positive Expression von mutiertem B-Raf in 25% der serösen Tumoren, sowie eine 100%ige Negativität bei muzinösen, endometrioiden und gemischten Borderlinetumoren. Shi et al. zeigten 2004 eine ähnliche B-Raf Expressionsrate von 28% bei serösen Borderlinetumoren (Shi et al., 2004).

Somit ist es in dieser Arbeit gelungen, den mutationsspezifischen B-Raf-Antikörper VE1 in der manuellen immunhistochemischen Färbung von ovariellen Borderlinetumoren zu etablieren. Als interne Kontrolle stand der Fall eines ovariellen Karzinoms zur Verfügung, der in dem Referenzlabor für Ras/Raf-Mutationen am pathologischen Institut der LMU B-Raf positiv getestet wurde. Die an diesem Fall durchgeführte Immunhistochemie nach dem für diese Arbeit verwendeten Protokoll zeigte ebenfalls eine deutliche Positivität und bestätigt damit die Annahme einer spezifischen Färbung des mutierten B-Raf. Weitere Forschung, insbesondere ausführlichere Vergleiche zwischen Immunhistochemie und Mutationsanalysen werden nötig sein, um die Immunhistochemie als sichere Methode zur Feststellung des B-Raf-Mutationsstatus zu etablieren.

Die medikamentöse Behandlung von Tumoren mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Vemurafenib wird bei Mutation des Protoonkogens B-Raf in Malignen Melanomen bereits durchgeführt und steht auch für die Behandlung von anderen gleichartig mutierten Tumoren, wie serösen Borderlinetumoren, an. Hierzu ist, wie oben bereits ausgeführt, die Kenntnis des Mutationsstatus zwingende Voraussetzung, sodass eine routinemäßige Untersuchung von Tumorgewebe auf den Mutationsstatus notwendig werden wird. Hierzu wäre eine spezifische, vollautomatische Färbung mit dem mutationsspezifischen B-Raf Antikörper V600E die schnellste und kostengünstigste Diagnostik.

4.3. K-Ras

Die Veröffentlichungen zur immunhistochemischen Färbung von K-Ras weisen eine deutlich geringere Dynamik auf, als die durch die neue Verfügbarkeit eines mutationsspezifischen Antikörpers beflügelte Forschung zur Immunhistochemie von B-Raf. Lediglich eine Arbeit beschreibt die Verwendung eines K-Ras Antikörpers für immunhistochemische Färbungen bei Adenokarzinomen des Pankreas (Jeong et al., 2005).

In dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster von K-Ras mittels immunhistochemischer Färbung untersucht, nicht jedoch die Mutationshäufigkeit. Über eine häufige Mutation von K-Ras in muzinösen Borderlinetumoren wurde verschiedentlich berichtet (Mayr et al., 2006, Lax et al., 2014), die Mutationshäufigkeit wurde meist mit größer 60% beziffert. In dieser Arbeit zeigten 21 von 31 Fällen (67,7%) eine positive Expression und somit eine ähnliche Häufigkeit der Expression wie für die Mutation von K-Ras bei muzinösen Tumoren angegeben wird. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass eine Korrelation zwischen Mutation und Expressionshäufigkeit besteht. Bei den serösen Tumoren werden in der Literatur sehr unterschiedliche Zahlen für die Mutationshäufigkeit genannt, die Werte schwanken zwischen 30% und 60% (Bösmüller et al., 2012, Ho et al., 2004). Die Auswertung der Färbungen dieser Arbeit zeigten eine Expression von K-Ras in 35 von 52 Fällen (67,3% der Fälle), und liegt damit relativ hoch. Ob dieses Ergebnis einer unspezifischen Färbung geschuldet ist, die zu einer ähnlichen Expressionshäufigkeit bei muzinösen und bei serösen Tumoren führt muss weiter untersucht werden. Dazu müssten innerhalb der gleichen Fälle vergleichende Untersuchungen von Mutationsanalyse und Immunhistochemie durchgeführt werden. Zur Verfügung stehende Fälle, die bereits im hausinternen Referenzlabor für Ras- und Raf-Mutationen als K-Ras-mutiert getestet wurden, wurden vergleichend nach dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll immunhistochemisch gefärbt. Es zeigte sich, in dieser für weitere Rückschlüsse deutlich zu kleinen Fallgruppe, in fünf von sieben Fällen eine positive Immunhistochemie. Ausführlichere vergleichende Analysen zwischen Immunhistochemie und Mutationsanalysen sind deswegen für die Etablierung der Immunhistochemie von K-Ras an ovariellen Borderlinetumoren genauso notwendig wie auch für B-Raf.

4.4. Ras und Raf

Die bisher durchgeführten Mutationsanalysen zu B-Raf und K-Ras zeigten, dass sich die beiden Mutationen in den meisten Fällen gegenseitig ausschließen (Vang et al., 2009). Die in

dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen konnten dies bestätigen: Die Expression von K-Ras und B-Raf schloss sich in 90,7% der Fälle an, lediglich acht Fälle, alle vom serösen Typ, zeigten eine gleichzeitige Expression beider Proteine.

