

Aus dem
Department für Frauengesundheit Tübingen
Universitäts-Frauenklinik

**Molekulare Klassifikation gynäkologischer
Tumorerkrankungen am Beispiel des Endometrium-
und Ovarialkarzinoms**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Krämer, Pauline Klara**

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Kommoss

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Quintanilla Martinez de Fend

3. Berichterstatter: Professor Dr. V. Müller

Tag der Disputation: 27.07.2023

Allen Frauen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Molekulare Klassifikation gynäkologischer Tumorerkrankungen	1
1.2 Das Endometriumkarzinom	2
1.3 Das Ovarialkarzinom	3
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	5
2. Material und Methoden	6
2.1 Studiendesign	6
2.2 Ethikvotum und Tumorbanksantrag	7
2.3 Etablierung Studienkollektiv Universitätsfrauenklinik Tübingen	7
2.4 Immunhistochemie und Mutationsanalyse – zentrale Testung	8
2.4.1 Erstellung der TMAs	8
2.4.2 WT1- und p53-Immunhistochemie	9
2.4.3 POLE Mutationsanalyse	10
2.4.4 MMR-Immunhistochemie	18
2.5 Bereinigung des Studienkollektivs	19
2.6 Molekulare Klassifikation	19
2.7 Erhebung klinischer Daten des Studienkollektivs	20
2.8 Vergleich der Ergebnisse im endometrioiden Ovarialkarzinom mit denen im endometrioiden Endometriumkarzinom	21
2.9 Statistische Auswertung	22
3. Ergebnisse	23
3.1 Das Studienkollektiv	23
3.2 WT1- und p53-Immunhistochemie	24
3.3 POLE-Mutationsanalyse	26
3.3.1 POLE - Zentrale Testung	26

3.3.2	POLE - Dezentrale Testung.....	32
3.3.3	POLE - Gesamtkollektiv	33
3.4	MMR-Immunhistochemie.....	33
3.4.1	MMR - Zentrale Testung.....	33
3.4.2	MMR - Dezentrale Testung.....	34
3.4.3	MMR - Gesamtkollektiv	34
3.5	Molekulare Klassifikation.....	35
3.6	Klinische Charakteristika des Studienkollektivs	36
3.7	Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter und der molekularen Subtypen.....	37
3.8	Prognostische Bedeutung der molekularen Klassifikation endometrioider Ovarialkarzinome	39
3.9	Subgruppenanalyse der frühen (<i>low-stage</i>) endometrioiden Ovarialkarzinome	42
3.9.1	Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter und der molekularen Subtypen im <i>low-stage</i> endometrioiden Ovarialkarzinom.....	42
3.9.2	Prognostische Bedeutung der molekularen Klassifikation im <i>low-stage</i> endometrioiden Ovarialkarzinom	43
3.10	Vergleich der Ergebnisse im endometrioiden Ovarialkarzinom mit denen im endometrioiden Endometriumkarzinom.....	46
4.	Diskussion.....	50
5.	Zusammenfassung der Arbeit.....	61
6.	Literaturverzeichnis	63
7.	Erklärung zum Eigenanteil	72
8.	Veröffentlichungen.....	74
9.	Danksagungen	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Foto des Tissue Micro Arrays der endometrioiden Ovarialkarzinome aus dem Department für Frauengesundheit der Universitätsklinik Tübingen.	8
Abbildung 2 TMA Map der endometrioiden Ovarialkarzinome aus dem Department für Frauengesundheit der Universitätsklinik Tübingen.	9
Abbildung 3 Primersequenzen der drei Exons 9/13/14 auf Chromosom 12 entsprechend Homo sapiens hg19 Version der University of California, Santa Cruz (UCSC) für das Next-Generation Sequencing der Polymerase Epsilon Exonuclease Domäne. Designt, um die vier Hotspots (p.P286R, p.S297F, p.V411L und p.S459F) abzudecken.	12
Abbildung 4 Klassifikationsalgorithmus für die Zuordnung der molekularen Subtypen. Abgewandelt aus McAlpine et al., 2018, Leon-Castillo et al., 2020b und Krämer et al., 2020.	20
Abbildung 5 Übersicht über die Ergebnisse zur Überprüfung des histologischen Einschlusskriteriums mittels WT1- und p53-Testung.	26
Abbildung 6 Übersicht über die Größe des Studienkollektivs nach Ausschluss der bei der POLE-Mutationsanalyse nicht auswertbaren Fälle.	33
Abbildung 7 Übersicht über die Größe des Studienkollektivs nach Ausschluss der bei der MMR-Immunhistochemie nicht auswertbaren Fälle.	35
Abbildung 8 Ergebnis und Algorithmus der Zuordnung der endometrioiden Ovarialkarzinome in die vier molekularen Subtypen. Abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	36
Abbildung 9 (A) Gesamt (Overall survival)-, (B) krankheitsspezifisches (Disease-specific survival)- und (C) rezidiv-freies (Progression-free survival) Überleben (Kaplan-Meier-Analyse) von Patientinnen mit endometrioidem Ovarialkarzinom aller FIGO Stadien (Full Cohort) in Abhängigkeit ihres molekularen Subtyps. In Gelb sind die Patientinnen mit Karzinomen des MMRd Typs, in Blau des POLEmut Typs, in Rot des p53abn Typs und in Grün des NSMP Typs abgebildet. Unterhalb des Graphen sind die Fallzahlen (Numbers at risk) im jeweiligen Jahr nach Diagnose (Total follow-up (years)) angegeben. Abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	40

