

Aus dem Institut für Pathologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann

**Molekulare Analyse der genotypischen Beziehung zwischen  
serösen Borderline-Tumoren des Ovars und extraovariellen Implants**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Elisabeth Gerono  
geboren am 10.08.1983 in Halle (Saale)

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert

Gutachter: Prof. Dr. med. Arndt Hartmann  
Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert

Eröffnung: 30.06.2009

Verteidigung: 01.04.2010

## Kurzrefarat

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob syn- oder metachron auftretende seröse Borderline-Tumoren (S-BOTs) des Ovars und extraovarielle, meist peritoneale Implants (IMPs) aus einem gemeinsamen Klon entstehen oder verschiedene Progenitorzellen haben. Dazu wurde paraffiniertes Tumormaterial von 12 geeigneten Patientinnen verwendet. Die isolierte DNA der 19 ovariellen und 43 extraovariellen Gewebeproben wurde im Bereich von 10 Mikrosatelliten amplifiziert. Nach semiquantitativer Beurteilung im Agarosegel und Vorbereitung der Proben wurden die Fragmente in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Auf diese Weise konnte ein Vergleich der Bandenmuster der multifokalen Tumorproben erfolgen.

Von den 10 Mikrosatellitenmarkern deckten 8, in höchstem Maße MYC-L1, bei insgesamt 43,5% der Proben Unterschiede im Sinne von allelischen Imbalancen oder Mikrosatelliteninstabilitäten auf. 5 Fälle (41,7%) wiesen bei 9-10 Markern ein einheitliches, also konkordantes Muster auf, welches entweder dem Wildtyp oder einer klonal weitergegebenen Mutation entsprechen könnte. In 58,3% der Fälle unterschieden sich BOT- und IMP-Proben in mindestens 2 Markern, was als Diskordanz definiert wurde. Diese deutet am ehesten auf einen polyklonalen Ursprung hin. Innerhalb der diskordanten Fälle ließen sich jedoch 4 Serien genotypisch gleicher Proben ausmachen, von denen 3 ausschließlich Implants betrafen und eine sowohl den linksseitigen BOT als auch einen Teil der assoziierten Implants. Von den 7 Patientinnen mit bilateralen S-BOTs zeigten 28,6% Unterschiede zwischen rechts- und linksovariellen Tumor; 71,4% hatten beidseits ein identisches Muster.

In die Interpretation der Ergebnisse wurden zusätzlich Sequenzierungen im Bereich zweier Protoonkogene (K-RAS und B-RAF) einbezogen. Diese deckten 4 Mutationen im Codon 12 des K-RAS-Gens auf (9,7% der Proben, 1/3 der Fälle). Davon betraf nur eine sowohl die ovariellen Tumorherde als auch zumindest einen der extraovariellen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse beider Methoden bietet dieser Fall die deutlichsten Hinweise auf den klonalen Ursprung eines Implants aus dem entsprechenden BOT. Insgesamt finden sich jedoch mehr Indizien für eine vom BOT unabhängige, polyklonale Entstehung der Implants. Angesichts der allgemeinen Studienlage ist die Koexistenz beider Pathomechanismen anzunehmen. Eine abschließende Klärung der Fragestellung wird nur mit Hilfe weiterer Untersuchungen möglich sein.

Gerono, Elisabeth: Molekulare Analyse der genotypischen Beziehung zwischen serösen Borderline-Tumoren des Ovars und extraovariellen Implants.  
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 58 Seiten, 2009

---

---

# Inhalt

	<b>Kurzreferat</b>	<b>II</b>
	<b>Inhalt</b>	<b>III</b>
	<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole</b>	<b>V</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	S-BOTs des Ovars	1
1.2	Tumorgenese und -progression	5
1.3	Mikrosatelliten als molekulargenetische Marker	10
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>13</b>
3.1	Patienten und Tumormaterial	13
3.2	Chemikalien	15
3.3	Enzyme	16
3.4	Puffer und Lösungen	16
3.5	Geräte	17
3.6	Verbrauchsmaterialien	18
3.7	Molekulargenetische Marker	18
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>19</b>
4.1	DNA-Isolation aus Paraffinmaterial	19
4.2	PCR	20
4.3	Agarosegel-Elektrophorese	22
4.4	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	23
4.4.1	Probenvorbereitung	23
4.4.2	Elektrophorese	23
4.4.3	Silberfärbung	23
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>34</b>
6.1	Monoklonalitätstheorie	34
6.2	Polyklonalitätstheorie	35
6.3	Beurteilung der eigenen Ergebnisse	37
6.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	41
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>47</b>
<b>9</b>	<b>Thesen</b>	<b>58</b>
	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b>	<b>VII</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>VIII</b>

---

**Erklärung über frühere Promotionsversuche**

**IX**

**Publikationen**

**VII**

**Danksagung**

**VII**

---

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AI	allelische Imbalance
ALARA	as low as reasonably achievable
APS	Ammoniumpersulfat
APST	atypical proliferative serous tumor
apoE	Apolipoprotein E
AR	Androgenrezeptor
bp	Basenpaare
BOT	Borderline-Tumor
BSA	bovines Serumalbumin
CA	Karzinom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	human leukocyte antigene
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HPF	high power fields
IMP	Implant
KCl	Kaliumchlorid
LOH	Loss of heterozygosity
LMP	low malignant potential
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MS	Mikrosatelliten
MSA	Mikrosatellitenanalyse
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NaCl	Natriumchlorid
n/c-Ratio	Kern-Zytoplasma-Ratio
Nr.	Nummer
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
S-BOT	seröser Borderline-Tumor

---

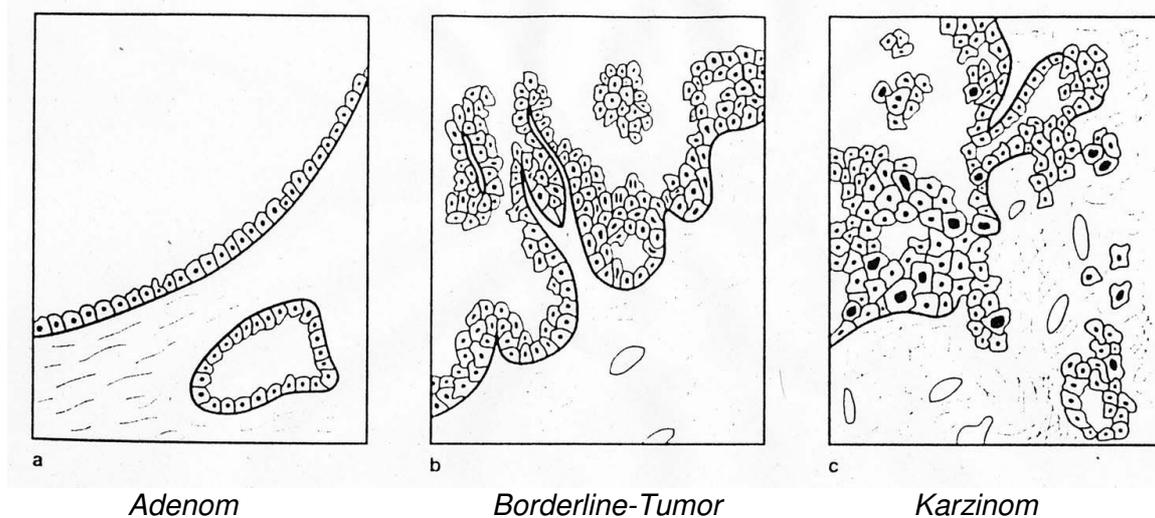
SDS	sodium dodecylsulfate
TBE	Tris-HCl / Borsäure / EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
WHO	World Health Organization

# 1 Einleitung

## 1.1 S-BOTs des Ovars

Da der Eierstock aus Stroma, Keimzellen und Oberflächenepithel besteht, gibt es eine Vielfalt histologisch unterschiedlicher Tumortypen. Die epithelialen Neoplasien bilden mit einem Anteil von ca. 2/3 die größte Gruppe (1987). Entsprechend seiner embryologischen Herkunft aus modifiziertem pelvinem Mesothel besitzt das Oberflächenepithel des Ovars das Potential, sich in verschiedene Zelltypen des Müllerschen Gangs zu differenzieren (Diebold J et al., 2004). Daher finden sich auch unter den Neoplasien seröse, muzinöse, endometrioid, transitionale, klarzellige und gemischt-epitheliale Varianten. Diese werden nach ihrer Dignität in benigne, Borderline- und maligne Tumoren eingeteilt (siehe Abb. 1).

*Abb. 1: Schematisierte Ovarialtumoren im Vergleich*

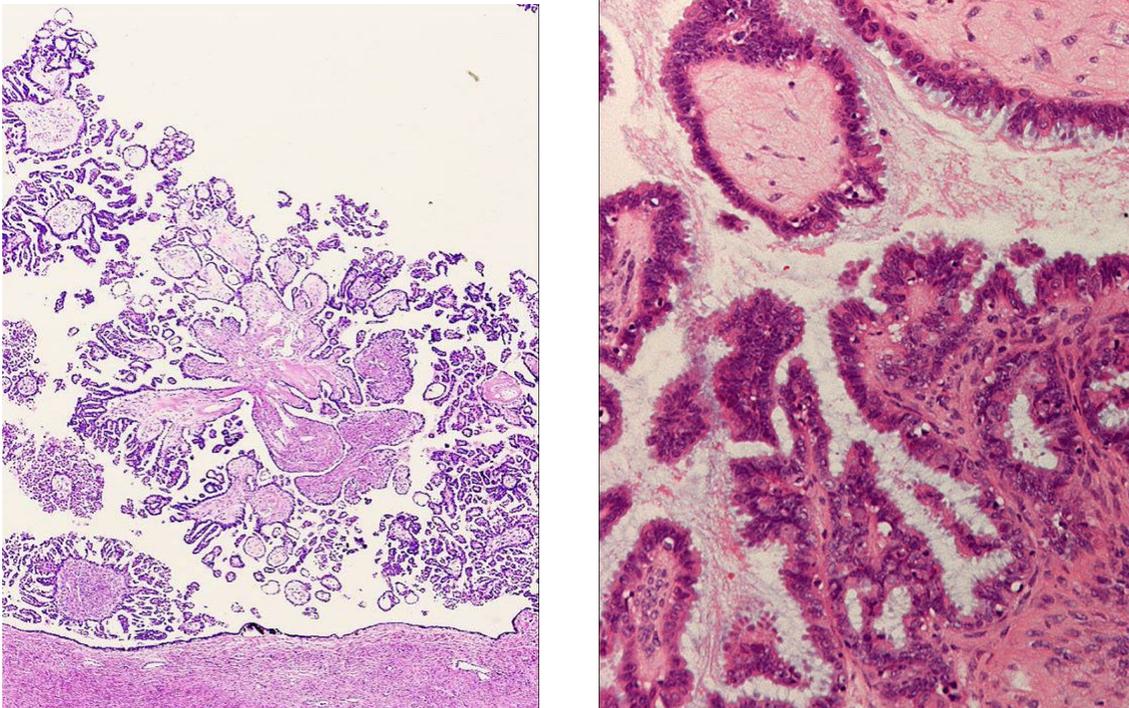


Unter den epithelialen Neoplasien des Eierstocks nehmen die Borderline-Tumoren (BOTs) einen Anteil von ca. 14% ein (Diebold J et al., 2004). Die Inzidenz beträgt ca. 24 pro 1.000.000 Frauen (Harlow BL et al., 1987). Erstbeschrieben 1898 von Pfannenstiel als ovarielle Adenome mit klinischen Eigenschaften an der Grenze zur Malignität (Pickel H, Tamussino K, 2003), wurden sie 1929 von Taylor als „semimaligne“ ovarielle Tumoren mit im Vergleich zu Karzinomen günstigerer Prognose als besondere Tumorentität abgegrenzt (Taylor HC, 1929). In der offiziellen Nomenklatur sind die Borderline-Tumoren seit 1971 (FIGO) bzw. 1973 (WHO) als eigene Kategorie berücksichtigt.

Die histopathologische Diagnose beruht auf folgenden Kriterien (Serov SF et al., 1973) (siehe auch Abb. 2):

- Mehrschichtigkeit (> 4 Lagen)
- maximal 4 Mitosen pro 10 HPF
- geringe Kernatypie, Nukleolen möglich
- erhöhte n/c-Ratio
- komplexe Verzweigungen, Brückenbildung, Pseudopapillen
- Ablösung von Zellgruppen, sog. budding
- keine destruktive Stromainvasion

Abb. 2: S-BOT: Histologie



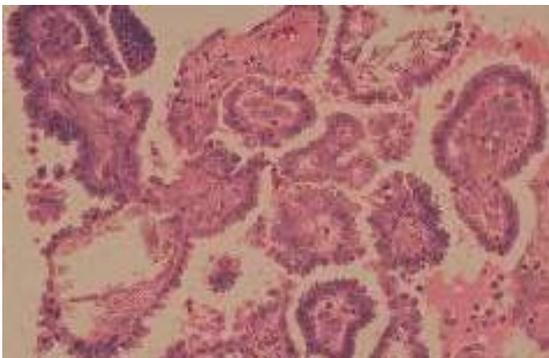
*Im histologischen Bild zeigen S-BOTs ein meist papilläres, seltener mikropapilläres Muster. Die komplex aufgezwigten fibrösen Ausstülpungen sind mit proliferierenden Epithelien tubarer Differenzierung überzogen. Eine destruktive Invasion in das Stroma ist definitionsgemäß nicht nachweisbar. Bei stärkerer Vergrößerung (rechte Abb.) zeigen sich variable nukleäre Atypien der teilweise mehrreihigen Epithelzellen.  
(Quelle: Archiv des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)*

Von den Adenomen unterscheiden sich die Borderline-Tumoren durch die architektonische Komplexität, eine vermehrte Epithelproliferation, zelluläre Atypien und eine höhere Mitosenfrequenz. Als entscheidendes Kriterium zur Abgrenzung gegenüber den Ovarialkarzinomen gilt die fehlende destruktive Stromainvasion (Seidman JD et al., 2004). Davon abzugrenzen ist eine prognostisch günstige Mikroinvasion, die bei 10-15% der S-BOTs vorliegt. Hier finden sich im Durchmesser max. 3-5 mm bzw. in der Fläche

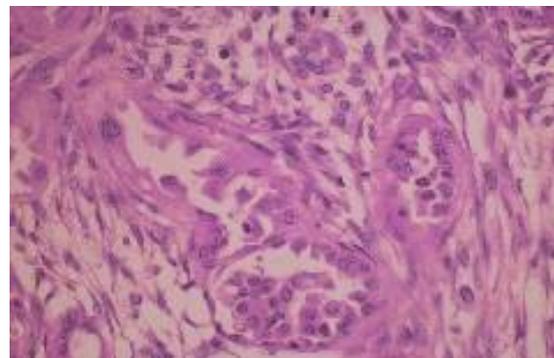
max. 10mm<sup>2</sup> große Foci mit kleinen intrastromalen Tumorzellen ohne signifikante Reaktion des umgebenden Gewebes (Bell DA et al., 2004; Nayar R et al., 1996). Aufgrund qualitativer histologischer Ähnlichkeiten zwischen mikroinvasiven S-BOTs und serösen „low-grade“-Karzinomen betrachten Hogg et al. die Mikroinvasion nicht als eine histologische Variante der S-BOTs, sondern als Frühinvasion niedrig maligner seröser Karzinome (Hogg R et al., 2007).

Definitionsgemäß können Borderline-Tumoren wegen der fehlenden Invasion im Unterschied zu Karzinomen nicht metastasieren. Bei einem Teil der S-BOTs<sup>1</sup> finden sich jedoch extraovarielle seröse Epithelproliferate, die peritoneale Oberflächen oder Lymphknoten einbeziehen. Diese so genannten *Implants* ähneln den ovariellen BOTs in vielerlei Hinsicht. Man unterscheidet einen epithelialen von einem desmoplastischen Typ (siehe Abb. 3 a+b; Seidman JD et al., 2004). Im Gegensatz zu den ovariellen Tumoren besitzt ein Teil von ihnen (< 10%) die Fähigkeit zur Invasion (siehe Abb. 3 c; Krishnamurti U et al., 2005). Hiervon sind typischerweise das Peritoneum, das subperitoneale Bindegewebe, das Omentum (majus und minus) und unter Umständen auch viszerale Strukturen, z.B. der Darm, betroffen (Seidman JD et al., 2004).

Abb. 3: Implants



*a) Das nicht-invasive Implant vom epithelialen Typ ist charakterisiert durch eine papilläre Proliferation serösen Epithels auf der peritonealen Oberfläche.*

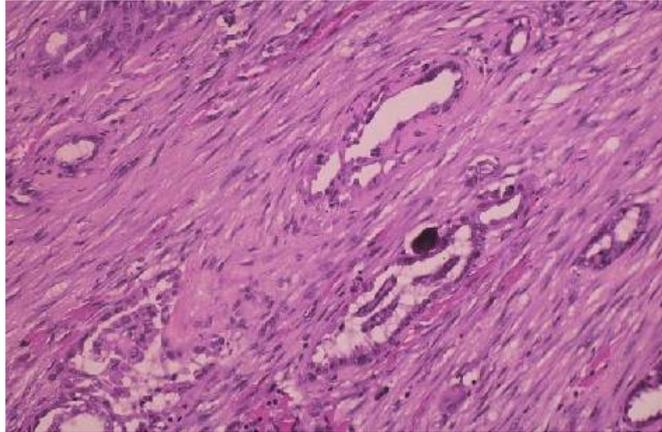


*b) Beim nicht-invasiven Implant vom desmoplastischen Typ überwiegt die fibroblastische Komponente gegenüber der epithelialen. Das Stroma ist ödematös aufgelockert. In geringerem Ausmaß finden sich auch verzweigte Drüsen mit gleichmäßigen Konturen.*

*a+b) Bei den nicht-invasiven Implants ist definitionsgemäß keine destruktive Invasion in das umgebende Gewebe nachweisbar. Die zellulären Atypien sind mild bis moderat. Die mitotische Aktivität ist gering.*

*(Quelle: <http://borderlineovariantumors.pathology.uic.edu>)*

<sup>1</sup> Die Häufigkeitsangaben zu den Implants schwanken entsprechend der angewandten diagnostischen Kriterien beträchtlich. Sie werden zwischen 20-46% (Hart WR, 2005) und ca. 2/3 (Diebold J et al., 2004) angegeben.



c) Bei den invasiven Implants zeigt das (hier glanduläre) Gewebe ein infiltratives Muster. Dabei sind ebenfalls nur milde bis moderate zytologische Atypien nachweisbar. Das Stroma ist dicht und fibrotisch.