4.5. GPER

Neben den bekannten Östrogen-Rezeptoren ER α und ER β wurde in jüngster Zeit ein G-Protein gekoppelter Östrogen-Rezeptor (GPER) beschrieben, der neben der Expression in Plazenta, Herz, Lunge, Leber, Prostata (Jala et al., 2012) auch in Karzinomgewebe von Schilddrüse, Brust und Ovar (Wang et al., 2010) sowie in physiologischem ovariellen Gewebe nachgewiesen werden konnte (Heublein et al., 2012). Fraglich ist bisher die Wirkung und Bedeutung des GPER in physiologischem Gewebe und in der Tumorforschung. Geht dem Tumorgeschehen eine Veränderung der GPER-Expression voraus? Oder folgt die veränderte GPER-Expression der Entstehung einer Neoplasie?

Die Arbeitsgruppe um Filardo et al. konnte 2002 zeigen, dass der GPER in der Koordination der auf den EGF-Rezeptor folgenden Signalwege eine Rolle spielt. Hier scheint der GPER via einer Aktivierung der Adenylyl-Zyklase eine hemmende Wirkung auf cAMP zu haben und so eine Senkung der Aktivität von ERK1 und ERK2 zu induzieren und damit die Zellproliferation zu hemmen (Filardo et al., 2002, *Molecular Endocrinology*). Andere Ergebnisse deuten auf eine Transaktivierung von GPER30 und EGFR hin, die in ihrer vereinten Wirkung eine Proliferationsinduktion nach sich ziehen (Lappano et al., 2013).

In dieser Arbeit konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass der GPER in 100% aller für diese Untersuchung zur Verfügung stehenden ovariellen Borderlinetumoren exprimiert wird. Dies passt zu den Ergebnissen von Ignatov et al., 2013, die eine Expression von GPER in 97% der Borderlinetumoren nachgewiesen haben. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde der auch für die anderen Färbungen in dieser Untersuchung verwendete Score nach Remmele und Stegner angewandt. Es zeigte sich eine durchgehende Färbung aller Tumor-Zellen, mit einem mittleren IR-Score von 9,9. Eine mit Spearman's Korrelationskoeffizienten durchgeführte Korrelationsanalyse ergab keine Korrelation zwischen den durchgeführten immunhistochemischen Färbungen von B-Raf bzw. K-Ras und GPER. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von K-Ras und B-Raf im Tumorgeschehen des ovariellen Borderlinetumors unabhängig von der Expression des GPER ist, könnte aber auch ein

Argument für die These sein, dass der GPER als Folge der Hyperproliferation nach Mutationen im EGFR-Signalweg exprimiert wird (Albanito et al., 2008) oder ausgleichend auf die Proliferation von neoplastischem Gewebe einwirkt (Filardo et al. 2002, Journal of steroid biochemistry).

4.6. Interpretation der Follow-Up-Daten

4.6.1. Überleben bei ovariellen Borderlinetumoren in dieser Untersuchung

Patientinnen mit serösen Borderlinetumoren haben im Gegensatz zu Patientinnen mit einem High-grade Karzinom eine exzellente Prognose mit (bei FIGO-Stadium I) der gleichen Lebenserwartung wie der Normalbevölkerung (Kurman et al., 2014). Muzinöse Borderlinetumoren und muzinöse Ovarialkarzinome werden wie die serösen Borderlinetumoren ebenfalls zur Gruppe der Low-grade Neoplasien gezählt und zeigen ein Langzeitüberleben von 99% (Lax et al, 2014).

Diese Literaturwerte spiegeln sich auch in dem für diese Arbeit untersuchten Kollektiv wider: Die Auswertung der Tumordatenbank ergab, dass von den 86 Patientinnen neun Fälle für das Follow-Up verloren gingen, 52 Patientinnen noch leben und insgesamt 25 gestorben sind, davon 14 tumorunabhängig. In einem Fall konnten keine Informationen zur Todesursache gefunden werden (Fall 31). Als tumorabhängiges Sterben wurden die zehn Fälle gewertet, die im späteren Verlauf an dem Borderlinetumor verstarben (Fälle 22 und 51) oder gleichzeitig bzw. im Verlauf ein Ovarialkarzinom diagnostiziert wurde (Fälle 10, 18, 26, 30, 39, 43, 54, 85). Davon zeigten sechs Fälle einen muzinösen (22, 26, 43, 51, 54, 85) und ein Tumor einen gemischten sero-muzinösen Histotyp (Fall 18). In drei Fällen zeigte sich ein seröser Histotyp, davon wurde in einem Fall (Fall 10) Borderlinetumor und Ovarialkarzinom gleichzeitig diagnostiziert, in zwei Fällen (Fälle 30 und 39) erkrankten die Patientinnen zunächst an einem Borderlinetumor und Jahre später an einem Ovarialkarzinom. Auffällig waren bei der Analyse der Überlebensdaten folgende Punkte: Die Mehrheit der Patientinnen die später an Ovarialkarzinomen verstarben wiesen einen muzinösen Borderlinetumor auf, wie auch die einzigen beiden Patientinnen, die tatsächlich an ihrer Borderlineerkrankung verstarben. Dies erscheint fragwürdig, da die muzinösen Borderlinetumoren zwar eine Progression zu Karzinomen aufweisen, aber auch die muzinösen Ovarialkarzinome wie bereits erwähnt in niedrigen Tumorstadien eine sehr gute Prognose aufweisen. Leider konnten unsere eigenen Daten diese ungewöhnlichen klinischen Verläufe nicht weiter aufklären.