Abbildung 10 (A) Gesamt (Overall survival)-, (B) krankheitsspezifisches (Disease-specific survival)- und (C) rezidiv-freies (Progression-free survival) Überleben (Kaplan-Meier-Analyse) von Patientinnen mit low-stage (FIGO IIA und niedriger) endometrioidem Ovarialkarzinom in Abhängigkeit ihres molekularen Subtyps. In Gelb sind die Patientinnen mit Karzinomen des MMRd Typs, in Blau des POLEmut Typs, in Rot des p53abn Typs und in Grün des NSMP Typs abgebildet. Unterhalb des Graphen sind die Fallzahlen (Numbers at risk) im jeweiligen Jahr nach Diagnose (Total follow-up (years)) angegeben. Abgewandelt aus Krämer et al., 2020. 44

Abbildung 11 Verteilung der molekularen Subtypen im (A) endometrioiden Ovarialkarzinom (ENOC) und (B) endometrioiden Endometriumkarzinom (EEC) (zusammengefasste Daten aus Talhouk et al., 2015, Talhouk et al., 2017, Kommoss et al., 2018). In Gelb sind die Patientinnen mit Karzinomen des MMRd Typs, in Blau des POLEmut Typs, in Rot des p53abn Typs und in Grün des NSMP Typs abgebildet. Abgewandelt aus Krämer et al., 2020. 47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Legende zur Kodierung des TMA Scorings für die Marker WT1 und p53 gemäß Kobel et al., 2016 (Krämer et al., 2020).....	10
Tabelle 2 Primersequenz gemäß Access Array System for Illumina Sequencing Systems User Guide (Fluidigm Corporation, 2019).	14
Tabelle 3 Primersequenzen gemäß Access Array System for Illumina Sequencing Systems User Guide (Fluidigm Corporation, 2019).	17
Tabelle 4 Legende zur Kodierung des TMA Scorings für die vier MMR-Marker gemäß Kobel et al., 2016 (Krämer et al., 2020).....	19
Tabelle 5 Übersicht über die von den verschiedenen Institutionen zugesandten Materialien und die demnach auszuführenden zentralen Analysen.	24
Tabelle 6 Übersicht über die von den verschiedenen Institutionen zugesandten Daten nach dezentraler Testung.	24
Tabelle 7 Ergebnisse der Immunhistochemie zu p53 zur Bereinigung des Studienkollektivs sowie zur späteren Klassifikation der molekularen Subtypen. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	25
Tabelle 8 Ergebnisse der Immunhistochemie zu WT1 zur Bereinigung des Studienkollektivs.....	25
Tabelle 9 Übersicht der gefundenen POLE Mutationen in den zentralen Analysen (inklusive der Fälle aus Tabelle 11). Patient ID bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID in der für diese Studie angelegten Datenbank. ID Pauline bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID im Tübinger, Essener und Friedrichshafener Kollektiv. NA bedeutet, dass dieser Fall nicht aus dem Subkollektiv der Tübinger, Essener und Friedrichshafener Fälle stammt. Basenaustausch bezeichnet die ausgetauschte Base entsprechend der Nomenklatur der Human Genome Variation Society. Aminosäure bezeichnet die ausgetauschte Aminosäure entsprechend der Nomenklatur der Human Genome Variation Society. Exon bezeichnet das entsprechende Exon auf Chromosom 12. Alterationstyp beschreibt die Relevanz der entsprechenden Alteration gemäß der Festlegung der POLE mutierten Fälle (S.18). Durchschnittl. Anzahl der Reads der drei Amplikons bezeichnet den Durchschnitt der Anzahl der Reads der drei	