(Quelle: <http://borderlineovariantumors.pathology.uic.edu>)

Das Staging gemäß der FIGO beinhaltet folgende Stadien der BOTs:

- I) auf die Ovarien begrenzt
- II) mit pelvinen Implants
- III) mit extrapelvinen Implants und/oder Lymphknotenbefall
- IV) mit Leberbefall oder Tumoren außerhalb der Bauchhöhle (extrem selten)

Ca. 75% des Borderline-Tumoren werden im Stadium I entdeckt (Kaern J et al., 1993). Etwa 12% der Diagnosen beruhen auf Zufallsbefunden. Die Übrigen fallen durch ein abdominelles Spannungsgefühl, Unterleibsschmerzen oder atypische Blutungen auf (Sehouli J et al., 2002)

Die folgende Arbeit beschäftigt sich im Speziellen mit den serösen Borderline-Tumoren (S-BOTs) des Ovars, welche synonym als „atypical proliferative serous tumors“ (APST) bzw. „serous tumors of low malignant potential“ (LMP) bezeichnet werden. Innerhalb der Gruppe der BOTs nehmen sie mit 55-60% den größten Anteil ein (Ortiz BH et al., 2001).

Nach histologischen Kriterien unterscheidet man typische und mikropapilläre S-BOTs. Letztere zeigen häufiger eine Oberflächenbeteiligung, Bilateralität, ein fortgeschrittenes Stadium und invasive peritoneale Implants (Hart WR, 2005). Adjustiert nach Risikofaktoren, haben sie aber, im Vergleich zu den deutlich häufigeren typischen S-BOTs, eine äquivalente Prognose (Slomovitz BM et al., 2002).

Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt im Stadium I 93-99% (Ortiz BH et al., 2001), in höheren Stadien im Schnitt 55-75% (Diebold J et al., 2004). Die hierbei relativ hohe Mortalität ist meist auf „benigne“ Komplikationen der Krankheit oder der Therapie, wie den Bridenileus, zurückzuführen (Kurman RJ, Trimble CL, 1993). Von den Patientinnen

mit nicht-invasiven Implants überleben auch im fortgeschrittenen Stadium 98-100%, während das infiltrative Wachstum der Implants die 10-Jahres-Überlebensrate auf 35% begrenzt (Diebold J et al., 2004). Dementsprechend stellt die Invasion der Implants neben dem Stadium und dem postoperativen Verbleib makroskopischer Tumorresiduen den wichtigsten Risiko- bzw. Prognosefaktor dar (Gershenson DM et al., 1998). Therapeutisch steht die operative Tumorsektion mittels Längsschnittdarstellung im Vordergrund. Im Rahmen des Stagings wird die bilaterale Adnektomie im Allgemeinen mit einer abdominellen Hysterektomie, einer Omentektomie, peritonealen Probeexzisionen und einer Lavage kombiniert. Die Lymphonodektomie wird nicht generell durchgeführt, da bei S-BOTs trotz einer Lymphknotenbeteiligung von 20-30% bislang kein prognostischer Einfluss festgestellt werden konnte. Im fortgeschrittenen Stadium wird jedoch ein entsprechendes Staging empfohlen (Kommission Ovar der AGO, 2007).

Ein besonderes Problem im Rahmen der Therapie stellt das häufige Auftreten der S-BOTs im reproduktionsfähigen Alter dar (Silverberg SG et al., 2004). Das mittlere Alter der S-BOT-Patientinnen beträgt 38 Jahre, bei einer Spanne von ca. 17 bis 77 Jahren (Hart WR, 2005). Bei Frauen mit Kinderwunsch kann im FIGO-Stadium I unter bestimmten Voraussetzungen zumindest teilweise Organ erhaltend operiert werden. (Diebold J et al., 2004)

Eine adjuvante Radio- oder Chemotherapie ist bei S-BOTs nicht indiziert, da die Prognose davon unbeeinträchtigt bleibt (Bell DA et al., 1988).

Wichtig ist eine sorgfältige Nachsorge. Zwar liegt die Rezidivrate der ovariellen Borderline-Tumoren nur bei ca. 7-10%, die Prognose dieser Fälle liegt aber deutlich unter der bei Erstmanifestation.<sup>2</sup> Aufgrund des gehäuferten Auftretens später Rezidive<sup>3</sup> empfehlen einige Autoren eine mindestens 20-jährige, besser lebenslange Nachsorge (Sehouli J et al., 2002). Beispielsweise sind in der Frauenklinik der Charité nach R0-Resektion folgende Kontrollintervalle üblich: 3 Jahre lang alle 3 Monate, weitere 2 Jahre lang alle 6 Monate und anschließend jährlich.

## 1.2 Tumorgenese und -progression

Die Entstehung solider Tumoren beim Menschen basiert nach der aktuellen Lehrmeinung auf einem meist mehrstufigen Mutationsprozess somatischer DNA. Dieser beinhaltet die Aktivierung von Protoonkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppres-

---

<sup>2</sup> Die 5-Jahres-Überlebensrate von 129 untersuchten BOT-Patientinnen lag bei Primärtumoren bei 90,6%, bei Rezidivfällen dagegen nur bei 72,9% (Olszewska H et al., 2005).

<sup>3</sup> Das mediane progressionsfreie Intervall bei BOTs beträgt ca. 7 Jahre mit einer Streubreite von 0,7 bis 16 Jahren (Gershenson DM et al., 1998).

---

sorgen oder Mismatch-Repair-Genen (Ionov Y et al., 1993; Nowell PC, 1976). Die Folgen sind ein autonomes Wachstum, der Verlust von Kontakthemmung und Apoptose, erhöhte Proliferationsraten aufgrund entkoppelter Zellzykluskontrolle und der Entzug aus der immunologischen Abwehr trotz des Auftretens neuer Oberflächenantigene. Die schrittweise Progression durch Akkumulation von einzelnen Genmutationen wurde als Adenom-Karzinom-Sequenz erstmalig bei kolorektalen Karzinomen beschrieben (Vogelstein B et al., 1988). Inwiefern ein ähnliches Modell auch auf die ovarielle Tumourprogression zutrifft, ist zur Zeit noch nicht endgültig geklärt. Während bei den nicht-serösen (vor allem muzinösen und endometrioiden) Neoplasien eine entsprechende Sequenz anzunehmen ist (Shih I-M, Kurman RJ, 2005), wird dies bei den serösen aktuell noch kontrovers diskutiert.

Für eine solche Sequenz sprechen u.a. epidemiologische Beobachtungen, z.B. eine familiäre Häufung. So ist die Prävalenz von benignen epithelialen Tumoren bei Verwandten 1. und 2. Grades von Frauen mit Ovarialkarzinom 5-fach erhöht. (Bell DA, 2005). Außerdem wurde beobachtet, dass das Durchschnittsalter der Patientinnen bei gleichem Zelltyp vom Adenom (44 Jahre) über den BOT (48 Jahre) bis hin zum Karzinom (56 Jahre) kontinuierlich zunimmt. (Bell DA, 2005). Auffällig ist dabei allerdings ein unterschiedlicher postmenopausaler Verlauf: Während bei den BOTs ein Plateau erreicht wird, steigen die Krebs-Inzidenzen über die folgenden zwei Lebensjahrzehnte hinweg weiter an (Sherman ME et al., 2004). Hier scheinen noch ungeklärte prämenopausale bzw. lebenslange Expositionen ätiologisch eine Rolle zu spielen. Unter den bisher identifizierten Risikofaktoren gibt es viele Gemeinsamkeiten, mit Ausnahme der oralen Kontrazeption, die das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, reduziert, nicht jedoch an einem BOT (Sherman ME et al., 2004).

Auch molekulargenetisch gibt es verschiedene Ansätze, die auf einen direkten Zusammenhang zwischen unterschiedlich differenzierten epithelialen Tumoren des Ovars hinweisen: So besitzen benigne Zysten in Verbindung mit serösen Karzinomen ähnliche zytogenetische Veränderungen wie diese und könnten damit Vorläuferläsionen sein (Wolf NG et al., 1996; Zheng J et al., 1995). Warrenfeltz et al. betrachten den Borderline-Tumor als Zwischenstadium zwischen Adenom und Karzinom, basierend auf dem Vergleich der Expressionsprofile von 163 mittels Microarrays untersuchten Genen (Warrenfeltz S et al., 2004).

Verschiedene Studien haben ein ähnliches LOH-Muster (u.a. auf den Chromosomen 6q, 7p, 7q, 9p und 11q) bei BOTs und Karzinomen offenbart (Haas C et al., 1999; Tibiletti MG et al., 2001; Watson RH et al., 1998). Das Muster der chromosomalen Zugewinne und Verluste bei Adenomen, S-BOTs und Karzinomen sei laut Diebold nicht zu-

---

fällig, sondern zeige eine enge Beziehung, die mit der Sequenztheorie kompatibel sei (Diebold J et al., 1996).

Demgegenüber steht eine Reihe von Forschungsarbeiten, die eine Progression von benignen zu malignen Ovarialtumoren widerlegen. Ihnen zufolge gibt es signifikante Unterschiede in der Genexpression dieser Läsionen (Tapper J et al., 2001).

So werden beispielsweise Mutationen des Tumorsuppressorgens p53, die relativ häufig in Ovarial-CAs nachweisbar sind (ca. 48%), nur selten in Adenomen und S-BOTs gefunden (Sherman ME et al., 2004; Teneriello MG et al., 1993). In diesen Fällen ist die Überexpression mit einem höheren Stadium und einer erhöhten Progressionswahrscheinlichkeit verbunden (Ortiz BH et al., 2001). Ortiz et al. fanden bei der Untersuchung von 8 S-BOTs mit assoziierten malignen Folgetumoren 3 Fälle mit mutiertem p53-Gen im S-BOT bei unauffälligem p53-Status des Karzinoms, was als Beweis für einen nicht-klonalen Ursprung gewertet werden kann.

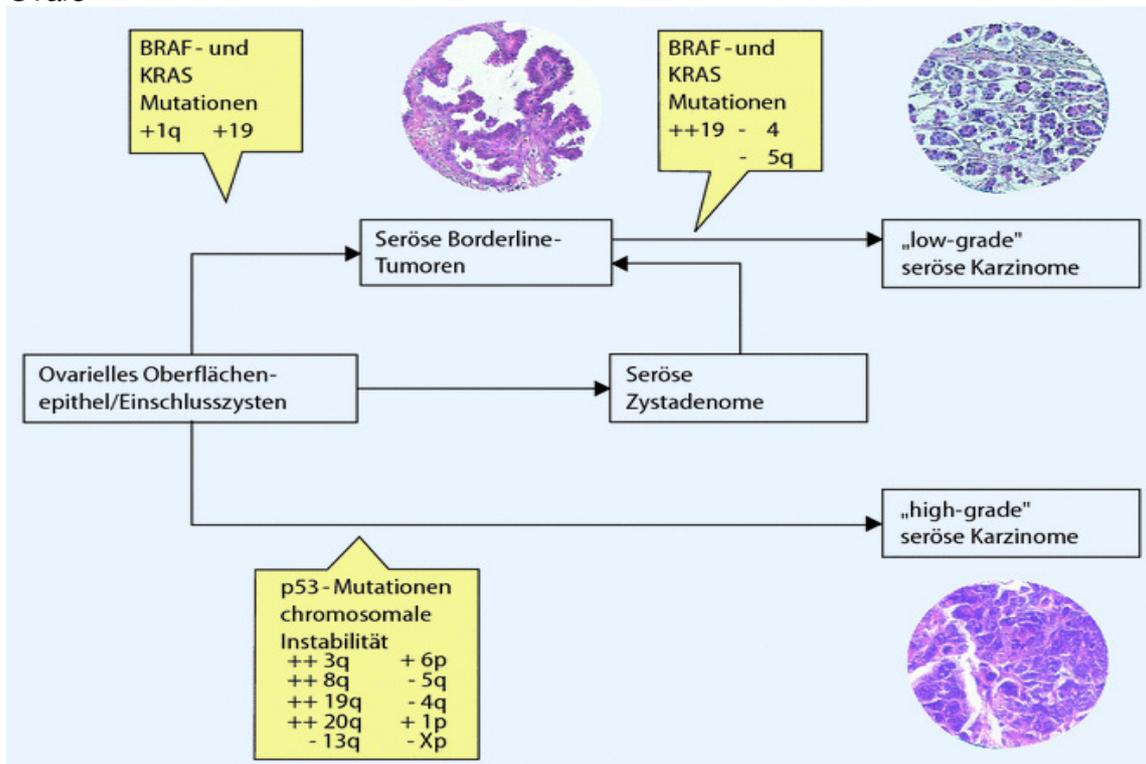
Auch der Vergleich von K-RAS- und B-RAF-Mutationen unterstützt diese Hypothese: Diese Protoonkogene sind als Mediatoren zellulärer Antworten auf Wachstumssignale in der Entstehung verschiedener menschlicher Neoplasien beteiligt. Sie scheinen äquivalente tumorigene Effekte zu haben und treten nie gemeinsam auf. In BOTs ist regelmäßig eines der beiden Gene verändert, jedoch nur selten in „high-grade“-Karzinomen (Mayr D et al., 2006; Pieretti M et al., 1995). Beim verbleibenden Anteil der S-BOTs (ca. 30%), die weder eine K-RAS- noch eine B-RAF-Mutation aufweisen, wäre eine Progression zum „high-grade“-CA dagegen möglich (Sieben NLG et al., 2004). Bezüglich der Beziehung zwischen Adenomen und S-BOTs zeigte eine Studie, dass nur diejenige Subgruppe der Adenome K-RAS- oder B-RAF-Mutationen aufwies, die mit S-BOTs assoziiert war (Ho C-L et al., 2004). Diese Profile legen den Verdacht nahe, dass nur ein Teil der Adenome das Potential zur Progression zum BOT in sich trägt. Mutationen in den K-RAS und B-RAF-Genen sind entsprechend dieser Ergebnisse als frühe Ereignisse in der Tumorprogression einzustufen, die jedoch keine maligne Transformation bewirken.

Analysen von Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) erbrachten kontroverse Ergebnisse: Einige Arbeitsgruppen fanden bei einem signifikant höheren Prozentsatz der S-BOTs (30 bzw. 27%) im Vergleich zu den Ovarial-CAs (max. 6,45%) Mikrosatelliteninstabilitäten (Haas C et al., 1999; Tangir J et al., 1996). Yoon et al. dagegen konnten in dieser Hinsicht keinen Unterschied zwischen Borderline- und malignen Tumoren des Ovars feststellen. MSIs waren in beiden Gruppen gleich seltene Ereignisse (ca. 12%) und schienen eine relativ geringe klinische Bedeutung zu haben (Yoon BS et al., 2008).

---

Miteinander vereinbar werden diese gegensätzlichen Beobachtungen im Wesentlichen durch die Differenzierung der Karzinome in „low-grade“- und „high-grade“-Neoplasien, die auch als Typ I und II bezeichnet werden (Bell DA, 2005; Kurman RJ et al., 2008; Shih I-M, Kurman RJ, 2004). Dieses dualistische Modell beruht auf der Annahme unterschiedlicher Pathways (siehe Abb. 4):

**Abb. 4:** dualistisches Mehrschrittmodell der Pathogenese von serösen Neoplasien des Ovars



Quelle: Staebler A, Diebold J, 2007

Die Typ-I-Neoplasien (seröse „low-grade“-CAs, muzinöse CAs, endometrioides CAs, maligne Brenner-Tumoren und klarzellige Tumoren) entarten schrittweise über folgende Sequenz: Zystadenom/Adenofibrom → BOT (serös: typischer BOT → mikropapillärer BOT) → invasives „low-grade“-CA. Die enge Verwandtschaft zwischen diesen Entitäten wird u.a. durch ein ähnliches Genexpressionsprofil belegt (Meinhold-Heerlein I et al., 2004; Singer G et al., 2002). Charakteristisch sind lange klinische Verläufe mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 55%, eine niedrige Proliferationsrate und eine gering- bis mäßiggradige Kernpleomorphie (Sehdev AES et al., 2003; Staebler A, Diebold J, 2007). Sie sind in der Regel auf die Ovarien begrenzt (Shih I-M, Kurman RJ, 2004).

Der Typ II dagegen umfasst eine Gruppe hoch maligner Tumoren (seröse „high-grade“-CAs, maligne mesodermale Mischtumoren und undifferenzierte Karzinome), die de novo im Oberflächenepithel oder aus oberflächlichen Inklusionszysten entstehen, ohne

dass Vorläuferläsionen nachweisbar wären (Shih I-M, Kurman RJ, 2004). Sie zeigen bei einem erhöhten Proliferationsindex ein schnelleres und aggressiveres Wachstum und metastasieren früher. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur ca. 30% (Sehdev AES et al., 2003). Diese Läsionen haben ein charakteristisches Mutationsprofil, das sich deutlich von dem der erstgenannten Gruppe unterscheidet (Dodson MK et al., 1993; Singer G et al., 2002). Tabelle 1 verdeutlicht dies anhand einiger Literaturbeispiele.

*Tab. 1: Auswahl molekulargenetischer Charakteristika bei S-BOTs, serösen „low-grade“- und serösen „high-grade“-Karzinomen*

	S-BOT	seröses „low-grade“-CA	seröses „high-grade“-CA	Quelle
<b>TP53-Mutation und p53-Überexpression</b>	selten	selten	ca. 60%	(Bell DA, 2005)
<b>K-RAS-Mutation</b>	27-36%	ca. 1/3	0-12%	(Bell DA, 2005)
<b>B-RAF-Mutation</b>	33-50%	ca. 1/3	0%	(Bell DA, 2005)
<b>HLA-G-Überexpression</b>	0%	0%	61%	(Shih I-M, Kurman RJ, 2004)
<b>apoE-Überexpression</b>	0%	12%	66%	(Shih I-M, Kurman RJ, 2004)
<b>MSI</b>	häufig (27-30%) selten (12%)		selten (< 7%) selten (12%)	(Haas C et al., 1999; Tangir J et al., 1996) (Yoon BS et al., 2008)
<b>Allelic imbalance index<sup>4</sup></b>	niedrig	mittelhoch	hoch	(Singer G et al., 2002)

Allerdings beschreiben Zheng et al. den Weg der Transformation eines „low-grade“-CAs in ein „high-grade“-CA über eine Deletion auf Chromosom 3 oder 11 (zusätzlich zur in jenen regelmäßig vorhandenen HER2-*neu*-Amplifikation oder Deletion auf Chromosom 6). Sie räumen jedoch auch die Möglichkeit einer de-novo-Entstehung von „high-grade“-Neoplasien aus Normalgewebe ein, wie sie in oben dargestelltem Schema beschrieben wird (Zheng J et al., 1991). Mit analoger Fragestellung untersuchten Dehari et al. aus einem Pool von 210 archivierten serösen Ovarialtumoren diejenigen, in denen seröse „high-grade“-Karzinome in direkter Assoziation mit serösen Borderline-Tumoren oder „low-grade“-Karzinomen auftraten. Die Klonalitätsanalyse offenbarte in 4 der 6 Fälle ein morphologisches Kontinuum, während 2 Fälle Unterschiede zeigten. In einer zusätzlich durchgeführten Mutationsanalyse hinsichtlich K-RAS, B-RAF und p53 zeigten die beiden einzigen informativen Fälle identische Mutationen. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass zumindest eine kleine Minderheit der Typ-I-Neoplasien zum Typ II entarten könnte (Dehari R et al., 2007).