4.6.2. Bedeutung der Ergebnisse der Überlebenskurven in Abhängigkeit von K-Ras, B-Raf und GPER

Nur sehr wenige Patientinnen sterben an den Folgen ihre Borderlinetumor-Erkrankung. Insofern erscheint eine Auswertung der Ergebnisse mittels der Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit von K-Ras, B-Raf und GPER diskussionswürdig, da viele Patientinnen ihre Borderlinetumor-Erkrankung überleben oder an anderen Erkrankungen versterben. Für eine sinnvolle Untersuchung müssten genauere Daten erhoben werden, die die Todesursache besser differenzieren können und für die ein größeres Kollektiv zur Verfügung steht. Für die Auswertung der Kaplan-Meier-Kurven wurden die Fälle, in deren Verlauf ein Ovarialkarzinom auftrat, ausgeschlossen (Fälle 10, 18, 26, 30, 39, 43, 54, 85), da aus den für diese Untersuchung erhobenen Daten nicht sicher festzustellen ist, ob eine Entwicklung des Karzinoms aus dem Borderlinetumor vorliegt oder nicht. Unter dieser Prämisse zeigte keine der Überlebenskurven in Abhängigkeit von GPER, K-Ras und B-Raf eine Signifikanz.

5. Zusammenfassung

Die vielen unterschiedlichen Phänotypen der Ovarialtumoren wurden lange als „Spiellaune der Natur“ hingenommen (Hauptmann et al., 2014). Erst in neuester Zeit konnte dank molekulargenetischer Untersuchungen festgestellt werden, dass es sich bei den Tumoren der Ovarien nicht um eine homogene Erkrankung handelt, sondern vielmehr um eine Gruppe von Erkrankungen mit deutlich unterschiedlicher Morphologie und klinischem Verhalten (Prat et al., 2014). Ein Meilenstein der Forschung zu ovariellen Neoplasien gelang Piek et al., 2001 mit der Beobachtung, dass seröse High-grade Karzinomen mit Mutationen im Breast-Cancer-Gen BRCA von den Fimbrien der Tube ausgehen können und nicht wie vorher angenommen ein primär ovariell Karzinom sein müssen. Im Zuge der Fortschritte im Verstehen der Pathogenese ovarieller Erkrankungen wurde kürzlich das FIGO-Klassifikationssystem und die WHO-Einteilung ovarieller Neoplasien an den Stand der Wissenschaft angepasst. Damit wurde die Einteilung in die weniger aggressiven Typ I-Tumoren und die malignen Typ II-Tumoren akzeptiert und die Fimbrien als ein möglicher Ursprungsort für High-grade Tumoren in die Klassifikation aufgenommen. Da diese Arbeit vor der Veröffentlichung der neuen WHO-Leitlinien geschrieben wurde, beruht die Einteilung auf den mittlerweile überarbeiteten Klassifikationen.

Zu diesen wesentlichen Veränderungen im Verstehen von ovariellen Neoplasien kommt die Einführung neuer Medikamente in der Therapie onkologischer Erkrankungen hinzu. So sind seit einigen Jahren monoklonale Antikörper unter Anderem in der Therapie von kolorektalen Karzinomen, Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, Brustkrebs oder Hautkrebs im Sinne einer Target-orientierten Therapie etabliert. Auch in der Therapie ovarieller Neoplasien könnten solche auf die Molekulargenetik des Tumors zugeschnittenen Therapieformen Einzug finden. Dafür ist die Aufklärung des Mutationsstatus eines Tumors unabdingbare Voraussetzung, da dies die Entscheidungsgrundlage für den sinnvollen Einsatz dieser Medikamente darstellt. Die hierfür notwendige Diagnostik beschränkt sich bei ovariellen Tumoren bisher auf die zeitaufwendige und arbeitsintensive Mutationsanalyse. Wünschenswert wäre eine schnelle und kostengünstige, sowohl bei sehr kleinen als auch bei sehr großen Tumormassen einsetzbare diagnostische Methode. Hierfür bietet sich die Immunhistochemie an. Auf dem Weg zu einer standardisierten, immunhistochemischen Analyse des Mutationsstatus eines ovariellen Tumors sind aktuell noch einige Fragen offen. So steht bislang der Nachweis der Korrelation von positiver Expression in der Immunhistochemie und positiver Mutation in der Mutationsanalyse eines Proteins aus. In

dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden MAPK-Proteine B-Raf und K-Ras, die in ovariellen Borderlinetumoren in 2/3 der Fälle mutiert vorliegen, in der immunhistochemischen Untersuchung von 86 Fällen ovarieller Borderlinetumoren eine ähnliche Expression zeigen wie die in der Literatur beschriebene Mutationshäufigkeit. So zeigte sich bei serösen Borderlinetumoren eine Expression von B-Raf in 25% der Fälle, von K-Ras in 67,3% der Fälle. Bei muzinösen Borderlinetumoren zeigte sich keine Expression von B-Raf und eine Expression von K-Ras in 67,7% der Fälle. In insgesamt acht Fällen von ovariellen Karzinomen konnten die verwendeten Protokolle mit Mutationsanalysen aus dem Referenzlabor für Ras/Raf-Mutationen am pathologischen Institut der LMU verglichen werden. Für B-Raf stand ein Fall zur Verfügung, in dem sich Mutation und Expression deckten, für K-Ras standen sieben Fälle zur Verfügung die sich in 71% der Fälle deckten. Für eine statistisch valide Aussage standen deutlich zu wenige Vergleichsfälle zur Verfügung, ein ausführlicher Vergleich von Expression und Mutation wäre als nächster Schritt wünschenswert. Für einen Zusammenhang zwischen der Expression von K-Ras und B-Raf in der Immunhistochemie und der Mutation dieser beiden Gene spricht auch, dass sich in dieser Untersuchung die Expression von B-Raf und K-Ras, wie durch andere Forschungsgruppen mittels Mutationsanalysen gezeigt, zu 90,7% ausschließen. In acht Fällen zeigte sich eine gleichzeitige Expression beider Proteine.

Die Untersuchung der Überlebenskurven in Abhängigkeit von K-Ras und B-Raf zeigten kein statistisch signifikantes Ergebnis.

Ein weiterer Teil dieser Untersuchung war der die immunhistochemische Expression des G-Protein-gekoppelte Östrogen-Rezeptor GPER. Dieser seit etwa zehn Jahren bekannte Östrogen-Rezeptor wurde mittlerweile in vielen Geweben verteilt über den ganzen menschlichen Organismus gefunden und scheint zahllose physiologische Funktionen, insbesondere im kardiovaskulären, endokrinen und im Immunsystem zu besitzen (Prossnitz et al, 2014). Die Rolle des GPER in der ovariellen Karzinogenese ist Gegenstand aktueller Forschung. Bisher konnte unter Anderem gezeigt werden, dass die Expression von GPER Schwankungen während der Follikulogenese unterworfen ist und GPER möglicher Weise eine Rolle in der Prognose von Patientinnen mit Granulosazelltumoren spielen könnte (Heublein et al., 2014). Außerdem scheint die Expression in ovariellen Karzinomen niedriger zu sein als in Borderlinetumoren und benignen ovariellen Tumoren (Ignatov et al., 2013). Das passt zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass der GPER in 100% der ovariellen Borderlinetumoren exprimiert wird. Die Untersuchung des Überlebens in Abhängigkeit von GPER zeigte kein signifikantes Ergebnis.

Eine Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Expression des GPER und den beiden Signaltransduktionsproteinen K-Ras und B-Raf machte angesichts der 100%igen Expression des GPER in ovariellen Borderlinetumoren keinen Sinn.

Mit dieser Arbeit wurden die Möglichkeiten der Immunhistochemie als diagnostisches Mittel für die weitere Subtypisierung und die damit zusammenhängende Zuordnung von Therapiemöglichkeiten bei ovariellen Borderlinetumoren untersucht. Es konnten erste Erfolge in der Darstellung der Expression von K-Ras und B-Raf sowie von GPER verzeichnet werden. Dennoch sind weitere, ausführlichere Versuche und Untersuchungen, insbesondere betreffend das Überleben und die Progression von Borderlinetumoren zu Low-grade Karzinomen, die Unterscheidung zwischen primär und sekundär ovariellen muzinösen Tumoren und die Korrelation zwischen Mutation und Expression, notwendig. Die Bücher über dieses spannende Thema bleiben also auch für weitere Untersuchungen geöffnet.

6. Literaturverzeichnis

1. Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, et al. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer research*. 2007;67(4):1859-66. Epub 2007/02/20.
2. Albanito L, Sisci D, Aquila S, Brunelli E, Vivacqua A, Madeo A, et al. Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Endocrinology*. 2008;149(8): 3799-808. Epub 2008/05/10.
3. Anglesio MS, Arnold JM, George J, Tinker AV, Tothill R, Waddell N, et al. Mutation of ERBB2 provides a novel alternative mechanism for the ubiquitous activation of RAS-MAPK in ovarian serous low malignant potential tumors. *Molecular cancer research : MCR*. 2008;6(11):1678-90. Epub 2008/11/18.
4. Apple SK, Hecht JR, Lewin DN, Jahromi SA, Grody WW, Nieberg RK. Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis. *Human pathology*. 1999;30(2):123-9. Epub 1999/02/24.
5. Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie. Kommission Ovar. Empfehlungen für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. München, u.a.: Zuckschwerdt, 2011
6. Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie. Kommission Ovar. Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. München, u.a.: Zuckschwerdt, 2010
7. Ardighieri L, Zeppernick F, Hannibal CG, Vang R, Cope L, Junge J, et al. Mutational analysis of BRAF and KRAS in ovarian serous borderline (atypical proliferative) tumours and associated peritoneal implants. *The Journal of pathology*. 2014;232(1):16-22. Epub 2013/12/07.
8. Asante A, Leonard PH, Weaver AL, Goode EL, Jensen JR, Stewart EA, et al. Fertility drug use and the risk of ovarian tumors in infertile women: a case- control study. *Fertility and sterility*. 2013;99(7):2031-6. Epub 2013/04/05. 7. Avril S, Hahn E, Specht K, Hauptmann S, Hoss C, Kiechle M, et al. Histopathologic features of ovarian borderline tumors are not predictive of clinical outcome. *Gynecologic oncology*. 2012;127(3):516-24. Epub 2012/09/25.