Primersets pro Fall. Die Variant frequency beschreibt das Verhältnis der als Alteration angegebenen Base zu den anderen vorkommenden Basen an dieser Position. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	27
Tabelle 10 DNA-Konzentration der extrahierten DNA der Tübinger, Essener und Friedrichshafener Fälle in ng/µl. Patient ID bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID in der für diese Studie angelegten Datenbank. ID Pauline bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID im Tübinger, Essener und Friedrichshafener Kollektiv.	29
Tabelle 11 Gesuchte POLE Alterationen im Tübinger, Essener und Friedrichshafener Kollektiv. Patient ID bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID in der für diese Studie angelegten Datenbank. ID Pauline bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID im Tübinger, Essener und Friedrichshafener Kollektiv. Position beschreibt die Position der Basenalteration bezogen auf das Referenzgenom. Überprüfung IGV beschreibt von wie vielen der 3 Primerpaare (3x vorwärts und rückwärts) die Sequenzierung funktioniert hat (y) und in wie vielen von eben diesen die entsprechende Alteration in IGV zu sehen war (x) und in welchen Primersets. Alterationstyp beschreibt die Relevanz der entsprechenden Alteration gemäß der Festlegung der POLE mutierten Fälle (S.18). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	32
Tabelle 12 Übersicht der dezentral gefundenen POLE-Mutationen. Patient ID bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID in der für diese Studie angelegten Datenbank. Basenaustausch bezeichnet die ausgetauschte Base entsprechend der Nomenklatur der Human Genome Variation Society. Aminosäure bezeichnet die ausgetauschte Aminosäure entsprechend der Nomenklatur der Human Genome Variation Society. Exon bezeichnet das entsprechende Exon auf Chromosom 12. Alterationstyp beschreibt die Relevanz der entsprechenden Alteration gemäß der Festlegung der POLE mutierten Fälle (S.18). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	33
Tabelle 13 Ergebnisse der zentral durchgeführten Immunhistochemie zu den vier Mismatch-Repair-Proteinen. Der MMR Status in der letzten Zeile fasst die Daten der einzelnen Marker entsprechend Tabelle 4 zusammen. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	34

Tabelle 14 Ergebnisse der dezentral durchgeführten Immunhistochemie zu den vier Mismatch-Repair-Proteinen. Der MMR-Status in der letzten Zeile fasst die Daten der einzelnen Marker entsprechend Tabelle 4 zusammen. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.....	34
Tabelle 15 Univariate Analyse der Unterschiede klinisch-pathologischer Charakteristika zwischen kanadischen und europäischen Fällen. Beim Mittelwert ist in Klammer die Standardabweichung (sd) mit angegeben, beim Median der Interquartilsabstand (IQR). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	37
Tabelle 16 Univariate Analyse zwischen molekularen Subtypen und klinisch-pathologischen Variablen. Beim Mittelwert ist in Klammer die Standardabweichung (sd) mit angegeben, beim Median der Interquartilsabstand (IQR). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	39
Tabelle 17 10-Jahres-Überlebensraten und Hazard Ratios für Gesamt (OS)-, krankheitsspezifisches (DSS)- und rezidiv-freies (PFS) Überleben der vier molekularen Subtypen. Unter den Hazard ratios ist in Klammer das 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	41
Tabelle 18 Multivariate Analyse zwischen Überleben, molekularen Subtypen und den in der univariaten Analyse signifikanten klinisch-pathologischen Variablen. Unter den Hazard ratios ist in Klammer das 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	42
Tabelle 19 Univariate Analyse zwischen molekularen Subtypen und klinisch-pathologischen Variablen im Subkollektiv der low-stage (FIGO IIA und niedriger) endometrioiden Ovarialkarzinome. Beim Mittelwert ist in Klammer die Standardabweichung (sd) mit angegeben, beim Median der Interquartilsabstand (IQR). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	43
Tabelle 20 10-Jahres-Überlebensraten und Hazard Ratios der vier molekularen Subtypen im Subkollektiv der low-stage (FIGO IIA und niedriger) endometrioiden Ovarialkarzinome. Unter den Hazard ratios ist in Klammer das 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.	45

Tabelle 21 Multivariate Analyse der low-stage (FIGO IIA und niedriger) endometrioiden Ovarialkarzinome zwischen Überleben, molekularen Subtypen und den in der univariaten Analyse signifikanten klinisch-pathologischen Variablen. Unter den Hazard ratios ist in Klammer das 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020. 46

Tabelle 22 Nach 5 Jahren zensierte multivariate Überlebensanalysen des endometrioiden Ovarialkarzinoms. Unter den Hazard ratios ist in Klammer das 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020. 48

Tabelle 23 5-Jahres-Überlebensraten der Patientinnen mit endometrioidem Ovarialkarzinom (ENOC) sowie von Patientinnen mit endometrioidem Endometriumkarzinom (EEC) (zusammengefasst aus Talhouk et al., 2015, Talhouk et al., 2017, Kommos et al., 2018). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020..... 49