<sup>4</sup> Die allelische Imbalance gilt als Indikator der chromosomalen Instabilität (Shih I-M, Kurman RJ, 2004).

Insgesamt ist es wahrscheinlich, dass die meisten S-BOTs Zwischenstufen in der Progression von Adenomen zu niedrig malignen serösen Typ-I-Karzinomen darstellen, während die davon abzugrenzende Gruppe der Typ-II-Neoplasien, evtl. mit Ausnahmen, de novo entsteht.

### 1.3 Mikrosatelliten als molekulargenetische Marker

Unter dem molekularbiologischen Begriff „Satelliten“ versteht man tandemartig angeordnete repetitive Sequenzen, die mehr oder weniger gleichmäßig über alle eukaryontischen Genome verteilt sind. Besonders häufig sind sie in nicht-kodierenden Regionen zu finden (Hancock JM, 2001). Der Name geht auf die Dichtegradientenzentrifugation zurück, bei der sich diese Abschnitte aufgrund ihrer abweichenden Basenzusammensetzung als kleine "Satellitenbanden" abtrennen lassen. Dementsprechend werden besonders kurze Sequenzen mit einer Länge von max. 6 bp als „Mikrosatelliten“ (synonym: simple sequence repeats (SSR), simple sequence length polymorphisms (SSLP) oder short tandem repeats (STR)) bezeichnet (Schlötterer C, 2000).

Ihre Funktion ist bislang noch ungeklärt. Sie scheinen u.a. als Bindungsstellen für regulatorische Proteine zu dienen und dadurch die Transkription zu beeinflussen (Epplen JT et al., 1996; Kashi Y, Soller M, 2001). Verschiedene Studien zeigten außerdem einen phänotypischen Einfluss der MS-Länge auf Physiologie und Entwicklung des Organismus. Sie könnten damit eine wesentliche Quelle für quantitative genetische Variabilität und evolutionäre Adaptation sein (Kashi Y, Soller M, 2001). Bei bestimmten neurodegenerativen Erkrankungen mit Trinukleotid-Repeats, wie z.B. Chorea Huntington, sind sie pathogenetisch relevant.

Für die Entstehung von Mutationen sind diese Sequenzen besonders prädisponiert, da es bei der Replikation zum Verrutschen und zur Fehlpaarung der DNA-Stränge kommen kann. Durch Phasenverschiebung im repetitiven Muster kommt es zur Verkleinerung oder Vergrößerung der Modulzahl und damit zur Verkürzung oder Verlängerung der betroffenen DNA-Region (Hancock JM, 2001). Mikrosatelliten sind dadurch oftmals hoch polymorph und können diagnostisch als Marker für Kopplungsanalysen, zur Kartierung des Genoms und für forensische und populationsgenetische Zwecke genutzt werden (Koreth J et al., 1996; Schlötterer C, 2000).

Auch in der Tumorforschung haben sie einen hohen Stellenwert, da entsprechende Loci bei zahlreichen Neoplasien verändert sind (Mao L et al., 1994). Die mittels PCR und hochauflösender Gele nachweisbare Mikrosatelliteninstabilität reflektiert die genetische Instabilität in Tumorzellen (Lengauer C et al., 1998). Sie gilt als Indikator für den

---

Verlust der DNA-Mismatch-Repair-Aktivität (Honchel R et al., 1995). Dieser Mechanismus ist v.a. bei der Entstehung von hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinomen (HNPCC) und anderen Tumoren des Lynch-Syndroms pathogenetisch von großer Bedeutung (Honchel R et al., 1995). An der Entstehung seröser Borderline-Tumoren des Ovars könnte er laut Tangir et al. zumindest teilweise beteiligt sein. So finden sich deutliche Parallelen zwischen diesen unterschiedlichen Entitäten: Beide verhalten sich eher indolent, haben relativ hohe Überlebensraten, tendieren zu niedrigeren Tumorstadien, zeigen wenige allelische Verluste und treten frühzeitig auf (Tangir J et al., 1996). Die aktuelle Bedeutung der Mikrosatelliten basiert insbesondere auf ihrer Nutzung als molekulargenetische Marker. Dazu eignen sie sich durch ihr ubiquitäres Vorkommen im gesamten Genom, die kodominante Auswertbarkeit bei Mendelschem Erbgang, ihren hohen Polymorphiegrad und die gute Automatisierbarkeit im PCR-Verfahren (Koreth J et al., 1996).

---

## 2 Zielstellung

Die serösen Borderline-Tumoren des Ovars sind auffallend häufig mit extraovariellen, meist peritonealen Herden assoziiert, die als Implants bezeichnet werden. Der pathogenetische Zusammenhang zwischen diesen histologisch sehr ähnlichen Tumormanifestationen ist bislang noch ungeklärt. Einerseits könnte es sich um metastasenartige Absiedelungen klonaler Zellen des ovariellen Primärtumors handeln; andererseits könnte ein Felddefekt zur multifokalen malignen Transformation mesothelialer Strukturen führen und damit zum syn- oder metachronen Auftreten voneinander unabhängiger, polyklonaler Tumoren. Möglicherweise existieren auch beide pathogenetischen Mechanismen nebeneinander.

Dies zu prüfen, war Ziel dieser Arbeit. Da histopathologische Untersuchungen nicht zwischen mono- und polyklonalem Ursprung unterscheiden können, wurde ein molekulargenetischer Ansatz gewählt. Aus archivierten Resektionsblöcken von Patientinnen mit serösen Borderline-Tumoren des Ovars und peritonealen Herden wurde die DNA isoliert, amplifiziert und mittels Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Verwendung von 10 für diese Zwecke bereits etablierten Mikrosatellitenmarkern wurde unter Ausnutzung ihrer Polymorphismen ein Vergleich des Bandenmusters zwischen den unterschiedlich lokalisierten Tumorfoci angestrebt. Hierbei sollte die Häufigkeit des Auftretens konkordanter und diskordanter Profile dokumentiert und analysiert werden, um Aussagen über die Klonalität der Proben treffen zu können. Unter Berücksichtigung von Untersuchungsergebnissen anderer Studien sollten Rückschlüsse auf den Entstehungsmechanismus der Implants und ihren pathogenetischen Zusammenhang mit den S-BOTs gezogen werden. Äquivalent galt es, die mono- oder polyklonale Herkunft bilateraler S-BOT-Foci zu klären.

Aus einem besseren Verständnis der klonalen Beziehungen zwischen S-BOTs und Implants würden sich weitreichende Konsequenzen für die diagnostische Terminologie und das Verständnis der ovariellen Tumorentstehung ergeben.

---

## 3 Material

### 3.1 Patienten und Tumormaterial

Das untersuchte Tumorgewebe stammt von 12 S-BOT-Patientinnen, die zwischen 1997 und 2005 in Halle, Merseburg, Schwerin und Gummersbach behandelt wurden. Zum Zeitpunkt ihres stationären Aufenthaltes waren sie zwischen 19 und 62 Jahre, im Durchschnitt 42,6 Jahre alt. Abhängig vom konkreten Befund wurden uni- oder bilaterale Salpingoophorektomien, transabdominale Hysterektomien, Omentektomien, peritoneale Probeexzisionen, Spülzytologien, Lymphknotenextirpationen und in 2 Fällen auch adjuvante Chemotherapien durchgeführt. Zum weiteren Verlauf können nur eingeschränkt Aussagen gemacht werden, da das Follow-up nicht konsequent durchgeführt wurde. Bei 3 Patientinnen liegen hierzu überhaupt keine Daten vor. Unter den übrigen zeigten 8 Frauen im postoperativen Beobachtungszeitraum von 7 bis 97 Monaten keinen Hinweis auf ein Rezidiv, während eine (Fall Nr. 29) nach 45 Monaten am Tumorprogress verstarb.

Die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorproben wurden dem Archiv des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entnommen und vor Beginn der Untersuchung in HE-gefärbten Präparaten histologisch reevaluiert. Es handelte sich durchweg um primär fortgeschrittene (also initial nicht auf das Ovar begrenzte), typische S-BOTs mit je 1-8 extraovariellen Herden (im Durchschnitt fünf pro Fall) im Peritoneum, im Omentum (majus und minus) oder in regionalen Lymphknoten.

In 7 der 12 Fälle war eine Oberflächenbeteiligung der S-BOTs nachweisbar. 5 waren uni-, 7 bilateral lokalisiert.

Sämtliche Implants waren nicht-invasiv. Davon zeigten 20 ein epitheliales und 12 ein desmoplastisches Bild, 3 waren Lymphknoten-Implants und 8 mit Endosalpingioseherden im Peritoneum assoziiert.

Insgesamt wurden 62 Proben untersucht: 19 ovarielle und 43 extraovarielle.

Tab. 2 gibt einen Überblick über die klinischen Daten in Zusammenhang mit den untersuchten Fällen. Zur Histopathologie siehe auch Tab. 10, Kapitel 5.

---

Tab. 2: klinische Daten zu den untersuchten Fällen

Fall-Nr.	KH	Alter bei OP	Uni-/Bilateralität	Oberflächenbeteiligung	Anzahl der IMPs (Proben)	Lokalisation IMPs	OP (+ggf. Chemo)
16	ME	41,70	bi	ja	5 (3)	OM	TAH+BSO+OE+AE
21	UKH	35,39	uni	nein	4 (4)	OM	TAH+USO+OE
26	EK	60,02	bi	nein	7 (4)	PER,OM,LK	TAH+BSO+OE+AE
29	UKH	38,96	bi	nein	8 (8)	PER,OM	TAH+BSO+OE+AE
32	UKH	32,32	bi	ja	5 (5)	OM	TAH+BSO+OE
50	SN	62,01	uni	nein	3 (3)	PER	k.A.
52	SN	51,37	uni	ja	2 (2)	PER,OM	k.A.
57	SN	41,31	uni	ja	3 (2)	OM	k.A.
75	EK	39,67	bi	ja	6 (2)	PER,OM,LK	TAH+BSO+OE+LKE(+CH)
78	EK	48,84	bi	ja	5 (4)	PER,OM	TAH+BSO+AE+CE(+CH)
108	GM	19,91	uni	ja	1 (1)	PER,OM	BSO+PS+OE+LKE+ZYT
109	GM	40,40	bi	nein	6 (5)	PER,OM	TAH+BSO+OE+AE+PS

**Legende:**

KH = Krankenhaus

ME = Karl-von-Basedow-Klinikum Merseburg

UKH = Universitätsklinikum Halle

EK = Elisabeth-KH (Halle)

SN = Klinikum Schwerin

GM = Kreis-KH Gummersbach

OP = Operation

uni = unilateral

bi = bilateral

IMP = Implant

OM = Omentum (majus / minus)

PER = Peritoneum

LK = Lymphknoten

TAH = transabdominale Hysterektomie

BSO = bilaterale Salpingoophoroektomie

USO = unilaterale Salpingoophoroektomie

OE = Omentektomie

AE = Appendektomie

LKE = Lymphknotenextirpation

k.A. = keine Angaben

CE = Cystektomie

CH = Chemotherapie (Taxol / Cisplatin / Carboplatin)

ZYT = Zytologie

PS = peritoneales Sampling

### 3.2 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
100bp-DNA-Molekulargewichtsstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid/Bis-Lösung	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
APS	Roth, Karlsruhe
Blue Slick	Serva, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
BSA	Promega, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
DMSO	Serva, Heidelberg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Salpetersäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Promega, Heidelberg
TEMED	Sigma, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Xylol	Merck, Darmstadt

### 3.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Proteinase K	Serva, Heidelberg
HotStarTaq® DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

### 3.4 Puffer und Lösungen

#### Verdaupuffer Manos:

50 mM Tris (pH 8,5)

1 mM EDTA

0,5% Tween 20

#### Salzpuffer Lahiri:

10 mM Tris-HCl (pH 7,6)

10 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

0,4 M NaCl

2 mM EDTA

#### DNA-Lösungspuffer:

10 mM Tris-HCl

0,1 mM EDTA

#### TBE-Puffer (10x):

108 g Tris-HCl

55 g Borsäure

20 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0)

→ mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen

#### Denaturierender Auftragspuffer:

10 ml Formamid

10 mg Xylencyanol

10 mg Bromphenolblau

200 µg EDTA (pH 8,0)

6,7% / 8% Polyacrylamidgel-Stammlösung:

453,6 g Urea

108 ml TBE-Puffer (10x)

180 ml bzw. 215 ml Acrylamid/Bis-Lösung

→ mit H<sub>2</sub>O auf 1l auffüllenPolyacrylamidgel-Lösung:

80 ml steril gefilterte 6,7% bzw. 8% Polyacrylamidgel-Stammlösung

1 ml 10% APS

3 ml 10% TEMED

**3.5 Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
BioDocAnalyzer	Biometra, Göttingen
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Concentrator 5301 (Vakuumzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Consort E321 (Spannungsgerät)	Consort, Turnhout
Fluolink TFL-35M (UV)	Vilber Lourmat, Torcy
IKAMAG RET (Magnetrührer)	IKA, Staufen
Laminarbox	Flow Laboratories, Meckenheim
Mettler AM100 (Waage)	Mettler-Toledo, Gießen
Mikrotom	Leica, Nussloch
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research, Waltham
Phero-Temp 60 (Vakuum-Geltrockner)	Biotec-Fischer
POWER-ALL 6000/100 (Spannungsgerät)	Serva, Heidelberg
Sequi-Gen GT (Gelkammer-System)	BioRAD, München
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UltraspecIII Photometer	Pharmacia, Uppsala
Vacuum Controller	Ilmvac, Ilmenau
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich, Tuttingen

### 3.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen	Greiner, Nürtingen

### 3.7 Molekulargenetische Marker

Als molekulargenetische Marker wurden 10 Mikrosatelliten ausgewählt, die sich in vorangegangenen Studien als informativ erwiesen haben (Siehe Tab. 3.)

*Tab. 3: Primer, PCR-Bedingungen und Produktgrößen der verwendeten Mikrosatellitenmarker*

MS-Marker	Chromosom	Primer	Annealing-Temp.	Anzahl der Zyklen	Produktgröße in bp
D3S1744 (D3)	3	TTTAAGCGGAAGGAAGTGTG CTGGCCCCATCTCTCTAT	56°C	35	131-163
D6S1056 (D6)	6	ACAAGAACAGCATGGGGTAA CCTGGATCATGAATTGCTAT	56°C	35	237-273
D7S2846 (D7)	7	TCTAAACTCCTTTGCACAGTC ACATGTGTCCATCAAATGATG	56°C	35	172-196
D14S306 (D14)	14	AAAGCTACATCCAAATTAGGTAGG TGACAAAGAACTAAAATGTCCC	56°C	35	190-210
D16S764 (D16)	16	TTGTTAAGTGAGGCATGATG CTGTGCTTGGACCTGAAGAT	56°C	35	96-116
D18S858 (D18)	18	AGCTGGAGAGGGATAGCATT TGCATTGCATGAAAGTAGGA	56°C	35	190-208
D22S420 (D22)	22	ATGTGGTCGCTGTGTTCTAC AGTTCAGTGGGACCTACGTT	56°C	35	139
MYC-L1	1	CTTTTTAAGCTGCAACAATTT TGGCGAGACTCCATCAAAG	53°C	40	140-209
BAT25	3	TGCCTCCAAGA ATGTAAGT TCTGCATTTTA ACTATGGCTC	56°C	40	100
BAT26	2	TGACTACTTTTGACTTCAGCC AACCATTCAACATTTTAAACCC	58°C	40	100

Quellen:

D3, D6, D7, D14, D16, D18, D22: (Best DH et al., 2004)

MYC-L1: (Mäkelä TP et al., 1992)

BAT25 + BAT26 : (Liu B et al., 1995)

## 4 Methoden

### 4.1 DNA-Isolation aus Paraffinmaterial

Die zu untersuchende DNA wurde aus formalinfixiertem und paraffiniertem Tumormaterial isoliert. Dazu wurde eine modifizierte Methode nach Wright und Manos (Wright D, Manos M, 1990) sowie Lahiri und Nurnberger (Lahiri D et al., 1997) genutzt:

- Herstellung von 4x25 µm Schnitten mit dem Mikrotom
  - 10 min Inkubation in Xylol bei Raumtemperatur
  - dreimalige Zentrifugation mit 12.000 U/min für je 3-5 min → bis zur vollständigen Lösung des Paraffins
  - Mischung mit 1 ml 96%-igem Ethanol und erneute Zentrifugation (12.000 U/min, 3-5 min)
  - Wiederholung dieses Schrittes
  - mind. 5 min Trocknung des Pellets in der Vakuumzentrifuge bei 45°C
  - Zugabe von 720 µl Verdaupuffer Manos und 80 µl Proteinase K-Stammlösung (2 mg/ µl) zum getrockneten Pellet
  - Inkubation bei 37°C unter leichtem Schütteln im Thermomixer (über Nacht)
  - Inaktivierung der Proteinase bei 95°C im Thermomixer
  - nach Abkühlung: 5 min Zentrifugation mit 12.000 U/min bei 4°C
  - Entfernung der Gewebereste
  - Zugabe von 800 µl Salzpuffer Lahiri und 25 µl SDS zum Überstand
  - 10 min Inkubation bei 55°C, dann Abkühlung
  - 5-10 min Zentrifugation mit 12.000 U/min bei 4°C,
  - evtl. Wiederholung bis zur Klärung der Lösung
  - Mischung des Überstandes mit gleichem Volumen Isopropanol
  - Fällung der DNA bei -20°C (mind. 2 h) bzw. -80°C (mind. 30 min)
  - 20-30 min Zentrifugation mit 15.000 U/min bei 4°C
  - Abgießen des Isopropanols
  - mehrmaliges Waschen des Pellets mit je 500 µl Ethanol (70%)
  - 10 min Zentrifugation mit 10.000 U/min bei 4°C
  - Abgießen des Überstandes
  - 5 min Trocknung des Pellets in der Vakuumzentrifuge bei 45°C
  - Lösung des Pellets in 50-100 µl DNA-Lösungspuffer
-

Zur photometrischen Bestimmung der erhaltenen DNA-Konzentration wurde die Extinktion der 100fach verdünnten DNA-Probe bei 260 und 280 nm gemessen. Folgende Formel diente als Grundlage der Berechnung:

$$\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = \text{Extinktion (bei 260 nm)} \times 5.000$$

Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm wurde als so genannter Reinheitsquotient berücksichtigt. Werte außerhalb des Toleranzbereiches von 1,75 bis 2,1 wurden als Verunreinigungen der Proben gewertet.