9. Avril S, Hahn E, Specht K, Hauptmann S, Hoss C, Kiechle M, et al. Histopathologic features of ovarian borderline tumors are not predictive of clinical outcome. *Gynecologic oncology*. 2012;127(3):516-24. Epub 2012/09/25.
10. Barton M. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions. *Steroids*. 2012;77(10):935-42. Epub 2012/04/24.
11. Boivin B, Vaniotis G, Allen BG, Hebert TE. G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm? *Journal of receptor and signal transduction research*. 2008;28(1-2):15-28. Epub 2008/04/26.
12. Bösmüller H, Fischer A, Pham DL, Fehm T, Capper D, von Deimling A, et al. Detection of the BRAF V600E mutation in serous ovarian tumors: a comparative analysis of immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody and allele-specific PCR. *Human pathology*. 2013;44(3): 329-35. Epub 2012/10/24.
13. Boyd J, Luo B, Peri S, Wirchansky B, Hughes L, Forsythe C, et al. Whole exome sequence analysis of serous borderline tumors of the ovary. *Gynecologic oncology*. 2013. Epub 2013/06/19.
14. Campbell PM, Groehler AL, Lee KM, Ouellette MM, Khazak V, Der CJ. K- Ras promotes growth transformation and invasion of immortalized human pancreatic cells by Raf and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Cancer research*. 2007;67(5):2098-106. Epub 2007/03/03.
15. Capper D, Berghoff AS, Magerle M, Ilhan A, Wohrer A, Hackl M, et al. Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. *Acta neuropathologica*. 2012;123(2):223-33. Epub 2011/10/21.
16. Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta neuropathologica*. 2011;122(1): 11-9. Epub 2011/06/04.
17. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine*. 2011;364(26):2507-16. Epub 2011/06/07.
18. Cheng EJ, Kurman RJ, Wang M, Oldt R, Wang BG, Berman DM, et al. Molecular genetic analysis of ovarian serous cystadenomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2004;84(6):778-84. Epub 2004/04/13.
19. Cheng SB, Graeber CT, Quinn JA, Filardo EJ. Retrograde transport of the

- transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/ GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. *Steroids*. 2011;76(9): 892-6. Epub 2011/03/01.
20. Chretien AS, Harle A, Meyer-Lefebvre M, Rouyer M, Husson M, Ramacci C, et al. Optimization of routine KRAS mutation PCR-based testing procedure for rational individualized first-line-targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. *Cancer medicine*. 2013;2(1):11-20. Epub 2013/10/18.
 21. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54. Epub 2002/06/18.
 22. Dehari R, Kurman RJ, Logani S, Shih Ie M. 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(7):1007-12. Epub 2007/06/27.
 23. Diebold J. [Serous ovarian tumors]. *Der Pathologe*. 2014;35(4):314-21. Epub 2014/06/12. Seröse Tumoren des Ovars.
 24. DKFZ Heidelberg, www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/organ.html, aufgerufen am 29.08.2014
 25. du Bois A, Ewald-Riegler N, de Gregorio N, Reuss A, Mahner S, Fotopoulou C, et al. Borderline tumours of the ovary: A cohort study of the Arbeitsgemeinschaft Gynakologische Onkologie (AGO) Study Group. *Eur J Cancer*. 2013;49(8):1905-14. Epub 2013/03/16.
 26. Elsabah MT, Adel I. Immunohistochemical assay for detection of K-ras protein expression in metastatic colorectal cancer. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2013;25(1):51-6. Epub 2013/03/19.
 27. Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, et al. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*. 2007;148(7):3236-45. Epub 2007/03/24.
 28. Filardo EJ. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2002;80(2):231-8. Epub 2002/03/19.
 29. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-

- EGF. *Mol Endocrinol.* 2000;14(10):1649-60. Epub 2000/10/24.
30. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP- mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol.* 2002;16(1):70-84. Epub 2002/01/05.
31. Fujiwara S, Terai Y, Kawaguchi H, Takai M, Yoo S, Tanaka Y, et al. GPR30 regulates the EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer. *Journal of ovarian research.* 2012;5(1):35. Epub 2012/11/21.
32. Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. G protein- coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications.* 2006;346(3):904-10. Epub 2006/06/20.
33. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer cell.* 2004; 6(4):313-9. Epub 2004/10/19.
34. Gemignani ML, Schlaerth AC, Bogomolnii F, Barakat RR, Lin O, Soslow R, et al. Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecologic oncology.* 2003;90(2):378-81. Epub 2003/08/02.
35. Hart WR. Mucinous tumors of the ovary: a review. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists.* 2005;24(1):4-25. Epub 2005/01/01.
36. Hauptmann S, du Bois A, Meinhold-Herlein I, Pfisterer J, Avril S. [Histological grading of epithelial ovarian cancer : Review and recommendation.]. *Der Pathologe.* 2014. Epub 2014/07/30. Histologische Malignitätsgraduierung des Ovarialkarzinoms : Überblick und Empfehlung.
37. Heublein S, Grasse K, Hessel H, Burges A, Lenhard M, Engel J, et al. KRAS, BRAF genotyping reveals genetic heterogeneity of ovarian borderline tumors and associated implants. *BMC cancer.* 2013;13:483. Epub 2013/10/22.
38. Heublein S, Lenhard M, Vrekoussis T, Schoepfer J, Kuhn C, Friese K, et al. The G-Protein Coupled Estrogen Receptor (GPER) is Expressed in Normal Human Ovaries and is Upregulated in Ovarian Endometriosis and Pelvic Inflammatory Disease Involving the Ovary. *Reprod Sci.* 2012. Epub 2012/05/11.
39. Heublein S, Mayr D, Friese K, Jarrin-Franco MC, Lenhard M, Mayerhofer A, Jeschke U. The G-protein-coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in ovarian granulosa cell tumors. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(9): 15161-72. Epub 2014/08/27.
40. Hiddemann W, Huber H, Bartram CR. *Die Onkologie.* Berlin u.a.: Springer; 2010.