#### 4.2 PCR

Die DNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion, unter Nutzung oben genannter Marker (siehe Tab. 3, Kapitel 3.7), amplifiziert.

Dazu wurden folgende Ansätze gewählt:

*Tab 4.: PCR-Ansätze*

	Menge ( $\mu\text{l}$ )				Hersteller
	D3, D6, D7, D14, D16, D22	D18	BAT25, BAT26	Myc-L1	
Puffer	5				Qiagen, Hilden
dNTPs (2,5 mM)	4				Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Q-Solution	10				Qiagen, Hilden
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	2	2	1,5	Qiagen, Hilden
Primer 1 (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2	2	1,75	2,5	TIB MOLBIOL, Berlin
Primer 2 (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2	2	1,75	2,5	TIB MOLBIOL, Berlin
HotStarTaq (5U/ $\mu\text{l}$ )	0,3				Promega, Heidelberg
DNA (20 ng/ $\mu\text{l}$ )	5				
Aqua bidest.	18,7	19,7	20,2	19,2	
<b>gesamt</b>	<b>50</b>				

Die PCR-Bedingungen wurden in Anlehnung an die Originalprotokolle der unterschiedlichen Mikrosatellitenmarker durchgeführt und weiter angepasst (Best DH et al., 2004). Die Reaktionen beinhalteten folgende Schritte:

*Tab. 5: PCR-Programm D3, D6, D7, D14, D16 + D22*

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	95°C	15 min	-
Denaturierung	95°C	30 s	} 35x
Annealing	56°C	30 s	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation	72°C	8 min	-
Terminierung	4°C	∞	-

*Tab. 6: PCR-Programm D18*

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	95°C	15 min	-
Denaturierung	94°C	30 s	} 27x
Annealing	60°C	75 s	
Elongation	72°C	15 min	
Elongation	72°C	6 min	-
Terminierung	4°C	∞	-

*Tab. 7: PCR-Programm BAT25*

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	95°C	15 min	-
Denaturierung	94°C	1 min	} 40x
Annealing	56°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation	72°C	8 min	-
Terminierung	4°C	∞	-

*Tab. 8: PCR-Programm BAT26*

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	95 °C	15 min	-
Denaturierung	94 °C	1 min	} 40x
Annealing	58 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	8 min	-
Terminierung	4 °C	∞	-

*Tab. 9: PCR-Programm MYC-L1*

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	95 °C	15 min	-
Denaturierung	94 °C	1 min	} 39x
Annealing	53 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	8 min	-
Terminierung	4 °C	∞	-

### 4.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die semiquantitative Analyse der PCR-Produkte erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung in 1%-igen Agarosegelen (1 g Agarose + 5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml TBE-Puffer (0,5x)). Zum Vergleich wurden nebeneinander 1 µl des 100bp-Leiters und je 5 µl der PCR-Produkte (einschließlich Positivkontrollen aus Lymphozyten gesunder Probanden und Negativkontrolle ohne DNA), jeweils versetzt mit 2 µl Xylencyanol als Farbstoff, aufgetragen. Die Elektrophorese lief mit einer Spannung von 85 V.

Anschließend konnten die entsprechenden Banden mit dem BioDocAnalyse-System unter UV-Licht fotografiert und dokumentiert werden.

## **4.4 Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

### **4.4.1 Probenvorbereitung**

Die Intensität der entstandenen Elektrophoresebanden wurde nach dem Schulnotensystem klassifiziert und der zu fällenden DNA-Menge zu Grunde gelegt. Demnach wurden zwischen 14 µl (Note 1) und 25 µl (Note 4) der Proben entnommen und in je 100 µl Isopropanol mindestens 2 h bei -20°C gefällt. PCR-Produkte mit zu schwacher Bande (Note 5) wurden verworfen und die vorhergehenden Schritte wiederholt.

Nach der Präzipitation wurden die Proben 30 min lang bei 4°C mit 15.000 U/min zentrifugiert und anschließend getrocknet. Die Pellets wurden in je 8 µl denaturierendem Auftragspuffer gelöst, 5 min bei 94°C denaturiert und wieder bei -20°C eingelagert.

### **4.4.2 Elektrophorese**

Die endgültige Elektrophorese erfolgte bei < 230 bp großen Markern in 8%-igen, bei größeren Produkten in 6,7%-igen Polyacrylamidgelen.

Zunächst wurden die dem Gel anliegenden Teile des Kammersystems (Glasplatte, Spacer, Pufferkammer) mit 70%-igem Ethanol, die Pufferkammer zusätzlich mit Blue Slick abgerieben, bevor das System nach Herstellerangaben zusammen gebaut wurde. Die frisch hergestellte Polyacrylamidgel-Lösung wurde mit Spritze und Schlauch zügig und möglichst blasenfrei eingegossen. Der passende Kamm musste sofort eingesetzt werden.

Nach mindestens 1 h war das Gel in der Regel ausreichend polymerisiert, um es in das Elektrophorese-System einsetzen und den Vorlauf starten zu können. Dazu wurde gut 1 l erhitzter TBE-Puffer in den Tank gefüllt, der Kamm entfernt und die Stromversorgung angeschlossen. Bei 100 W wurde das Gel auf max. 50°C erwärmt. Die Proben denaturierten parallel im Thermocycler bei 94°C, um dann nach gründlicher Spülung der Slots und Entfernung größerer Harnstoffreste nebeneinander aufgetragen zu werden. Dazu wurde eine Mischung aus je 1 µl Molekulargewichtsstandard und Auftragspuffer gegeben. Die Elektrophorese lief bei 86 - 88 W und ca. 45°C je nach Größe des Markers für 130 - 180 min.

### **4.4.3 Silberfärbung**

---

Nach Unterbrechung der Stromversorgung wurde die Gel tragende Glasplatte aus dem System entfernt und auf einem geeigneten Plexiglasrahmen befestigt. Nun erfolgte die Silberfärbung nach einer Methode von Sammoris et al. in folgenden Schritten (Sammoris DW et al., 1981):

- Spülung des Gels mit Aqua dest.
- 5 min Einwirkung von Ethanol (10%)
- 3 min Behandlung mit Salpetersäure (1%)
- 20 min Färbung mit Silbernitrat (0,2%)
- Spülung mit Aqua dest.
- Entwicklung in 3% Natriumcarbonat-Formalin (59,4 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 2 ml Formalin (37%) auf 2 l Aqua dest.), mehrmaliger Austausch bis zur ausreichenden Bandenfärbung
- ca. 2 min Abstoppen mit Essigsäure (10%)
- 2 min Schlusswässerung (Aqua dest.)

Anschließend wurde der Rahmen entfernt und das Gel auf ein Filterpapier übertragen. Auf diesem wurde es mittels einstündiger Vakuumtrocknung bei 80 °C fixiert.

Die Fälle, in denen tatsächlich Mikrosatellitenveränderungen auftraten, wurden in einer unabhängigen PCR erneut amplifiziert und in oben beschriebener Weise zur Darstellung gebracht.

## 5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Klonalitätsanalyse wurden 12 S-BOT-Fälle mit assoziierten Implants untersucht. Ihre DNA wurde an 10 ausgewählten Genorten mit bekannten repetitiven Sequenzen (Mikrosatelliten) amplifiziert, in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Bandenmuster ergeben sich aus der abweichenden Laufgeschwindigkeit unterschiedlich großer Allele. Hierbei werden grundsätzlich folgende Muster unterschieden (Arzimanoglou II et al., 1998; Cho NH et al., 2002; Schulz WA, 2005):

- Zugewinn: Der Begriff des Zugewinns beschreibt zum einen das Auftreten einer zusätzlichen Bande in der Tumorprobe im Vergleich zum Normalgewebe (als Resultat einer DNA-Abspaltung von einem der Allele bei identischer GesamtdNA), zum anderen aber auch die Intensitätszunahme eines Allels bei gleichzeitiger -abnahme (bis hin zum Verlust) des anderen.
- Verlust: Als Folge einer Deletion oder Rekombination beobachtet man den Verlust oder die deutliche Abschwächung einer Hauptbande bei gleichbleibender Intensität der zweiten Bande. Bei vollständigem Verlust eines Allels spricht man vom Verlust der Heterozygotie (LOH). Er wird mit dem Ausfall von Tumorsuppressorgenen in Verbindung gebracht.

Da die Differenzierung zwischen allelischem Zugewinn und Verlust aufgrund des Bandenmusters allein nicht möglich ist, spricht man besser von allelischer Imbalance (AI) (Koreth J et al., 1996).

- Mikrosatelliteninstabilität: Unter der MSI versteht man das Auftreten größerer oder kleinerer Stotterbanden, die nicht im normalen Gewebe auftauchen. Die normalen Banden können vorhanden sein oder verschwinden. Diese Veränderung resultiert aus der Expansion oder Kontraktion eines Mikrosatellitenlocus, entsprechend einer Insertion oder Deletion. Beim HNPCC konnte ein Zusammenhang mit der Inaktivierung von Genen, die in der Mismatch-Reparatur beteiligt sind, nachgewiesen werden (Dietmaier W et al., 1997).

Da sich Mikrosatelliten allgemein durch eine hohe Instabilität und Polymorphie auszeichnen, können auch im nicht-tumorösen Gewebe Bandenmuster „konserviert“ sein,

---

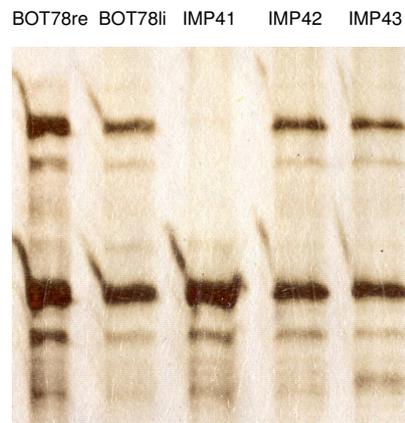
die vom Standardbild der zwei Allele (ein paternales und ein maternales) abweichen. So finden sich beispielsweise bei den Markern BAT25 und BAT26 in allen Proben zahlreiche Banden. Dies erschwert die Auswertung der Gelbilder. Hinzu kommt, dass in dieser Arbeit nur archiviertes Tumormaterial zur Verfügung stand, ohne Vergleichsproben aus gesundem Gewebe. Es sind also keine Aussagen über Mutationen zulässig, sondern nur der molekulare Vergleich zwischen ovariellen Tumoren und Implants im Sinne einer Klonalitätsanalyse.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurden die Gele ausgewertet. Abb. 5 zeigt einige repräsentative Beispiele.

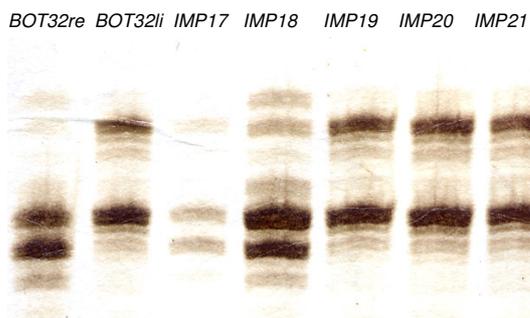
**Abb. 5 :** Beispiele der silbergefärbten Polyacrylamidgele



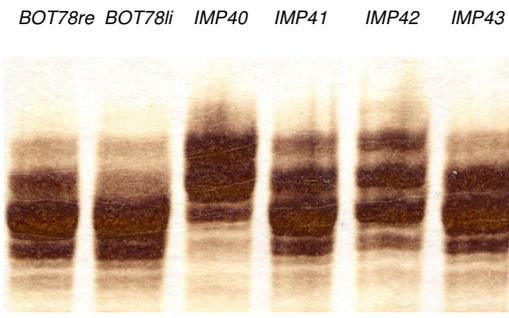
a) Im Fall Nr. 52 wurde im MS-Marker D3 eine MSI im IMP 27 festgestellt, die dieses vom S-BOT und vom IMP 26 unterschied.



b) Der Marker D7 offenbarte im Fall Nr. 78 eine AI. Am wahrscheinlichsten handelt es sich um einen Verlust im IMP 41.



c) Im linken BOT 32 und in den Implants 19-21 wurde mit Hilfe des Markers D18 eine MSI gefunden, die der rechte BOT 32 und die Implants 17 und 18 nicht aufwiesen.



d) Im Fall Nr. 78 zeigten im Locus von D18 nur der rechte BOT und IMP 43 dasselbe Muster, während die anderen Proben durch Zugewinne und Verluste an verschiedenen Stellen, also allelische Imbalancen, auffielen

Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tab. 10:** Ergebnisse der K-RAF- und B-RAF-Mutations- sowie der Mikrosatellitenanalysen

Fälle/ Proben	Histo- logie	K-RAS- Mutati- onen	B-RAF- Mutati- onen	Mikrosatellitenmarker										
				Codon 12+13	Codon 594-99	D3	D6	D7	D14	D16	D18	D22	BAT 25	BAT 26
Nr. 16														
<b>BOT 16re</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>BOT 16li</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 35</b>	NIEI	wt	wt	-	AI	-	-	-	-	AI	-	-	-	-
<b>IMP 36</b>	ES	wt	wt	-	-	-	-	-	-	AI	-	-	-	-
<b>IMP 37</b>	ES	wt	wt	-	-	-	-	-	-	AI	-	-	-	-
Nr. 21														
<b>BOT 21</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 1</b>	ES	wt	wt	-	-	-	MSI	-	-	-	-	-	-	AI
<b>IMP 2</b>	ES	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 3</b>	ES	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	AI	-	-	-
<b>IMP 4</b>	ES	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	AI	-	-	-
Nr. 26														
<b>BOT 26re</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	MSI	-	-	-
<b>BOT 26li</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 5</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 6</b>	LKI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 7</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 8</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nr. 29														
<b>BOT 29re</b>	S-BOT	G35T*	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>BOT 29li</b>	S-BOT	G35T*	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 9</b>	NIEI	G35T*	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 10</b>	NIDI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 11</b>	NIDI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 12</b>	NIDI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 13</b>	NIDI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 14</b>	NIDI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 15</b>	NIDI	wt	wt	-	-	-	-	-	AI	-	-	-	-	-
<b>IMP 16</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	AI	AI	-	-	-	-
Nr. 32														
<b>BOT 32re</b>	S-BOT	wt	wt	MSI	AI	-	AI	-	-	-	-	-	-	-
<b>BOT 32li</b>	S-BOT	G35A*	wt	-	-	-	-	-	-	MSI	-	-	-	-
<b>IMP 17</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 18</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 19</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	MSI	-	-	-	-
<b>IMP 20</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	MSI	-	-	-	-
<b>IMP 21</b>	NIEI	wt	wt	MSI	-	-	-	-	-	MSI	-	-	-	AI

Nr. 50														
<b>BOT 50</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 23</b>	ES	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 24</b>	ES	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MSI
<b>IMP 25</b>	NIDI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MSI
Nr. 52														
<b>BOT 52</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 26</b>	NIEI	wt	wt	-	MSI	-	MSI	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 27</b>	NIDI	G35A*	wt	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI	-	-	-	-	-	MSI
Nr. 57														
<b>BOT 57</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 30</b>	NIDI	wt	wt	-	MSI	-	MSI	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 31</b>	NIDI	wt	wt	-	MSI	-	MSI	-	-	-	-	-	-	-
Nr. 75														
<b>BOT 75re</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>BOT 75li</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 44</b>	LKI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 45</b>	LKI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nr. 78														
<b>BOT 78re</b>	S-BOT	wt	wt	-	MSI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>BOT 78li</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	AI	-	-	-	-
<b>IMP 40</b>	NIEI	wt	wt	AI	MSI	-	-	-	-	AI	-	-	-	-
<b>IMP 41</b>	NIEI	wt	wt	AI	-	AI	-	-	-	AI	-	-	-	-
<b>IMP 42</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	AI	-	-	-	-
<b>IMP 43</b>	NIEI	wt	wt	AI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nr. 108														
<b>BOT 108</b>	S-BOT	G35T*	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 87</b>	NIDI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MSI
Nr. 109														
<b>BOT 109re</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>BOT 109li</b>	S-BOT	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 88</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AI
<b>IMP 90</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AI
<b>IMP 91</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AI
<b>IMP 92</b>	NIEI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMP 93</b>	NIDI	wt	wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AI

*Legende: re = rechts; li = links; wt = Wildtyp*

*NIEI = nicht-invasives epitheliales Implant; NIDI = nicht-invasives desmoplastisches Implant; ES = Endosalpingiose; LKI = Lymphknoten-Implant*

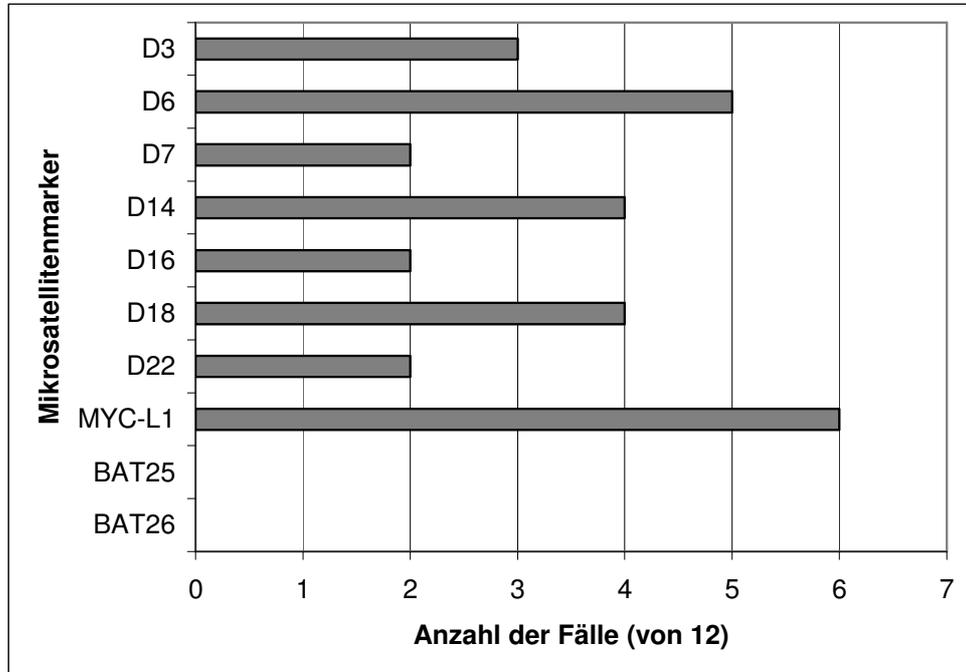
*MSI/AI untereinander gleiche MSIs bzw. Als*

*MSI/AI untereinander verschiedene MSIs bzw. Als*

*\* Die identifizierten K-RAS-Mutationen fanden sich ausschließlich im Codon 12.*

Von den 10 verwendeten Mikrosatellitenmarkern konnten 8 Marker Unterschiede in den untersuchten Tumorproben aufdecken. Abb. 6 gibt einen Überblick über die Anzahl der beobachteten Veränderungen.

*Abb. 6: Anzahl der Fälle mit allelischen Imbalancen oder Mikrosatelliteninstabilitäten pro Marker*



Die höchste AI- bzw. MSI-Frequenz wies der Marker MYC-L1 auf mit 50% (6 von 12 Fällen), gefolgt von D6 (41,7%), D14, D18 (je 33,3%), D3 (25%), D7, D16 und D22 (je 16,7%). Demgegenüber konnten in den Genloci von BAT25 und BAT26 keine Unterschiede zwischen S-BOT und assoziierten Implants nachgewiesen werden.

Die einzelnen Fälle stellten sich folgendermaßen dar:

- **Nr. 16:** Bei diesem Fall handelt es sich um eine zum Operationszeitpunkt 41-jährige Patientin mit bilateralen serösen Borderline-Tumoren des Ovars und 5 Implants im Omentum majus. Von diesen standen 3 Resektionsblöcke zur Verfügung. Die ovariellen Tumoren waren in der Mikrosatellitenanalyse unauffällig. Demgegenüber zeigten alle 3 Implant-Proben im Marker D18 untereinander identische allelische Imbalancen. Dazu kam eine isolierte allelische Imbalance im IMP 35 (D6).
- **Nr. 21:** Diese 35-jährige Patientin hatte einen ausschließlich linksseitigen S-BOT und 4 im Omentum majus lokalisierte Läsionen. Die Proben unterschieden sich durch eine MSI (D14) und AI (MYC-L1) im IMP 1 sowie eine untereinander gleichartige AI in den Implants 3 und 4 (D22).

- **Nr. 26:** Der Fall Nr. 26 betrifft eine 60-jährige Frau mit bilateralen S-BOTs und insgesamt 7 extraovariellen Herden in Omentum majus, Peritoneum und regionalen Lymphknoten. Die 4 zur Verfügung stehenden Implantproben zeigten keinerlei Auffälligkeiten. Allein der rechte BOT wies eine MSI im Marker D22 auf.
  - **Nr. 29:** Die insgesamt 10 Proben (2 ovarielle, 8 peritoneale) des Falles Nr. 29 stammen von einer knapp 39-jährigen Patientin. Die Mikrosatellitenanalyse ergab zwei untereinander verschiedene AIs der Implants 15 und 16 im Marker D16 sowie eine zusätzliche AI im IMP 16 (D18).
  - **Nr. 32:** Diese 32-jährige Patientin hatte beidseitig seröse Borderline-Tumoren sowie 5 peritoneale Implants. Der rechte BOT unterschied sich in gleich 3 Markern von den restlichen Proben, darunter eine MSI (D3) und 2 AIs (D6). Der linke BOT wies in D18 dieselbe MSI auf wie ein Teil der Implants (19, 20, 21; siehe Abb. 5 c). Implant 21 zeigte darüber hinaus eine MSI in D3 (nicht identisch mit der aus dem rechten BOT) und eine AI in MYC-L1.
  - **Nr. 50:** Beim Fall Nr. 50 handelt es sich um den unilateralen S-BOT sowie 3 Implants einer 62-jährigen Patientin. Die Mikrosatellitenanalyse ergab zwei unterschiedliche MSIs in den Implants 24 und 25 (MYC-L1).
  - **Nr. 52:** Dem einseitig lokalisierten S-BOT einer 51-jährigen Patientin standen 2 extraovarielle Herde gegenüber. IMP 26 wies MSIs in 2 verschiedenen Markern (D6 und D14) auf, IMP 27 sogar in 6 Markern (D3, D6, D7, D14, D16, MYC-L1). (Siehe auch Abb. 5 a) Die MSIs in D6 und D14 waren nicht identisch.
  - **Nr. 57:** Aus den Operationsschnitten dieser 41-jährigen Frau lagen eine ovarielle und 2 extraovarielle Proben vor. Die ausschließlich in den Implants gefundenen MSIs hatten im Marker D6 ein gleichartiges Muster; im Marker D14 unterschieden sie sich.
  - **Nr. 75:** Die 4 untersuchten Proben einer 39-jährigen Patientin mit bilateralen S-BOTs und insgesamt 6 Implants in Omentum majus und pelvinen Lymphknoten zeigten in keinem der 10 Marker einen Unterschied.
  - **Nr. 78:** Hier handelt es sich um eine 48-jährige Patientin mit bilateralen S-BOTs und 5 omentalen Implants (davon 4 Proben). Die Proben zeigten im Mikrosatellitengel z.T. sehr heterogene Muster: Im Marker D3 wiesen die IMPs 40, 41 und 43 unterschiedliche AIs auf. In D6 waren im rechten BOT und im IMP 40 voneinander verschiedene MSIs nachweisbar. In D7 fand sich eine AI im IMP 41 (siehe Abb. 5 b). Und in D18 zeigten sich ebenfalls heterogene AIs im linken BOT und in den IMPs 40, 41 und 42 (siehe Abb. 5 d).
-

- **Nr. 108:** Diese knapp 20-jährige Frau wurde an einem unilateral lokalisierten S-BOT mit singulärer peritonealer Implantation operiert. Die beiden untersuchten Proben (BOT + 1 Implant) zeigten lediglich eine MSI in MYC-L1.
- **Nr. 109:** Die 7 Proben (BOT rechts, BOT links + 5 IMPs) der Nummer 109 stammen von einer 40-jährigen Patientin mit bilateralen S-BOTs und multiplen peritonealen Herden. Der Marker MYC-L1 detektierte voneinander verschiedene AIs in den IMPs 88, 90, 91 und 93. Die beiden BOT-Proben und das IMP 92 hatten das gleiche Muster. (IMP 89 existiert nicht als Probe.)

Mit Ausnahme von Nr. 75 hob sich in allen Fällen (d.h. 11 von 12  $\triangleq$  91,6%) mindestens ein Implant vom ovariellen Tumor ab. Davon zeigten 4 Fälle bei einem Marker, 3 bei zwei Markern und je 1 Fall bei drei, vier, fünf und sechs Markern molekulargenetische Unterschiede zwischen den einzelnen Proben. Definiert man die Diskordanz ( $\triangleq$  molekulare Heterogenität) als Auftreten molekulargenetischer Unterschiede bei mindestens 2 Markern, so waren in dieser Untersuchung 58,3% der Tumorfälle diskordant. Die übrigen 41,7% wären entsprechend als konkordant zu bezeichnen.

Direkt aus den S-BOTs wurden 19 Proben untersucht. Davon zeigten 3 Mikrosatelliteninstabilitäten (15,8%) und 2 allelische Imbalancen (10,5%). Zusammen genommen waren 5 BOT-Proben ( $\triangleq$  26,3%) bei 3 der 12 Patientinnen (25%) auffällig. Unter den 43 aus den Implants gewonnen Proben waren 26 (60,5%) auffällig, 10 der 12 Patientinnen (83,3%) betreffend. Darunter waren 13 Proben mit MSIs (30,2%) und 17 mit AIs (39,5%).

Insgesamt waren im Bereich der untersuchten Genorte 27 der 62 Proben (43,5%) auffällig. 30,6% zeigten allelische Imbalancen und 25,8% Mikrosatelliteninstabilitäten (mit Überschneidungen) in einem oder mehreren Markern. Wie erwähnt, ist dabei zu berücksichtigen, dass beispielsweise ein Unterschied zwischen BOT X auf der einen Seite und IMP Y und Z auf der anderen Seite zum einen als AI (im Sinne von Zugewinn) für BOT X, zum anderen aber auch als AI (im Sinne von Verlust) für IMP Y und Z gewertet werden kann, was natürlich Einfluss auf die Statistik hat.

Unabhängig davon kann man festhalten, dass bei einem beträchtlichen Anteil des Untersuchungsmaterials molekulargenetische Unterschiede zwischen multifokalen Tumorfoci innerhalb einer Patientin zu finden waren. Dies wäre ein Hinweis auf einen polyklonalen Ursprung. Nur ein Fall (Nr. 75) hatte in allen Markern ein identisches Bandenmuster.

In allen anderen Fällen sind zwar an mehr oder weniger Stellen Unterschiede feststellbar, teilweise lassen sich jedoch Serien von gleichartigen Mustern innerhalb eines Indi-

viduums erkennen. (Diese sind in Tab. 10 grün markiert.) So könnte jeweils ein Teil der Tumorherde aus einem Klon, ein anderer Teil aus einem zweiten Klon usw. entstanden sein. Nur in einem der 4 entsprechenden Fälle (Nr. 32) betreffen die für alle Marker geltenden Gemeinsamkeiten sowohl einen ovariellen Herd (BOT 32 links) als auch einen Teil der extraovariellen (IMP 19 bis 21). Hier wäre auf Grundlage der Mikrosatellitenanalyse ein gemeinsamer Ursprung denkbar. Die restlichen 3 Serien (Nr. 16, 21, 57) mit einheitlichem MSI-/AI-Profil beziehen ausschließlich Implants ein. Beispielsweise könnten im Fall Nr. 57 die beiden Implants (IMP 30 und 31) untereinander monoklonal sein, in Bezug auf den Borderline-Tumor jedoch polyklonal.

Unter Berücksichtigung histologischer Merkmale fällt auf, dass die epithelialen Implants etwas häufiger von Veränderungen im Bandenmuster betroffen waren als die desmoplastischen (65% vs. 58,3%). Der relative Anteil von Mikrosatelliteninstabilitäten war dagegen bei letzteren höher (71,4% vs. 38,5% der auffälligen Proben). Möglicherweise stehen hier unterschiedliche pathogenetische Mechanismen im Vordergrund. Dies könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Insbesondere in Bezug auf die Lymphknoten- und Endosalpingiose-assoziierten Implants sind die Probenzahlen für verlässliche Aussagen zu gering.

Ca. 58% der untersuchten Fälle wiesen einen bilateralen Tumorbefall auf. Bei 3 dieser 7 Fälle (42,9%) waren Unterschiede zwischen linkem und rechtem Tumor zu beobachten. Diese Differenzen betreffen bei einem BOT (Nr. 32) 4 Marker, bei einem weiteren (Nr. 78) 2 Marker und beim dritten (Nr. 26) nur einen Marker. Nach oben genannter Definition wären demzufolge 2 der 7 bilateralen Tumoren (28,6%) diskordant, die übrigen (71,4%) dagegen konkordant.

Als weitergehende Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe Molekularpathologie des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Mutationsanalysen im K-RAS- und B-RAF-Gen durchgeführt: Alle S-BOTs und Implants wurden hinsichtlich Mutationen im Exon 1 des K-RAS-Gens und Exon 15 des B-RAF-Gens gescreent.

Die Codons 12 und 13 des K-RAS-Gens und die Codons 594 - 599 des B-RAF-Gens wurden nach PCR-Amplifikation entsprechend eines Protokolls von Sieben et al.<sup>5</sup> und nach Aufreinigung mit Hilfe des QIAquick Spin DNA Purification Kits (Qiagen, Hilden)

---

<sup>5</sup> - 15 min Pre-Denaturierung bei 95 °C  
- 35 Zyklen à 30 s Denaturierung bei 95 °C + 30 s Annealing bei 56 °C + 30 s DNA-Synthese bei 72 °C  
- 10 min finale Elongation bei 72 °C

---

sequenziert (Sieben NLG et al., 2004)<sup>6</sup>. Dafür wurden dieselben PCR-Primer und das Big Dye Terminator v 1.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Während im Codon 13 des K-RAS-Gens und in den Codons 594 - 599 des B-RAF-Gens keinerlei Mutationen nachweisbar waren, wurden im Codon 12 des K-RAS-Gens in 6 Proben (9,7%) bei 4 Patientinnen (33,3%) Veränderungen gefunden (siehe auch Tab. 10):

- **Nr. 29:** heterozygoter G35T-Austausch im rechten und linken BOT sowie im IMP 9, jedoch nicht in den übrigen Implants (IMP 10-16)
- **Nr. 32:** heterozygoter G35A-Austausch im linken BOT, jedoch nicht im rechten und in keinem der zugehörigen Implants (IMP 17-21)
- **Nr. 52:** heterozygoter G35A-Austausch in einem der beiden Implants (IMP 27, jedoch nicht im anderen (IMP 26) und nicht im BOT
- **Nr. 108:** heterozygoter G35T-Austausch im ovariellen Tumor, jedoch nicht im Implant (IMP 87).

Bei den übrigen Patientinnen lag ausschließlich der Wildtyp vor.

Insgesamt waren im untersuchten Bereich mehr S-BOTs (4 von 19 Proben  $\triangleq$  21%) mutiert als Implants (2 von 43 Proben  $\triangleq$  5%).

Auch wenn der Umfang dieser Ergebnisse eine statistische Auswertung nicht rechtfertigt, werden bei den mutierten Proben Unterschiede zwischen den ovariellen und den meisten extraovariellen Herden deutlich, im Fall Nr. 32 – passend zum Auftreten unterschiedlicher Mikrosatelliteninstabilitäten - sogar zwischen bilateralen S-BOTs. Demgegenüber zeigte nur ein Implant (IMP 9) dieselbe Mutation wie der mutmaßliche Primärtumor.

---

<sup>6</sup> - 1 min bei 96°C  
- 35 Zyklen à 10 s bei 9°C + 5 s bei 50°C + 4 min bei 60°C  
- 4 min bei 72°C

---

## 6 Diskussion

Bei den invasiven Ovarialkarzinomen lässt sich das Auftreten multipler Tumorherde im Bauchraum als metastatischer Prozess erklären: Entweder die Tumorzellen erreichen durch Angioinvasion das Peritoneum auf dem Zirkulationswege oder der Durchbruch der Organkapsel führt direkt zur Dissemination in der Bauchhöhle. Deswegen ist beim intraabdominell ausgebreiteten Ovarialkarzinom mit großer Wahrscheinlichkeit von einem klonalen Prozess auszugehen. Dies belegen zahlreiche Studien, u.a. auf Grundlage von p53-Sequenzierungen, LOH-Analysen, Karyotypvergleichen und Analysen der X-Chromosominaktivierung (Abeln EC et al., 1995; Jacobs IJ et al., 1992; Kupryjanczyk J et al., 1996; Mok C-H et al., 1992; Pejovic T et al., 1991).

Die Herkunft der extraovariellen Herde bei den Borderline-Tumoren ist jedoch noch ungeklärt. Die Studien, die sich bisher mit der Fragestellung beschäftigten, kamen zu sehr kontroversen Ergebnissen. Es kristallisierten sich zwei Modelle heraus, die nachfolgend beschrieben werden sollen. Unter Berücksichtigung dieser Voruntersuchungen sollen die eigenen Daten interpretiert werden, um Rückschlüsse auf die komplexen Mechanismen der Entstehung von S-BOTs und Implants ziehen zu können.

### 6.1 Monoklonalitätstheorie

Die Theorie des monoklonalen Ursprungs (auch Implantationstheorie) geht davon aus, dass extraovarielle Läsionen, so genannte Implants, die bei einem Teil der Fälle parallel zu S-BOTs auftreten, aus neoplastischen Zellen hervorgehen, die vom ovariellen Primärtumor aus in den Bauchraum gestreut wurden. Analog wird dies bei der Endometriose beschrieben: Hier nimmt man eine nicht-metastatische Verbreitung von uterinen Zellen im Körper an, die nach der Implantation zur Entartung befähigt sind.

Einen Hinweis auf die mutmaßliche gemeinsame Herkunft von S-BOTs und Implants gibt u.a. die Korrelation zwischen dem exophytischen Wachstum ovarieller Tumoren und der synchronen Entstehung peritonealer Herde: Fast 2/3 der Patientinnen mit einer exophytischen Komponente im ovariellen Tumor haben gleichzeitig Implants. Andersherum betrachtet, zeigen ca. 94 % der S-BOTs mit assoziierten Implants ein exophytisches Wachstum. Damit im Einklang ist außerdem die tendenzielle Häufung der Implants in der Nähe des mutmaßlichen Primärtumors (Segal GH, Hart WR, 1992). Diese Beobachtungen lassen eine direkte Exfoliation der transformierten Zellen auf das Peritoneum vermuten, wo sie aufgrund des embryologisch gemeinsamen Hintergrundes auf ein ähnliches Milieu treffen (Sieben NL et al., 2006). Denkbar wäre auch, dass

---

zumindest ein Teil der Implants auf dem Boden einer peritonealen Endosalpingiose in situ entsteht (Hart WR, 2005).

Darüber hinaus konnten mehrere Studien eine hohe Konkordanz der genetischen Veränderungen nachweisen: So ergab der Vergleich des LOH- bzw. AI-Profiles \*auf drei Genloci des Chromosoms 17p, welche u.a. das p53-Gen beinhalten, in allen untersuchten Fällen das gleiche Muster bei S-BOTs und Implants (Zanotti KM et al., 1999). Eine andere Studie bezog in die durchgeführte Allelotypisierung Mikrosatellitenmarker aller Chromosomen ein und konnte bei 7 von 9 relevanten Fällen konkordante LOHs in mehreren Tumorfoci bei mindestens einem Marker nachweisen (Sieben NLG et al., 2003). LOH-Analysen allein haben jedoch den Nachteil, dass die Häufigkeit der Klonalität womöglich unterschätzt wird, wenn die Marker nicht informativ sind oder wenn keine LOHs gefunden werden (Sieben NL et al., 2006). Als zusätzlicher Beweis für einen klonalen Ursprung wurde daher ein Fall angeführt, in dem alle 3 unterschiedlich lokalisierten Tumoren innerhalb einer Patientin eine identische Mikrosatellitenveränderung (Repeatexpansion) aufwiesen, welche als starker Marker für das Vorliegen einer Monoklonalität gilt (Mao L et al., 1994). Zwei weitere Fälle zeigten überdies im histologischen Befund auffallend ähnliche Atypien in allen Foci (Sieben NLG et al., 2003). Eine Folgestudie derselben Arbeitsgruppe kombinierte die LOH-Analyse mit der Untersuchung der K-RAS- und B-RAF-Mutationen. Bei den 8 informativen Fällen zeigten 21 von 25 meta- oder synchron entstandenen Tumoren gleiche genetische Veränderungen, und zwar sowohl bei invasiven als auch bei nicht-invasiven Implants (Sieben NLG et al., 2004).

Auch Krishnamurti et al. fanden in den typisierten Mikrosatellitenregionen, insbesondere auf den Chromosomen 1p (inklusive MYC-L1), 9q und 17p, bei 5 der 6 multifokalen S-BOT-Fälle zu 88% konkordante Allelverluste. Da ein Fall jedoch ein diskordantes Muster aufwies, resümierten die Autoren, dass die Mehrheit der S-BOT-assoziierten Implants wahrscheinlich monoklonal entstehe, eine Minderheit jedoch auch polyklonal (Krishnamurti U et al., 2005).