41. Ho CL, Kurman RJ, Dehari R, Wang TL, Shih Ie M. Mutations of BRAF and KRAS precede the development of ovarian serous borderline tumors. *Cancer research*. 2004;64(19):6915-8. Epub 2004/10/07.
42. Ignatov T, Modl S, Thulig M, Weissenborn C, Treeck O, Ortmann O, et al. GPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer. *Journal of ovarian research*. 2013;6(1):51. Epub 2013/07/16.
43. Ilie M, Long E, Hofman V, Dadone B, Marquette CH, Mouroux J, et al. Diagnostic value of immunohistochemistry for the detection of the BRAFV600E mutation in primary lung adenocarcinoma Caucasian patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;24(3):742-8. Epub 2012/11/08.
44. Jala VR, Radde BN, Haribabu B, Klinge CM. Enhanced expression of G- protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in lung cancer. *BMC cancer*. 2012;12:624. Epub 2013/01/01.
45. Jeong S, Lee DH, Lee JI, Lee JW, Kwon KS, Kim PS, et al. Expression of Ki-67, p53, and K-ras in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2005;11(43):6765-9. Epub 2006/01/21.
46. Jones S, Wang TL, Kurman RJ, Nakayama K, Velculescu VE, Vogelstein B, et al. Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. *The Journal of pathology*. 2012;226(3):413-20. Epub 2011/11/22.
47. Karreth FA, Tuveson DA. Modelling oncogenic Ras/Raf signalling in the mouse. *Current opinion in genetics & development*. 2009;19(1):4-11. Epub 2009/02/10.
48. Kolkova Z, Casslen V, Henic E, Ahmadi S, Ehinger A, Jirstrom K, et al. The G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER/GPR30) does not predict survival in patients with ovarian cancer. *Journal of ovarian research*. 2012;5:9. Epub 2012/03/20.
49. Koperek O, Kornauth C, Capper D, Berghoff AS, Asari R, Niederle B, et al. Immunohistochemical detection of the BRAF V600E-mutated protein in papillary thyroid carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2012;36(6): 844-50. Epub 2012/05/18.
50. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24 Suppl 10:x16-21. Epub 2013/12/07.
51. Kurman RJ, Carcangiu, M.L., Herrington, C.S., Young, R.H. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 2014. p. 12-23.

52. Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM. Blaustein's pathology of the female genital tract. 6th ed. New York: Springer; 2011. xv, 1246 p. p.
53. Lalwani N, Prasad SR, Vikram R, Shanbhogue AK, Huettner PC, Fasih N. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc.* 2011;31(3):625-46. Epub 2011/05/17.
54. Langer G, Bader B, Meoli L, Isensee J, Delbeck M, Noppinger PR, et al. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids.* 2010;75(8-9):603-10. Epub 2009/12/26.
55. Lappano R, De Marco P, De Francesco EM, Chimento A, Pezzi V, Maggiolini M. Cross-talk between GPER and growth factor signaling. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2013. Epub 2013/04/02.
56. Lax S, Staebler A. [Mucinous ovarian neoplasms : Prognostically mostly excellent, infrequently a wolf in sheep's clothing]. *Der Pathologe.* 2014;35(4): 327-35. Epub 2014/06/26. Muzinöse Ovarialtumoren : Prognostisch meist exzellent, selten Wolfe im Schafspelz.
57. Leary A, Petrella MC, Pautier P, Duvillard P, Uzan C, Tazi Y, et al. Adjuvant platinum-based chemotherapy for borderline serous ovarian tumors with invasive implants. *Gynecologic oncology.* 2014;132(1):23-7. Epub 2013/11/14.
58. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 1.0, 2013, AWMF Registrierungsnummer: 032-035OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
59. Levin ER. Minireview: Extranuclear steroid receptors: roles in modulation of cell functions. *Mol Endocrinol.* 2011;25(3):377-84. Epub 2010/09/24.
60. Long GV, Wilmott JS, Capper D, Preusser M, Zhang YE, Thompson JF, et al. Immunohistochemistry Is Highly Sensitive and Specific for the Detection of V600E BRAF Mutation in Melanoma. *The American journal of surgical pathology.* 2013;37(1):61-5. Epub 2012/10/03.
61. Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta- estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(26):27008-16. Epub 2004/04/20.
62. Malhotra PA, M; Nanda, N; Kochhar, R; Wig, J. D.; Vaiphei, K;, Mahmood S.