## 6.2 Polyklonalitätstheorie

Der Theorie des polyklonalen Ursprungs zufolge beruht die syn- oder metachrone Entstehung multifokaler Tumoren auf einer voneinander unabhängigen Transformation ovarieller und peritonealer Progenitorzellen. Das häufig beobachtete gemeinsame Auftreten dieser verschiedenen Entitäten resultiere aus einem Felddefekt und damit einer allgemeinen genetischen Instabilität des gesamten Zölon- bzw. Müller-Epithels. Für

---

diese Annahme spricht die Tatsache, dass subperitoneale Endosalpingiosen bei Patientinnen mit S-BOT wesentlich häufiger sind als bei Gesunden. Dabei könnten eine familiäre Prädisposition, aber auch hormonelle oder Umwelteinflüsse eine Rolle spielen (Lu KH et al., 1998).

Die Argumente der Verfechter dieser Theorie stützen sich im Wesentlichen auf das zelluläre Muster der X-Chromosom-Inaktivierung: Während der frühen Embryonalentwicklung wird in jeder somatischen Zelle einer Frau zufällig entweder das paternale oder das maternale X-Chromosom inaktiviert, woraus insgesamt ein Mosaik entsteht. Die spezifische Situation in einer Zelle bleibt ein Leben lang erhalten und wird durch klonale Expansion an alle Tochterzellen weitergereicht. So ließe sich in diesem Fall ein identisches Muster der X-chromosomalen Inaktivierung nachweisen, während bei Polyklonalität die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des gleichen Musters 50% betrüge. Der Nachweis kann u.a. durch die Analyse des Methylierungsstatus bestimmter Endonukleasen im AR-Gen auf dem langen Arm des X-Chromosoms erfolgen (Gu J et al., 2001; Lu KH et al., 1998). Gu et al. fanden bei der Untersuchung von 18 Patientinnen mit S-BOTs und extraovariellen Herden bei 7 der 13 informativen Fälle ein nicht-zufälliges Muster der X-Chromosom-Inaktivierung. Bei 6 dieser 7 Fälle unterschied sich das Muster zwischen ovariellen und peritonealen Tumoren; nur bei einem war es identisch (Gu J et al., 2001). Eine andere Studie, die sich im Wesentlichen (7 von 8 Patientinnen) auf bilaterale S-BOTs konzentrierte und nur 2 Fälle mit Implants einbezog, erweiterte die Auswertung der X-Chromosom-Inaktivierung um die LOH-Analyse des Androgenrezeptors (Lu KH et al., 1998). 5 der 8 Fälle zeigten in beiden Methoden das gleiche Muster für alle untersuchten Proben. Bei zwei Fällen unterschied sich der Genlocus zwischen linkem und rechtem ovariellen Herd; ein dritter wies in zwei Implants ein anderes X-Chromosom-Inaktivierungsmuster auf als im linken BOT.

Einen weiteren Hinweis auf einen unabhängigen Entstehungsmechanismus der diskutierten Tumorentitäten gibt das Auftreten primär peritonealer „S-BOTs“ in Abwesenheit eines ovariellen Tumors. Diese Herde sind histologisch nicht von nicht-invasiven Implants bei S-BOTs zu unterscheiden (Bell DA, Scully RE, 1990; Biscotti CV, Hart WR, 1992).

Diese Ergebnisse sprechen für einen polyklonalen Ursprung multifokaler Tumoren bei den S-BOT-Patientinnen. Ihre Aussagekraft wird jedoch von Kritikern dieser Theorie angezweifelt. So können tumorbedingte Veränderungen, wie Aneuploidie oder Abnormalitäten im Methylierungsmuster, mit der X-chromosomalen Inaktivierung interferieren (Sieben NLG et al., 2003). Sieben et al. vermuten in oben genannten Studien darüber hinaus technische Mängel und Artefakte durch zu geringe DNA-Mengen, einen in-

---

kompletten Verdau des paraffinierten Materials und die Kontamination des Normalgewebes.

### 6.3 Beurteilung der eigenen Ergebnisse

In Anknüpfung an die oben beschriebenen Studien verfolgt die vorliegende Arbeit das Ziel, die Pathogenese der extravariellen Implants aufzuklären. Es wurde ein molekulargenetischer Ansatz gewählt, basierend auf dem Vergleich von Borderline-Tumor- und assoziierten Implantatproben hinsichtlich allelischer Imbalancen und Mikrosatelliteninstabilitäten im Polyacrylamidgel.

Eine Konkordanz der genetischen Veränderungen (AI/MSI) spräche am ehesten für eine Metastasierung oder Implantation aus einem Primärherd. Hierbei ist jedoch auch die Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu berücksichtigen: Da der Genotyp den Phänotyp definiert, können morphologisch gleichartige Tumoren unter Umständen selbst dann einen vergleichbaren Genotyp haben, wenn ihnen unabhängige Pathomechanismen zugrunde liegen. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich nur in einem Fall (BOT 75) ein über alle Marker hinweg identisches Bandenmuster. Da der Vergleich zum nicht entarteten Gewebe fehlt, sind hier zwei Möglichkeiten denkbar: Entweder es gab in keinem der ausgewählten Genloci eine Mutation, so dass der Fall als nicht informativ eingestuft werden müsste. Oder sämtliche Tumorherde der Patientin haben ein identisches Mutationsprofil und wären damit am ehesten monoklonal. Bei 4 weiteren Fällen war nur bei einem der 10 verwendeten Marker ein Unterschied zu verzeichnen. Insgesamt beträgt die Konkordanzfrequenz nach oben genannter Definition 41,7% der Fälle.

Demgegenüber wurde bei 58,3% der Fälle Diskordanz bei mindestens 2 Markern (2-6 von 10) festgestellt. Diese Beobachtung wäre durch zwei Mechanismen erklärbar: Zum einen könnten die unterschiedlich lokalisierten Tumoren innerhalb eines Individuums aus voneinander unabhängigen Klonen entstanden sein. Zum anderen kann unter Umständen aber auch eine monoklonale Population neoplastischer Zellen durch nachträgliche Mutation divergente Zellsubgruppen hervorbringen (Krishnamurti U et al., 2005).

Eine Aussage zur Herkunft multifokaler Tumoren ist mit dieser Methode daher nur eingeschränkt möglich. In Zusammenschau der Ergebnisse ist jedoch am ehesten davon auszugehen, dass bei der Mehrheit der Patientinnen den verschiedenen Läsionen jeweils mehrere Zelllinien zugrunde liegen, welche, zufällig oder durch gemeinsame Risikofaktoren begünstigt (z.B. eine hypothetische, bereits in der Keimbahn fixierte genetische Instabilität mesothelialer Gewebe), an verschiedenen Stellen des Körpers entartet sind. Es ist jedoch grundsätzlich denkbar, dass sich einige dieser primär polyklona-

---

len Herde klonal weitervermehren und genetisch identische Tochtergeschwülste ausbilden. Einen Hinweis darauf geben 4 der untersuchten Fälle, bei denen Serien gleichartiger MSIs bzw. Als beobachtet wurden. 3 davon betrafen ausschließlich Implants, so dass von einer direkten Streuung innerhalb des Peritonealgewebes ausgegangen werden kann. Nur in einem einzigen Fall (Nr. 32) betrafen die Gemeinsamkeiten sowohl einen Borderline-Tumor als auch 2 der 5 Implants (nicht jedoch den kontralateralen BOT und die übrigen Implants). Hier jedoch zeigte die K-RAS-Analyse genotypische Unterschiede auf, welche die monoklonale These in Zweifel ziehen. So sind auch in diesem Fall die ovariellen und peritonealen Tumorproben insgesamt als polyklonal einzuschätzen.

Das K-RAS-Profil könnte im Fall Nr. 29 einen Hinweis auf Monoklonalität der bilateralen S-BOTs und des Implants 9 geben (nicht aber der übrigen Implants). In allen drei Proben war ein heterozygoter G35T-Austausch im selben Codon nachweisbar. Die Ergebnisse der Polyacrylamidgel-Elektrophorese waren ebenfalls homogen. Da jedoch auch die Implants 10-14, alle Träger des Wildtyps im Codon 12, dasselbe Bandenmuster auswiesen, ist die Informativität der 10 Marker hierbei in Zweifel zu ziehen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus beiden Untersuchungsmethoden gibt dieser Fall jedoch die deutlichsten Hinweise auf die klonale Entstehung eines Implants (IMP9) aus dem (in diesem Fall bilateralen) Borderline-Tumor.

Obwohl vorangegangene Studien eine Korrelation zwischen ovarieller Oberflächenbeteiligung von Borderline-Tumoren und der Implantation unterstrichen haben (Segal GH, Hart WR, 1992), lässt sich anhand der untersuchten Fälle keinerlei Zusammenhang ableiten. So zeigte der als teilweise monoklonal eingestufte BOT 29 kein oberflächliches Wachstum; BOT 32 dagegen schon. Ebenso eine Reihe von Tumoren, bei denen die genotypischen Analysen auf eine polyklonale Genese schließen lassen.

Die Häufigkeit eines bilateralen Auftretens seröser Borderline-Tumoren des Ovars ist in der Literatur mit 28-66% angegeben (Sehouli J et al., 2002). In dieser Untersuchung lag sie bei 58,3%. 28,6% der betreffenden Fälle wiesen in der Mikrosatellitenanalyse ein diskordantes Muster auf. Besonders erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang der Fall Nr. 32, bei dem die K-RAS-Analyse zusätzliche genotypische Unterschiede aufdeckte. Hier ist am ehesten von einer polyklonalen Entstehung unabhängiger Borderline-Tumoren in beiden Ovarien auszugehen. Die 5 ( $\triangleq$  71,4%) in beiden Untersuchungen übereinstimmend als konkordant beschriebenen Fälle wären dagegen mit einer monoklonalen Genese vereinbar.

---

Diese Ergebnisse decken sich mit denen älterer Untersuchungen. So unterschieden sich 28,6% (2 von 7) der von Lu et al. untersuchten bilateralen S-BOTs in Bezug auf die Inaktivierung der X-chromosomalen Androgenrezeptor-Allele, während die übrigen 71,4% beidseits identisch waren (Lu KH et al., 1998).

Bezüglich der LOH- bzw. AI-Frequenzen bestätigten sich die Angaben früherer Studien im Wesentlichen. Demnach seien diese Ereignisse bei serösen Borderline-Tumoren insgesamt relativ selten (Krishnamurti U et al., 2005; Saretzki G et al., 1997). Die Angaben von 0-41% decken sich mit der von uns ermittelten Häufigkeit von 30,6% (BOT-Proben: 10,5%, IMP-Proben: 39,5%). Die MSI-Quote lag in dieser Untersuchung mit 25,8% (BOT-Proben: 15,8%, IMP-Proben: 30,2%) zwischen den von Yoon et al. (12%) und Haas et al. (30%) angegebenen Werten (Haas C et al., 1999; Yoon BS et al., 2008).

Besonders MYC-L1 auf Chromosom 1p zeigte in 50% der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Fälle Veränderungen auf. Er wurde bereits von früheren Arbeitsgruppen als hoch effektiver Marker beschrieben (Shih I-M, Kurman RJ, 2005). Die in diesem Genabschnitt enthaltenen Tumorsuppressorgene werden vermutlich bereits in der Frühphase der Tumorentstehung inaktiviert (Krishnamurti U et al., 2005). Eine weitere Rolle könnten Gene auf den Chromosomen 3p, 5q, 6p+q, 7p+q, 9p+q, 11q, 17p+q, 22q und Xq spielen (Dodson MK et al., 1993; Krishnamurti U et al., 2005; Tibiletti MG et al., 2001; Watson RH et al., 1998; Zheng J et al., 1991). Auch in dieser Untersuchung waren auf den Chromosomen 6 (Mikrosatellitenmarker D6; 41,7% der Fälle), 3 (D3; 25%), 7 (D7; 16,7%) und 22 (D22; 16,7%) Mutationen nachweisbar, außerdem auf den Chromosomen 14 (D14; 33,3%), 18 (D18; 33,3%) und 16 (D16; 16,7%). Die Marker BAT25 und BAT26 auf Chromosom 4 bzw. 2 waren nicht informativ.

Die zusätzlich durchgeführten Sequenzierungen umfassten bekannte Mutationsorte von K-RAS und B-RAF, welche als Protoonkogene durch Aktivierung des RAS-RAF-MAP-MEK-ERK-Kinase-Pathways eine gesteigerte Zellproliferation bewirken (Mayr D et al., 2006). Tatsächlich ermittelten wir in 33,3% der Fälle eine Mutation im Codon 12 (Exon 1) des K-RAS-Gens. Dieses Ergebnis harmoniert mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die im selben Codon bei 22,2-36% der S-BOTs Veränderungen fanden (Mayr D et al., 2006; Mok SC-H et al., 1993; Sieben NLG et al., 2004). Im Codon 13 des K-RAS-Gens und in den Codons 594 bis 599 des B-RAF-Gens lag in allen von uns untersuchten Proben der Wildtyp vor. In der Literatur sind die Mutationsfrequenzen im Codon 13/K-RAS mit 0–2,3% (Mayr D et al., 2006; Mok SC-H et al., 1993)

---

und im B-RAF-Gen (nur Codon 599) mit 28–36% (Sieben NLG et al., 2004; Singer G et al., 2003) angegeben.

Der Aussage von Mayr et al., dass sich die beiden Gene gegenseitig ausschließen, kann unter Berücksichtigung der von uns ermittelten Ergebnisse weder widersprochen werden noch lassen sich weitere Beweise dafür finden. Eine größere Fallzahl würde in Zukunft vielleicht zusätzliche Informationen liefern.

Insgesamt muss kritisch angemerkt werden, dass der Einbezug einer Negativkontrolle aus nicht entartetem Gewebe der Patientinnen die Aussagekraft der Ergebnisse deutlich erhöht hätte. Es hätte jedoch nicht ausgereicht, scheinbar gesunde Areale vom Rand der Resektionsblöcke zu entnehmen, da auch diese unter Umständen schon vor Ausprägung mikro- oder makroskopischer Unregelmäßigkeiten molekulargenetisch verändert sein könnten. Geeignet wären eher Lymphozyten oder andere Zellen, bei denen nicht von entsprechenden Mutationen ausgegangen werden muss. Diese standen im Rahmen dieser Untersuchung leider nicht zur Verfügung, da es sich um Archivmaterial handelte.

Im Fall Nr. 75, in dem kein Unterschied zwischen den Proben nachgewiesen wurde, bleibt daher ungeklärt, ob das genetische Profil den Wildtyp oder eine in allen Proben homogene Mutation darstellt. Da gerade solche Fälle Musterbeispiele für Monoklonalität sein können, besteht die Gefahr, diese insgesamt zu unterschätzen (Sieben NL et al., 2006).

Bei weiterführenden Untersuchungen wäre es zugunsten einer differenzierteren Aussage empfehlenswert, die Zahl der Fälle und Mikrosatellitenmarker weiter zu erhöhen und zusätzliche Methoden, wie die K-RAS- bzw. B-RAF-Mutationsanalyse, in größerem Umfang einzubeziehen. Außerdem wäre die Verwendung frischen oder gefrorenen Materials günstiger, da die Paraffineinbettung, insbesondere in Kombination mit geringen DNA-Mengen, die Artefaktentstehung begünstigt (Sieben NLG et al., 2000).

Bezüglich der Methode muss kritisch angemerkt werden, dass die quantitative Analysierbarkeit des Silbergels in Frage gestellt wird (Koreth J et al., 1996). Allgemein besitzt die Mikrosatellitenanalyse den Nachteil, dass sie nicht in der Lage ist, einen Gewinn von genetischem Material in einer Probe von einem Verlust in einer anderen Probe desselben Individuums zu unterscheiden. Hier ist der Begriff der „allelischen Imbalancen“ treffender. Außerdem kann durch die MSA nicht die exakte biochronologische Reihenfolge von Tumoren und Rezidiven nachvollzogen werden.

Immerhin stellen die dargestellten Veränderungen, wie z.B. LOHs, im Gegensatz zu Methylierungsmustern, wie bei der X-Chromosom-Inaktivierung, keine epigenetischen Phänomene, sondern irreversible Ereignisse während der Tumorgenese dar (Sieben

NLG et al., 2003). Mikrosatelliten-Mutationen reflektieren das Vorhandensein eines bestimmten Typs genetischer Instabilität. Diese ist ein wichtiger, früher Schritt in der Tumorgenese, da sie einen Anstieg in der Mutationsrate bedingt. Die Verwendung der Mikrosatelliten als hoch polymorphe Marker hat sich in Zusammenhang mit Klonalitätsfragen bewährt. Trotz der genannten Einschränkungen lassen sich mit der Methode viele grundsätzliche Fragen klären.

#### 6.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Tumorentstehung ist ein komplexer und heterogener Vorgang, dessen Entschlüsselung viele Probleme aufwirft. Grundsätzlich gilt zu berücksichtigen, dass einerseits unterschiedliche Entwicklungswege zu morphologisch gleichen Tumoren führen können (Polygenie) und andererseits Mutationen in denselben Genloci morphologisch verschiedene Neoplasien hervorbringen können (Pleiotropie). Verschieden lokalisierte Tumoren mit ähnlichem molekularem Profil können entweder Ausdruck der Tumorprogression und –streuung oder in anderen Fällen das Ergebnis multifokaler Tumorentstehung sein. Welcher dieser Mechanismen das syn- oder metachrone Auftreten von serösen Borderline-Tumoren und extraovariellen Implants bedingt, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht endgültig aufgeklärt. Die kontroversen Ergebnisse der bislang vorliegenden Studien lassen jedoch vermuten, dass mehrere pathogenetische Wege nebeneinander bestehen. So vermuten Diebold et al. auf Grundlage einer K-RAS-Mutationsanalyse bei S-BOTs, kontralateralen Tumoren und extraovariellen Implants die Koexistenz von multifokaler Tumorgenese auf der einen Seite und Streuung primär ovarieller Tumorzellen auf der anderen Seite (Diebold J et al., 2003). Letztere ist wahrscheinlich besonders im Falle exophytisch wachsender Tumoren bedeutsam, wie die starke Korrelation dieses Typs mit dem Auftreten peritonealer Implants belegt (Segal GH, Hart WR, 1992).

Im Falle der invasiven Implants, die die semimaligne Definition der Borderline-Tumoren besonders herausfordern, beschreiben Sherman et al. folgende drei Möglichkeiten:

1. die maligne Transformation im Ovar mit anschließender metastatischer Streuung
2. den passiven Transport benigner Tumorzellen durch mechanischen Abrieb oder über Lymphwege mit nachfolgender maligner Transformation oder
3. die syn- oder metachrone Tumorentstehung an unterschiedlichen Stellen (durch einen Felddefekt) mit maligner Transformation des Implants (Sherman ME et al., 2004).

Mikrosatellitenanalysen können dabei einen Hinweis auf klonale Beziehungen verschiedener Tumorfoci geben. Konkordante allelische Imbalancen oder Mikrosatelliteninstabilitäten würden diesbezüglich für die Herkunft aus einem Klon sprechen, wobei natürlich auch mehr oder weniger zufällig bei mehreren unabhängigen Zelllinien dieselben Veränderungen aufgetreten sein können. Eine Diskordanz der allelischen Veränderungen bei multifokalen Tumoren wird als Hinweis für einen polyklonalen Entstehungsmechanismus gedeutet. Aber auch dies allein ist kein Beweis, da unter Umständen auch aus einer monoklonalen Primärpopulation divergente Tochterzellen entstehen können (Krishnamurti U et al., 2005). Die Verwendung möglichst zahlreicher informativer Marker kann diese Schwächen jedoch minimieren. Aus diesem Grund sind im Rahmen dieser Untersuchung 10 etablierte Mikrosatelliten einbezogen worden.

Die erhobenen Daten lassen, wie oben beschrieben, grundsätzlich eher auf polyklonale Entstehungsmechanismen der untersuchten Tumorproben schließen. Teilweise lassen sich aber in den einzelnen Individuen jeweils mehrere klonale Subgruppen mit gleichem genetischem Profil erahnen. Diese Möglichkeit betrifft im Wesentlichen die von Implants ausgehende klonale Aussaat. Lediglich in einem Fall (Nr. 29) ist eine klonale Beziehung zwischen dem BOT und zumindest einem der Implants (IMP 9) anzunehmen. Demnach ist auch die Monoklonalitätstheorie nicht grundsätzlich auszuschließen.

Zur endgültigen Klärung der Fragestellung sind noch weitere Studien nötig. Dabei könnten nicht nur molekulargenetische Ansätze weiterführen, sondern auch immunhistochemische, epidemiologische und klinische Studien.

Für den klinischen Alltag hat die Thematik eine große Relevanz: So ist die diagnostische Terminologie im Moment mangels pathogenetischen Hintergrundwissens noch sehr unpräzise und dadurch auch für die Patientinnen wenig informativ. Der Begriff der „Implants“ ist bewusst zurückhaltend formuliert. Bei Invasivität dieser Herde wäre zu diskutieren, sie je nach Entstehungsmechanismus beispielsweise als Metastasen oder primäre peritoneale Karzinome zu bezeichnen. Wäre ein polyklonaler Entstehungsmechanismus bewiesen, so wäre die Einteilung und Nomenklatur der ovariellen Neoplasien allgemein zu überdenken. Eine Studie zeigte, dass Bezeichnungen wie „seröser Borderline-Tumor“ oder „serous tumor of low malignant potential“ 82% der betroffenen Frauen suggerieren, sie hätten einen Krebs (Schildkraut JM, Thompson WD, 1988). Diese Reaktion ist angesichts der sonst so günstigen Prognose dieser Entität unverhältnismäßig und könnte mithilfe einer exakten Terminologie umgangen werden. Hierbei wäre auch die prognostische Bedeutung histologischer Subtypen, etwa der mikropapillären S-BOTs, zu klären.

---

Weitreichende Konsequenzen hätte die ätiologische Einordnung multifokaler Tumoren auch für das therapeutische Vorgehen: Eine monoklonale Entstehung müsste ein höheres Staging mit konsekutiver aggressiverer Therapie zur Folge haben (Gu J et al., 2001). Diese hätte die Eradikation des Tumorklons zum Ziel, beispielsweise mittels einer Immuntherapie. Im günstigsten Fall wäre es sogar möglich, die präoperative Diagnostik mittels geeigneter Serummarker zu erleichtern.

Auf ein polyklonales Geschehen könnte dagegen nur abwartend durch zeitgerechte spezifische und sensitive Diagnostik und stadiengerechte Therapie reagiert werden.

Das Ziel ist ein möglichst standardisiertes Vorgehen nach dem ALARA-Prinzip („As Low As Reasonably Achievable“). Insbesondere bei jungen Patientinnen heißt das, dass die Therapie möglichst fertilitätserhaltend und wenig invasiv erfolgen sollte, bei einer minimalen Quote an Residualtumoren und Rezidiven.

## 7 Zusammenfassung

Die Borderline-Tumoren des Ovars werden auf Grund ihrer histologischen Eigenschaften als eigene Entität von den ovariellen Adenomen und Karzinomen abgegrenzt. Im Vergleich zu letzteren haben sie eine deutlich günstigere Prognose. Diese wird im Wesentlichen durch das Auftreten weiterer, meist peritonealer Herde limitiert. Ein Teil dieser so genannten Implants (< 10%) ist im Gegensatz zu den ovariellen Tumoren zur Invasion in das umliegende Gewebe befähigt. Der ätiologische Zusammenhang zwischen Borderline-Tumoren und Implants konnte bislang nicht ausreichend geklärt werden. Zur Diskussion stehen zwei konkurrierende Modelle:

Die Monoklonalitäts- oder Implantationstheorie geht von der Streuung von Tumorzellen aus einem ovariellen Primärtumor in den Bauchraum aus. Demnach entstünden BOT und Implants aus einem gemeinsamen Zellklon. Für diese Theorie sprechen einerseits in diversen Studien nachgewiesene genotypische Parallelen, andererseits die Korrelation zwischen dem Auftreten von Oberflächenproliferaten ovarieller Tumoren und dem synchronen Auftreten peritonealer Herde, im Sinne einer direkten Exfoliation.

Die Polyklonalitätstheorie dagegen vermutet die voneinander unabhängige, syn- oder metachrone Entartung von Zellverbänden an unterschiedlichen Lokalisationen. Aufgrund des embryologisch gemeinsamen Ursprungs könnte ein genetischer Felddefekt des Müller- bzw. Zölomepithels sowohl eine Entartung ovarieller als auch peritonealer Zellen bewirken. Die Verfechter dieser Theorie berufen sich vor allem auf variable Muster der X-Chromosom-Inaktivierung.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit ein molekulargenetischer Ansatz gewählt, unter Verwendung so genannter Mikrosatellitenmarker. Mikrosatelliten sind relativ instabile genomische Sequenzen, welche sich u.a. durch ihren hohen Polymorphismus als molekulare Marker eignen.

Als Untersuchungsmaterial dienten archivierte Tumorproben von 12 Patientinnen mit serösen Borderline-Tumoren des Ovars und je 1-8 nicht-invasiven Implants. Die aus Paraffinblöcken isolierte DNA wurde mittels PCR an 10 ausgewählten Mikrosatellitenloci amplifiziert und nach entsprechender Vorbereitung in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses eignet sich aufgrund seiner im Vergleich zu anderen Gelarten höheren Trennschärfe besonders zur Auflösung von sehr kleinen Größenunterschieden der DNA-Fragmente. Zur Visualisierung der Bandenmuster erfolgte eine Silberfärbung. Die auf Filterpapier fixierten Gele wurden anschließend in Bezug auf allelische Imbalancen (Zugewinne und Verluste) sowie Mikrosatelliteninstabilitäten ausgewertet.

---

Als besonders informativ erwies sich der Marker MYC-L1, welcher in der Hälfte der Fälle Unterschiede zwischen den einzelnen Proben aufdeckte. In geringerem Maße gelang dies auch mit D6, D14, D18, D3, D7, D16 und D22, nicht jedoch mit BAT25 und BAT26. Insgesamt 11 der 12 Fälle (91,6%) und 27 der 62 Proben (43,5%) zeigten an mindestens einem Locus Unterschiede zwischen BOT und Implants. Definiert man die Diskordanz (molekulare Heterogenität) als Auftreten molekulargenetischer Unterschiede bei mindestens 2 Markern, so waren in dieser Untersuchung 58,3% der Tumorfälle diskordant. Die verbleibenden 41,7% mit weitgehend homogenem Bandenmuster innerhalb eines Falles wären entsprechend als konkordant zu bezeichnen. Von den 7 Fällen mit bilateralem Befallsmuster ( $\triangleq$  58%) waren 28,6% bezüglich der BOTs diskordant und 71,4% konkordant.

Die Konkordanz lässt eher auf einen monoklonalen Entstehungsmechanismus der multifokal aufgetretenen Tumoren, im Sinne einer Implantation, schließen. Möglicherweise ist jedoch ein Teil dieser Fälle als nicht informativ einzustufen, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass zufällig an keinem der ausgewählten Genloci eine Mutation vorlag. Hier würde der Vergleich mit sicher nicht entartetem Kontrollgewebe die Aussagekraft erhöhen; dieser war jedoch aus Mangel an entsprechendem Untersuchungsmaterial nicht durchführbar. Darüber hinaus ist das zufällige Auftreten eines identischen Genotyps bei polyklonalen Tumorfoci nicht auszuschließen. Durch den hohen Polymorphismus der Mikrosatelliten ist diese Möglichkeit jedoch in der Summation der Aussagekraft mehrerer Marker zu vernachlässigen.

Ein diskordantes Muster wäre unter Umständen durch nachträgliche Mutationen in Subgruppen einer ursprünglich monoklonalen Population neoplastischer Zellen denkbar. Insgesamt wahrscheinlicher ist jedoch eine polyklonale Genese dieser Tumorherde. Demnach ist davon auszugehen, dass bei der Mehrheit der Patientinnen mehrere Zelllinien zu Grunde liegen. Die Ergebnisse zeigen aber, dass selbst in diesen Fällen Subgruppen von Tumorfoci auszumachen sind, denn es gab 4 „Serien“ mit untereinander identischem molekularem Profil. Die Gemeinsamkeiten betrafen nur in einem Fall sowohl einen ovariellen Herd als auch einen Teil der extraovariellen. Hier wäre ein gemeinsamer Ursprung denkbar. Die restlichen 3 Serien mit einheitlichem MSI-/AI-Profil beziehen ausschließlich Implants ein. Diese könnten daher untereinander monoklonal sein, in Bezug auf den Borderline-Tumor jedoch polyklonal.

Hinsichtlich der ovariellen Oberflächenbeteiligung war kein Zusammenhang zu genotypischen Gemeinsamkeiten oder Unterschieden zwischen BOTs und Implants ersichtlich.

In die Interpretation der Ergebnisse wurden zusätzlich in der Arbeitsgruppe durchgeführte Sequenzierungen im Exon 1 des K-RAS-Gens und im Exon 15 des B-RAF-Gens

---

einbezogen. Lediglich das K-RAS-Codon 12 war informativ und deckte 4 Mutationen auf (33,3% der Fälle). Dabei waren in  $\frac{3}{4}$  der entsprechenden Fälle Unterschiede zwischen BOT- und IMP-Proben zu verzeichnen; in einem der beiden bilateralen Fälle sogar zwischen beiden Borderline-Tumoren. Nur in einem Fall betraf die Mutation sowohl die ovariellen Herde als auch zumindest einen extraovariellen. Da dieser Fall auch in der Mikrosatellitenanalyse konkordant war, ist hier ein klonaler Ursprung dieses Implants aus dem BOT wahrscheinlich.

Bei einem weiteren Fall mit konkordantem Mikrosatellitenmuster im linken BOT und 2 der 5 Implants zeigte die Sequenzierung einen heterogenen K-RAS-Genotyp des BOTs in Bezug auf die übrigen Proben. So gibt letztendlich auch dieser Fall Hinweise auf eine polyklonale Tumorentstehung.

In Zusammenschau aller bisher vorliegenden Daten zur Thematik lässt sich keine der beiden konkurrierenden Theorien beweisen oder widerlegen. In dieser Arbeit stellte sich die Mehrheit der Fälle eher als polyklonal dar; in geringerem Maße zeigten sich jedoch auch Gemeinsamkeiten, die mit einer klonalen Vermehrung neoplastischer Zellen vereinbar wären. Auch in vorangegangenen Studien fanden sich, abhängig von der Methode und der Betrachtungsweise, plausible Argumente für das eine oder andere Modell. Möglicherweise koexistieren zwei wesentliche Pathomechanismen: Die Streuung monoklonaler Tochterzellen aus dem S-BOT in den Bauchraum auf der einen Seite und die multifokale Entartung verschiedener mesothelialer Gewebe in einem Organismus auf der anderen Seite. Zur abschließenden Klärung werden sicher erweiterte Untersuchungen vonnöten sein. Die Fragestellung ist nicht nur wissenschaftlich interessant, sondern auch von hoher Relevanz für die Diagnostik, Terminologie und Therapie seröser Borderline-Tumoren des Ovars und peritonealer Implants.

## 8 Literaturverzeichnis

- 1) Abeln EC, Kuipers-Dijkshoorn NJ, Berns EM, Henzen-Logmans SC, Fleuren GJ, Cornelisse CJ: Molecular genetic evidence for unifocal origin of advanced epithelial ovarian cancer and for minor clonal divergence. *Br J Cancer*; 72 (1995) 1330-1336
  - 2) Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HRK: Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer*; 82 (1998) 1808-1820
  - 3) Bell DA: Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol*; 18 (2005) 19-32
  - 4) Bell DA, Longacre TA, Prat J, Kohn EC, Soslow RA, Ellenson LH, Malpica A, Stoler MH, Kurman RJ: Serous borderline (low malignant potential, atypical proliferative) ovarian tumors: Workshop perspectives. *Hum pathol*; 35 (2004) 934-948
  - 5) Bell DA, Scully RE: Serous borderline tumors of the peritoneum. *Am J Surg Pathol*; 14 (1990) 230-239
  - 6) Bell DA, Weinstock MA, Scully RE: Peritoneal implants of ovarian serous borderline tumors. Histologic features and prognosis. *Cancer*; 62 (1988) 2212-2222
  - 7) Best DH, Butz GM, Moller K, Coleman WB, Thomas DB: Molecular analysis of an immature ovarian teratoma with gliomatosis peritonei and recurrence suggests genetic independence of multiple tumors. *Int J Oncol*; 25 (2004) 17-25
  - 8) Biscotti CV, Hart WR: Peritoneal serous micropapillomatosis of low malignant potential (serous borderline tumors of the peritoneum). A clinicopathologic study of 17 cases. *Am J Surg Pathol*; 16 (1992) 467-475
  - 9) Cho NH, Cordon-Cardo C, Li G, Kim SH: Allotype imbalance or microsatellite mutation in low-grade soft tissue sarcomas of the extremities in adults. *J Pathol*; 198 (2002) 21-29
  - 10) Dehari R, Kurman RJ, Logani S, Shih I-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. *Am J Surg Pathol*; 31 (2007) 1007-1012

11) Diebold J, Deisenhofer I, Baretton GB, Blasenbren S, Suchy B, Schneiderbanger K, Meier W, Haas CJ, Löhns U: Interphase cytogenetic analysis of serous ovarian tumors of low malignant potential: comparison with serous cystadenomas and invasive serous carcinomas. *Lab Invest*; 75 (1996) 473-485

12) Diebold J, Dettmar N, Harbeck N, Höß C, Oberlechner E, Schmalfeldt B, Untch M: Borderline-Tumoren. (2004) 66-68

13) Diebold J, Seemüller F, Löhns U: K-RAS mutations in ovarian and extraovarian lesions of serous tumors of borderline malignancy. *Lab Invest*; 83 (2003) 251-258

14) Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J: Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res*; 57 (1997) 4749-4756

15) Dodson MK, Hartmann C, Cliby WA, DeLacey KA, Keeney GL, Ritland SR, Su JQ, Podratz KC, Jenkins RB: Comparison of loss of heterozygosity patterns in invasive low-grade and high-grade epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res*; 53 (1993) 4456-4460

16) Epplen JT, Kyas A, Mäueler W: Genomic simple repetitive DNAs are targets for differential binding of nuclear proteins. *FEBS Lett*; 389 (1996) 92-95

17) FIGO: Classification and staging of malignant tumours in the female pelvis. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 50 (1971) 1-7

18) Gershenson DM, Silva EG, Levy L, Burke TW, Wolf JK, Tornos C: Ovarian serous borderline tumors with invasive peritoneal implants. *Cancer*; 82 (1998) 1096-1103

19) Gu J, Roth LM, Younger C, Michael H, Abdul-Karim FW, Zhang S, Ulbright TM, Eble JN, Cheng L: Molecular evidence for the independent origin of extra-ovarian papillary serous tumors of low malignant potential. *J Natl Cancer Inst*; 93 (2001) 1147-1152

---

- 
- 20) Haas C, Diebold J, Hirschmann A, Rohrbach H, Schmidt S, Löhrs U: Microsatellite analysis in serous tumors of the ovary. *Int J Gynecol Pathol*; 18 (1999) 158-162
- 21) Hancock JM: Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein DB, Schlötterer C (Hrsg): *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford, 2001
- 22) Harlow BL, Weiss NS, Lofton S: Epidemiology of borderline ovarian tumors. *J Nat Cancer Inst*; 78 (1987) 71-74
- 23) Hart WR: Borderline epithelial tumors of the ovary. *Mod Pathol*; 18 (2005) 33-50
- 24) Ho C-L, Kurman RJ, Dehari R, Wang T-L, Shih I-M: Mutations of BRAF and KRAS precede the development of ovarian serous borderline tumors. *Cancer Res*; 64 (2004) 6915-6918
- 25) Hogg R, Scurry J, Kim SN, Friedlander M, Hacker N: Microinvasion links ovarian serous borderline tumor and grade 1 invasive carcinoma. *Gynecol Oncol*; 106 (2007) 44-51
- 26) Honchel R, Halling KC, Thibodeau SN: Genomic instability in neoplasia. *Semin Cell Biol*; 6 (1995) 45-52
- 27) Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*; 363 (1993) 558-561.
- 28) Jacobs IJ, Kohler MF, Wiseman RW, Marks JR, Whitaker R, Kerns BAJ, Humphrey P, Berchuck A, Ponder BAJ, Bast RC, Jr.: Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: analysis by loss of heterozygosity, p53 mutation, and X-chromosome inactivation. *J Natl Cancer Inst*; 84 (1992) 1793-1798
- 29) Kaern J, Tropé CG, Abeler VM: A retrospective study of 370 borderline tumors of the ovary treated at the Norwegian Radium Hospital from 1970 to 1982. A review of clinicopathologic features and treatment modalities. *Cancer*; 71 (1993) 1810-1820
-