- Alterations in K-ras, APC and p53-multiple genetic pathway in colorectal cancer among Indians. *Tumour biol.* 2013;34(3):1901-11.
63. Maurer G, Tarkowski B, Baccarini M. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene.* 2011;30(32):3477-88. Epub 2011/05/18.
 64. Mayr D, Hirschmann A, Lohrs U, Diebold J. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecologic oncology.* 2006;103(3):883-7. Epub 2006/06/30.
 65. McCluggage WG. The pathology of and controversial aspects of ovarian borderline tumours. *Current opinion in oncology.* 2010;22(5):462-72. Epub 2010/06/10.
 66. Menczer J, Chetrit A, Sadetzki S. The effect of hysterectomy on survival of patients with borderline ovarian tumors. *Gynecologic oncology.* 2012;125(2): 372-5. Epub 2012/03/01.
 67. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochimica et biophysica acta.* 2003;1653(1):25-40. Epub 2003/06/05.
 68. Mizukami Y. In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocrine journal.* 2010;57(2): 101-7. Epub 2009/12/10.
 69. Morice P, Uzan C, Fauvet R, Gouy S, Duvillard P, Darai E. Borderline ovarian tumour: pathological diagnostic dilemma and risk factors for invasive or lethal recurrence. *The lancet oncology.* 2012;13(3):e103-15. Epub 2012/03/03.
 70. Müller-Esterl. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler: Spektrum Akademischer Verlag; 2004.*
 71. Niault TS, Baccarini M. Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 2010;31(7):1165-74. Epub 2010/01/06.
 72. Nik NN, Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ. Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma. *Annual review of pathology.* 2014;9:27-45. Epub 2013/08/14.
 73. Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Andreasen P, et al. GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biology of reproduction.* 2009;80(1):34-41. Epub 2008/09/19.
 74. Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, et al. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology.* 2008;149(10):4846-56. Epub 2008/06/21.
 75. Pecorino L. *Molecular biology of cancer : mechanisms, targets, and therapeutics.* 3rd

- ed. New York, NY: Oxford University Press; 2012.
76. Peyssonnaud C, Eychene A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 2001;93(1-2):53-62. Epub 2001/12/04.
 77. Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP, Jansen JW, Poort-Keesom RJ, Menko FH, et al. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *The Journal of pathology*. 2001;195(4):451-6. Epub 2001/12/18.
 78. Pohl G, Ho CL, Kurman RJ, Bristow R, Wang TL, Shih Ie M. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway as a potential target-based therapy in ovarian serous tumors with KRAS or BRAF mutations. *Cancer research*. 2005;65(5):1994-2000. Epub 2005/03/09.
 79. Prat J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2014;124(1):1-5. Epub 2013/11/14
 80. Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;389(1-2): 71-83. Epub 2014/02/18.
 81. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Der Pathologe*. 1987;8(3):138-40. Epub 1987/05/01. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER- ICA) im Mammakarzinomgewebe.
 82. Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ. Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends in cell biology*. 2004;14(11):639-47. Epub 2004/11/03.
 83. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005;307(5715):1625-30. Epub 2005/02/12.
 84. Rodriguez R. Biomarker testing for treatment of metastatic colorectal cancer: role of the pathologist in community practice. *The Journal of community and supportive oncology*. 2014;12(1):27-32. Epub 2014/06/28.