- 30) Kashi Y, Soller M: Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein DB, Schlötterer C (Hrsg): Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press, Oxford, 2001
- 31) Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (Hrsg): Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. Zuckschwerdt Verlag, München, 2007
- 32) Koreth J, O'Leary JJ, McGee JOD: Microsatellites and PCR genomic analysis. *J Pathol*; 178 (1996) 239-248
- 33) Krishnamurti U, Sasatomi E, Swalsky PA, Jones MW, Finkelstein SD: Microdissection-based mutational genotyping of serous borderline tumors of the ovary. *Int J Gynecol Pathol*; 24 (2005) 56-61
- 34) Kupryjanczyk J, Thor AD, Beauchamp R, Poremba C, Scully RE, Yandell DW: Ovarian, peritoneal, and endometrial serous carcinoma: clonal origin of multifocal disease. *Mod Pathol*; 9 (1996) 166-173
- 35) Kurman RJ, Trimble CL: The behavior of serous tumors of low malignant potential: are they ever malignant? *Int J Gynecol Pathol*; 12 (1993) 120-127
- 36) Kurman RJ, Visvanathan K, Roden R, Wu TC, Shih I-M: Early detection and treatment of ovarian cancer: shifting from early stage to minimal volume of disease based on a new model of carcinogenesis. *Am J Obstet Gynecol*; 198 (2008) 351-356
- 37) Lahiri D, Zhang A, Nurnberger JJ: High-resolution detection of PCR products from a microsatellite marker using a nonradioisotopic technique. *Biochem Mol Med*; 60 (1997) 70-75
- 38) Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature*; 396 (1998) 643-649
- 39) Liu B, Farrington SM, Petersen GM, Hamilton SR, Parsons R, Papadopoulos N, T TF, J JJ, Kinzler KW, Wyllie AH, et al: Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nat Med*; 1 (1995) 348-352
-

- 40) Lu KH, Bell DA, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC: Evidence for the multifocal origin of bilateral and advanced human serous borderline ovarian tumors. *Cancer Res*; 58 (1998) 2328-2330
- 41) Mäkelä TP, Hellsten E, Vesa J, Alitalo K, Peltonen L: An Alu variable polyA repeat polymorphism upstream of L-myc at 1p32. *Hum Mol Genet*; 1 (1992) 217-a-
- 42) Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D: Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 91 (1994) 9871-9875
- 43) Mayr D, Hirschmann A, Löhrs U, Diebold J: KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol Oncol*; 103 (2006) 883-887
- 44) Meinhold-Heerlein I, Bauerschlag D, Hilpert F, Dimitrov P, Sapinoso LM, Orłowska-Volk M, Bauknecht T, Park T-W, Jonat W, Jacobsen A, Sehouli J, Luttgies J, Krajewski M, Krajewski S, Reed JC, Arnold N, Hampton GM: Molecular and prognostic distinction between serous ovarian carcinomas of varying grade and malignant potential. *Oncogene*; 24 (2004) 1053-1065
- 45) Mok C-H, Tsao S-W, Knapp RC, Fishbaugh PM, Lau CC: Unifocal origin of advanced human epithelial ovarian cancers. *Cancer Res*; 52 (1992) 5119-5122
- 46) Mok SC-H, Bell DA, Knapp RC, Fishbaugh PM, Welch WR, Muto MG, Berkowitz RS, Tsao S-W: Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy. *Cancer Res*; 53 (1993) 1489-1492
- 47) Nayar R, Siriaunkgul S, Robbins K, McGowan L, Ginzan S, Silverberg S: Microinvasion in low malignant potential tumors of the ovary. *Hum Pathol*; 27 (1996) 521-527
- 48) Nowell PC: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*; 94 (1976) 23-28
- 49) Olszewska H, Stukan M, Emerich J: Clinical analysis of patients with recurrences of borderline ovarian tumors including surgical treatment. *Ginekol Pol*; 76 (2005) 782-787
-

- 50) Ortiz BH, Ailawadi M, Colitti C, Muto MG, Deavers M, Silva EG, Berkowitz RS, Mok SC, Gershenson DM: Second primary or recurrence? Comparative patterns of p53 and K-ras mutations suggest that serous borderline ovarian tumors and subsequent serous carcinomas are unrelated tumors. *Cancer Res*; 61 (2001) 7264-7267
- 51) Pejovic T, Heim S, Mandahl N, Elmfors B, Furgyik S, Flodérus UM, Helm G, Willén H, Mitelman F: Bilateral ovarian carcinoma: cytogenetic evidence of unicentric origin. *Int J Cancer*; 47 (1991) 358-361
- 52) Pickel H, Tamussino K: History of gynecological pathology: XIV. Hermann Johannes Pfannenstiel. *Int J Gynecol Pathol*; 22 (2003) 310-314
- 53) Pieretti M, Cavalieri C, Conway P, Gallion H, Powell D, Turker M: Genetic alterations distinguish different types of ovarian tumors. *Int J Cancer*; 64 (1995) 434-440
- 54) Sammoris DW, Adams LD, Nishizawa EE: Ultrasensitive silver based color staining of polypeptide in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*; 2 (1981) 135-141
- 55) Saretzki G, Hoffmann U, Röhlke P, Psille R, Gaigal T, Keller G, Höfler H, Löning T, Petersen I, Dietel M: Identification of allelic losses in benign, borderline, and invasive epithelial ovarian tumors and correlation with clinical outcome. *Cancer*; 80 (1997) 1241-1249
- 56) Schildkraut JM, Thompson WD: Familial ovarian cancer: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol*; 128 (1988) 456-466
- 57) Schlötterer C: Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*; 109 (2000) 365-371
- 58) Schulz WA: *Molecular biology of human cancers*. Springer, Dordrecht, 2005
- 59) Scully RE: Classification of human ovarian tumors. *Environ Health Perspect*; 73 (1987) 15-24
-

- 60) Segal GH, Hart WR: Ovarian serous tumors of low malignant potential (serous borderline tumors). The relationship of exophytic surface tumor to peritoneal "implants". *Am J Surg Pathol*; 16 (1992) 577-583
- 61) Sehdev AES, Sehdev PS, Kurman RJ: Noninvasive and invasive micropapillary (low-grade) serous carcinoma of the ovary: a clinicopathologic analysis of 135 cases. *Am J Surg Pathol*; 27 (2003) 725-736
- 62) Sehouli J, Lichtenegger W, Hauptmann S, Dietel M: Therapie von Borderline-Tumoren des Ovars. *Frauenarzt*; 43 (2002) 1202-1207
- 63) Seidman JD, Soslow RA, Vang R, Berman JJ, Stoler MH, Sherman ME, Oliva E, Kajdacsy-Balla A, Berman DM, Copeland LJ: Borderline ovarian tumors: Diverse contemporary viewpoints on terminology and diagnostic criteria with illustrative images. *Human pathology*; 35 (2004) 918-933
- 64) Serov SF, Scully RE, Sobin LH: *Histological Typing of Ovarian Tumours*. World Health Organization, Geneva, 1973
- 65) Sherman ME, Berman J, Birrer MJ, Cho KR, Ellenson LH, Gorstein F, Seidman JD: Current challenges and opportunities for research on borderline ovarian tumors. *Human pathology*; 35 (2004) 961-970
- 66) Shih I-M, Kurman RJ: Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges. *Clin Cancer Res*; 11 (2005) 7273-7279
- 67) Shih I-M, Kurman RJ: Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*; 164 (2004) 1511-1518
- 68) Sieben NL, Roemen GM, Oosting J, Fleuren GJ, Engeland Mv, Prat J: Clonal analysis favours a monoclonal origin for serous borderline tumours with peritoneal implants. *J Pathol*; 210 (2006) 405-411
- 69) Sieben NLG, Haar NTT, Cornelisse CJ, Fleuren GJ, Cleton-Janssen A-M: PCR artifacts in LOH and MSI analysis of microdissected tumor cells. *Human pathology*; 31 (2000) 1414-1419
-

- 70) Sieben NLG, Kolkman-Uljee SM, Flanagan AM, le Cessie S, Cleton-Jansen A-M, Cornelisse CJ, Fleuren GJ: Molecular genetic evidence for monoclonal origin of bilateral ovarian serous borderline tumors. *Am J Pathol*; 162 (2003) 1095-1101
- 71) Sieben NLG, Macropoulos P, Roemen GMJM, Kolkman-Uljee SM, Fleuren GJ, Houmadi R, Diss T, Warren B, Adnani MA, Goeij APMd, Krausz T, Project TCG, Flanagan AM: In ovarian neoplasms, *BRAF*, but not *KRAS*, mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol*; 202 (2004) 336-340
- 72) Silverberg SG, Bell DA, Kurman RJ, Seidman JD, Prat J, Ronnett BM, Copeland L, Silva E, Gorstein F, Young RH: Borderline ovarian tumors: key points and workshop summary. *Human pathology*; 35 (2004) 910-917
- 73) Singer G, Kurman RJ, Chang H-W, Cho SKR, Shih I-M: Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am J Pathol*; 160 (2002) 1223-1228
- 74) Singer G, Oldt R, III, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih I-M: Mutations in *BRAF* and *KRAS* characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst.*; 95 (2003) 484-486
- 75) Slomovitz BM, Caputo TA, Gretz HF, Economos K, Tortoriello DV, Schlosshauer PW, Baergen RN, Isacson C, Soslow RA: A comparative analysis of 57 serous borderline tumors with and without a noninvasive micropapillary component. *Am J Surg Pathol*; 26 (2002) 592-600
- 76) Staebler A, Diebold J: Molekularpathologie der epithelialen Ovarialneoplasien - Von der Phänotyp-Genotyp-Korrelation zu neuen Ansatzpunkten in Diagnostik und Therapie *Der Pathologe*; 28 (2007) 180-186
- 77) Tangir J, Loughridge NS, Berkowitz RS, Muto MG, Bell DA, Welch WR, Mok SC: Frequent microsatellite instability in epithelial borderline ovarian tumors. *Cancer Res*; 56 (1996) 2501-2505
- 78) Tapper J, Kettunen E, El-Rifai We, Seppälä M, Andersson LC, Knuutila S: Changes in gene expression during progression of ovarian carcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics*; 128 (2001) 1-6
-

- 79) Taylor HC: Malignant and semimalignant tumors of the ovary. *Surg Gynecol Obstet* 48 (1929) 204-230
- 80) Teneriello MG, Ebina M, Linnoila RI, Henry M, Nash JD, Park RC, Birrer MJ: p53 and Ki-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Res*; 53 (1993) 3103-3108
- 81) Tibiletti MG, Bernasconi B, Furlan D, Bressan P, Cerutti R, Facco C, Franchi M, Riva C, Cinquetti R, Capella C, Taramelli R: Chromosome 6 abnormalities in ovarian surface epithelial tumors of borderline malignancy suggest a genetic continuum in the progression model of ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res*; 7 (2001) 3404-3409
- 82) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*; 319 (1988) 525-532
- 83) Warrenfeltz S, Pavlik S, Datta S, Kraemer E, Benigno B, McDonald J: Gene expression profiling of epithelial ovarian tumours correlated with malignant potential. *Mol Cancer*; 3 (2004) 27
- 84) Watson RH, Neville PJ, Roy WJJ, Hitchcock A, Campbell I: Loss of heterozygosity on chromosomes 7p, 7q, 9p and 11q is an early event in ovarian tumorigenesis. *Oncogene*; 16 (1998) 207-212
- 85) Wolf NG, Abdul-Karim FW, Schork NJ, Schwartz S: Origins of heterogeneous ovarian carcinomas. A molecular cytogenetic analysis of histologically benign, low malignant potential, and fully malignant components. *Am J Pathol*; 149 (1996) 511-520
- 86) Wright D, Manos M: Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis M (Hrsg): *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, 1990
- 87) Yoon BS, Kim YT, Kim JH, Kim SW, Nam EJ, Cho NH, Kim JW, Kim S: Clinical significance of microsatellite instability in sporadic epithelial ovarian tumors. *Yonsei Med J*; 49 (2008) 272-278
-

88) Zanotti KM, Hart WR, Kennedy AW, Belinson JL, Casey G: Allelic imbalance on chromosome 17p13 in borderline (low malignant potential) epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol*; 18 (1999) 247-253

89) Zheng J, Benedict WF, Xu H-J, Hu S-X, Kim TM, Velicescu M, Wan M, Cofer KF, Dubeau L: Genetic disparity between morphologically benign cysts contiguous to ovarian carcinomas and solitary cystadenomas. *J Natl Cancer Inst*; 87 (1995) 1146-1153

90) Zheng J, Robinson WR, Ehlen T, Yu MC, Dubeau L: Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the basis of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6, and 11 and HER-2/neu gene amplification. *Cancer Res*; 51 (1991) 4045-4051

---

Aus dem Institut für Pathologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann

## Thesen der Dissertation

Molekulare Analyse der genotypischen Beziehung zwischen  
serösen Borderline-Tumoren des Ovars und extraovariellen Implants

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Elisabeth Gerono  
geboren am 10.08.1983 in Halle (Saale)

## 9 Thesen

1. Die genotypische Beziehung zwischen serösen Borderline-Tumoren des Ovars und syn- oder metachron entstehenden extraovariellen, meist peritonealen Implants konnte im Rahmen bisher durchgeführter Studien noch nicht aufgeklärt werden.
  2. Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zu dieser kontroversen Diskussion mit dem Vergleich ovarieller und extraovarieller Tumorproben von 12 geeigneten Patientinnen hinsichtlich ihres elektrophoretischen Bandenmusters im Polyacrylamidgel. In die Interpretation der Ergebnisse wurden zusätzlich Sequenzierungen im Bereich zweier Protoonkogene (K-RAS, Exon 1, und B-RAF, Exon 15) einbezogen.
  3. Von den 10 verwendeten Mikrosatelliten waren 8 informativ (MYC-L1, D6, D14, D18, D3, D7, D16 und D22), insbesondere MYC-L1, welcher in der Hälfte der Fälle intraindividuelle Unterschiede aufdeckte.
  4. Insgesamt waren 43,5% aller untersuchten Proben auffällig, darunter - mit Überschneidungen - 30,6% mit allelischen Imbalancen und 25,8% mit Mikrosatelliteninstabilitäten in einem oder mehreren Markern.
  5. 41,7% wiesen in Bezug auf BOT- und IMP-Proben ein konkordantes Profil auf, d.h. Unterschiede in keinem (1 Fall) oder nur einem (4 Fälle) Marker. 58,3% zeigten diesbezüglich in mindestens 2 Markern Abweichungen und waren laut Definition diskordant.
  6. Innerhalb der diskordanten Fälle waren z.T. Serien genotypisch gleicher Proben auszumachen: 3 dieser 4 Serien bezogen ausschließlich Implants ein, eine (Fall Nr. 32) sowohl den linksseitigen Borderline-Tumor als auch 2 von 5 assoziierten Implants.
  7. 7 der 12 Patientinnen (58,3%) waren von einem bilateralen Tumorbefall betroffen. Hinsichtlich der Bandenmuster beider BOT-Herde waren 5 (71,4%) konkordant und 2 (28,6%) diskordant.
  8. Konkordante allelische Imbalancen oder Mikrosatelliteninstabilitäten können Hinweise auf einen monoklonalen Ursprung der untersuchten Proben geben. Ohne den Vergleich mit nicht entartetem Kontrollgewebe ist die Informativität der Marker jedoch nicht ausreichend beurteilbar. Außerdem ist die Möglichkeit des zufälligen Auftretens eines identischen Genotyps bei polyklonalen Tumorfoci nicht auszuschließen, aber unter Einbezug einer ausreichend großen Zahl hoch polymorpher Marker minimierbar.
-

9. Diskordante Muster sind am ehesten mit einer polyklonalen Herkunft der entsprechenden Zelllinien vereinbar. Ein Beweis ist jedoch nicht möglich, da die Tochterzellen eines gestreuten Primärtumors u.U. im Verlauf weiter entarten können.
  10. In der Arbeitsgruppe durchgeführte Sequenzierungen derselben Proben deckten 4 Mutationen im Codon 12 der K-RAS-Gens auf (9,5% der Proben, 1/3 der Fälle).
  11. Davon betraf nur eine (im Fall Nr. 29) sowohl die ovariellen Tumorherde als auch zumindest einen der 8 extraovariellen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse beider Methoden bietet dieser Fall die deutlichsten Hinweise auf den klonalen Ursprung eines Implants aus dem entsprechenden BOT.
  12. Im Fall Nr. 32 identifizierte die Mutationsanalyse im K-RAS-Locus genotypische Unterschiede zwischen dem linksseitigem BOT einerseits und dem kontralateralen BOT und sämtlichen Implants andererseits, so dass eher von einer polyklonalen Herkunft ausgegangen werden muss.
  13. Hinsichtlich der ovariellen Oberflächenbeteiligung war aus den Ergebnissen kein Zusammenhang zu genotypischen Gemeinsamkeiten oder Unterschieden zwischen BOTs und Implants ersichtlich.
  14. Insgesamt betrachtet, finden sich mehr Indizien für eine vom BOT unabhängige, polyklonale Entstehung der Implants, ohne dass die Monoklonalitätstheorie ganz von der Hand zu weisen wäre.
  15. Unter Berücksichtigung anderer Studien zur Thematik ist die Koexistenz beider Pathomechanismen anzunehmen.
-

# Tabellarischer Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Elisabeth Gerono
Anschrift	Am Steintor 20 06112 Halle (Saale)
Telefon	0345 5153592
Geburtsdatum/-ort	10.08.1983, Halle (Saale)
Familienstand	verheiratet 1 Kind

## Ausbildung

1990-1993	Grundschule Dargun
1993-2002	Gymnasium Malchin
2002	Abitur
seit 2002	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg
2004	Physikum
2007-2008	Beurlaubung wegen Elternzeit
aktuell	Praktisches Jahr

Halle (Saale), den 09.04.2009

---

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Halle (Saale), den 09.04.2009

---

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Halle (Saale), den 09.04.2009

---

## Publikationen

*in Arbeit:*

Bartel F, Taubert H, Gerono E, Balschun K, Gradhand E, Kriese K, Hauptmann S: Genotypic relationship between serous ovarian borderline tumors and peritoneal implants.

---

## Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Pathologie durchführen zu können, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann recht herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuern, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert und Herrn Dr. rer. nat. Frank Bartel, dafür, dass sie mir zuverlässig zur Seite gestanden und meine Arbeit mit wertvollen Hinweisen gelenkt und unterstützt haben.

Frau Katharina Balschun und Herrn Dr. med. Martin Köbel möchte ich für die Auswahl der Gewebeproben und die histologische Beurteilung danken.

Bei der Laborarbeit war mir insbesondere die technische Assistentin Frau Birgit Wypior eine große Hilfe. Sie hat mich in die Methodik eingewiesen und ihre praktischen Kenntnisse und Erfahrungen mit mir geteilt.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie: Meinen Eltern, Christine und Erhard, für ihr Vertrauen und die vielseitige Unterstützung, meinen Geschwistern, Johannes und Maria, für die Hilfe bei der technischen Umsetzung und bei Formatierungsfragen, meinem Mann, Benjamin, als geduldigem Korrekturleser, Ratgeber und Tröster und meinem Sohn, Janosch, der mich beim Schreiben mit seinem Lachen immer wieder aufgemuntert hat.

---