85. Roskoski R, Jr. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;399(3): 313-7. Epub 2010/08/03.
86. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;319(1): 1-11. Epub 2004/05/26.
87. Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(6): 2262-72. Epub 2006/03/02.
88. Schuler S, Ponnath M, Engel J, Ortmann O. Ovarian epithelial tumors and reproductive factors: a systematic review. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2013;287(6):1187-204. Epub 2013/03/19.
89. Seidman JD, Soslow RA, Vang R, Berman JJ, Stoler MH, Sherman ME, et al. Borderline ovarian tumors: diverse contemporary viewpoints on terminology and diagnostic criteria with illustrative images. *Human pathology*. 2004;35(8): 918-33. Epub 2004/08/07.
90. Servomaa K, Kiuru A, Kosma VM, Hirvikoski P, Rytomaa T. p53 and K-ras gene mutations in carcinoma of the rectum among Finnish women. *Molecular pathology : MP*. 2000;53(1):24-30. Epub 2000/07/08.
91. Sherman ME, Berman J, Birrer MJ, Cho KR, Ellenson LH, Gorstein F, et al. Current challenges and opportunities for research on borderline ovarian tumors. *Human pathology*. 2004;35(8):961-70. Epub 2004/08/07.
92. Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends in cell biology*. 2000;10(4):147-54. Epub 2000/03/31.
93. Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American journal of pathology*. 2004;164(5):1511-8. Epub 2004/04/28.
94. Shih Ie M, Kurman RJ. Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(20):7273-9. Epub 2005/10/26.
95. Sieben NL, Roemen GM, Oosting J, Fleuren GJ, van Engeland M, Prat J. Clonal analysis favours a monoclonal origin for serous borderline tumours with peritoneal implants. *The Journal of pathology*. 2006;210(4):405-11. Epub 2006/11/11.
96. Singer G, Stohr R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, Cao DF, et al. 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(2):218-24. Epub 2005/01/13.
97. Skorokhod A, Capper D, von Deimling A, Enk A, Helmbold P. Detection of BRAF V600E mutations in skin metastases of malignant melanoma by monoclonal antibody VE1. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012;67(3):488-91. Epub 2012/08/15.
 98. Smith HO, Arias-Pulido H, Kuo DY, Howard T, Qualls CR, Lee SJ, et al. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2009;114(3):465-71. Epub 2009/06/09.
 99. Stewart LM, Holman CD, Finn JC, Preen DB, Hart R. In vitro fertilization is associated with an increased risk of borderline ovarian tumours. *Gynecologic oncology*. 2013;129(2):372-6. Epub 2013/02/07.
 100. Tavassoli F DP, editors. *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs in World Health Organization classification of tumours*. 2003. Lyon, France 2003. p. 114-29.
 101. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005;146(2):624-32. Epub 2004/11/13.
 102. Tian R, Wang Z, Shi Z, Li D, Wang Y, Zhu Y, et al. Differential expression of G-protein-coupled estrogen receptor-30 in human myometrial and uterine leiomyoma smooth muscle. *Fertility and sterility*. 2013;99(1):256-63. Epub 2012/10/10.
 103. Trillsch F, Mahner S, Ruetzel J, Harter P, Ewald-Riegler N, Jaenicke F, et al. Clinical management of borderline ovarian tumors. *Expert review of anticancer therapy*. 2010;10(7):1115-24. Epub 2010/07/22.
 104. Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA, Silver DP, Jackson EL, Chang S, et al. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer cell*. 2004;5(4):375-87. Epub 2004/04/20.
 105. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of clinical oncology : official journal of the*

- American Society of Clinical Oncology. 2011;29(15):2011-9. Epub 2011/04/20.
106. Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Advances in anatomic pathology*. 2009;16(5):267-82. Epub 2009/08/25.
107. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116(6):855-67. Epub 2004/03/24.
108. Wang D, Hu L, Zhang G, Zhang L, Chen C. G protein-coupled receptor 30 in tumor development. *Endocrine*. 2010;38(1):29-37. Epub 2010/10/21.
109. Yan Y, Liu H, Wen H, Jiang X, Cao X, Zhang G, et al. The novel estrogen receptor GPER regulates the migration and invasion of ovarian cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;378(1-2):1-7. Epub 2013/04/13.

7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1. Tabellen

Tabelle 1: Typ I Tumoren in Nik et al., 2014.....	12
Tabelle 2: Typ II Tumoren in Nik et al., 2014	12
Tabelle 3: FIGO-Einteilung der Tumorstadien in Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie, 2010	14
Tabelle 4: Methoden der K-Ras Mutationsanalyse in Rodriguez et al., 2014.....	25
Tabelle 5: Auflistung der Daten des Follow-up	34
Tabelle 6: Ergebnisse der B-Raf Färbung	45
Tabelle 7: Ergebnisse der K-Ras Färbung.....	46
Tabelle 8: Ergebnisse der GPER-Färbung	47
Tabelle 9: Fallaufstellung mit Ergebnissen	49

7.2. Abbildungen

Abbildung 1: Pathogenese ovarieller Neoplasien.....	13
Abbildung 2: Altersverteilung der Patientinnen bei Erstdiagnose	33
Abbildung 3: Verteilung der histologischen Subtypen	34
Abbildung 4: Fall 19, HE Färbung, 100 fache Vergrößerung, seröser Borderlinetumor.....	35
Abbildung 5: Fall 28, HE Färbung, 100 fache Vergrößerung, muzinöser Borderlinetumor....	35
Abbildung 6: Verteilung der Tumorstadien	35
Abbildung 7: Einteilung der Prozentangaben für den Score nach Remmele und Stegner, Bildmaterial der Internetseite https://www.pathologie-vechta.de	43
Abbildung 8: Fall 86, vollautomatische B-Raf Färbung, 200-fache Vergrößerung.....	44
Abbildung 9: Fall 1, B-Raf, 200-fache Vergrößerung, IR-Score 0	45
Abbildung 10: Fall 76, B-Raf, 200 fache Vergrößerung, IR-Score 12	45
Abbildung 11: Fall 24, K-Ras, 200-fache Vergrößerung, IR-Score 0.....	45
Abbildung 12: Fall 76, K-Ras, 200-fache Vergrößerung, IR-Score 12.....	45
Abbildung 13: Fall 54, GPER, 200-fache Vergrößerung, IR-Score 4.....	46
Abbildung 14: Fall 4, GPER, 200-fache Vergrößerung, IR-Score 12.....	46
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von GPER.....	50
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von K-Ras.....	50
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von B-Raf	51

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Alena Siegfried, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Immunhistochemische Analyse der Expression von K-Ras, B-Raf und GPER in
Borderlinetumoren des Ovars

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

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