Abkürzungsverzeichnis

CA - Kanada

CI - Konfidenzintervall

COEUR - Canadian Ovarian Experimental Unified Resource

DSS - krankheitsspezifisches Überleben

EEC - endometrioides Endometriumkarzinom

ENOC - endometrioides Ovarialkarzinom

ESGO - Society of Gynaecological Oncology

ESP - European Society of Pathology

ESTRO - European Society for Radiotherapy and Oncology

FFPE - Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

FIGO - Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

H.E. - Hämatoxylin-Eosin

HGSC - High-grade-seröses Ovarialkarzinom

IGV - Integrative Genomics Viewer

IQR - Interquartilsabstand

LGSC - low-grade-seröses Ovarialkarzinom

LRT - Log-Rank-Test

MMR-Status - MisMatch-Repair-Protein-Status

MMRd - MisMatch-Repair-deficient

MSI - Mikrosatelliteninstabil

NGS - Next-Generation-Sequencing

NIC - National Cancer Institute

NL - Niederlande

NSMP - No-Specific Molecular Profile

OS - Gesamtüberleben

OVCARE - British Columbia's Gynecological Cancer Research Team

PCR - Polymerase-Ketten-Reaktion

PFS - rezidiv-freies Überleben

POLE - Polymerase Epsilon Exonuclease Domäne

qPCR - quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

sd - Standardabweichung

TCGA - The Cancer Genome Atlas Project

TMA - Tissue Micro Array

TP53 - Tumorsupressorprotein-53

UBC - University of British Columbia

UCSC - University of California, Santa Cruz

UK - United Kingdom

VUS - somatic variants of unknown significance

WHO - World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Molekulare Klassifikation gynäkologischer Tumorerkrankungen

Die histopathologische Untersuchung und Klassifikation maligner Tumoren stellt das unabdingbare Fundament einer jeden onkologischen Behandlung dar. Darüber hinaus haben neue Möglichkeiten zur immer schnelleren und kostengünstigeren molekularen Analyse im Fachbereich der Onkologie in vielen Tumorentitäten nicht nur zu einem völlig neuen Krankheitsverständnis, sondern bereits auch zu neuen therapeutischen Möglichkeiten, beispielsweise der sogenannten *targeted Therapies*, geführt. Als eines der bahnbrechendsten Vorhaben in diesem Bereich ist das *Cancer Genome Atlas Project* (TCGA) des *National Cancer Institute* (NIC) und des *National Human Genome Research Institute* zu nennen. Im Rahmen dieses umfassenden Forschungsprojektes wurden mittlerweile 33 der wichtigsten und häufigsten Tumorentitäten molekular charakterisiert und darauf aufbauend unzählige Forschungsprojekte initiiert (Bailey et al., 2018).

Im Fachbereich der gynäkologischen Onkologie wurden auf diesem Wege Zervixkarzinome, Uterussarkome, seröse Ovarialkarzinome sowie Adenokarzinome des Korpus Uteri (auch: Endometriumkarzinome) einer umfangreichen und detaillierten molekularen Analyse zugeführt (Blum et al., 2018). Während daraus beim Zervixkarzinom, Uterussarkom und serösen Ovarialkarzinom weitestgehend Erkenntnisse zu Verständnis, Klassifikation und Prognose gewonnen wurden, die bisher in der Diagnostik und Therapie noch keinen Einzug erhalten haben (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2017, Han et al., 2021, Guo et al., 2015, Verhaak et al., 2013), führten die Erkenntnisse des TCGA zum Endometriumkarzinom bereits zu wesentlichen therapeutisch relevanten Implikationen. Entsprechend wurden diese nun in der aktuellen Klassifikation durch die *World Health Organization* (WHO) anerkannt (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2020). Darüber hinaus fanden sie im Rahmen der Portec 4a Studie (van den Heerik et al., 2020) Einzug in die aktuelle *European Society of Gynaecological Oncology* (ESGO)/ *European*

Society for Radiotherapy and Oncology (ESTRO)/ European Society of Pathology (ESP) Leitlinie (Concin et al., 2021) und damit in den klinischen Alltag.

1.2 Das Endometriumkarzinom

Über lange Zeit erfolgte die Einteilung des Endometriumkarzinoms, wie die der meisten malignen Erkrankungen, auf Basis rein histopathologischer Eigenschaften (Kurman et al., 2014). Eingeteilt wurde nach einem dualistischen Modell in Typ-I- und Typ-II-Karzinome. Diese Einteilung hat bis heute sowohl prognostisch als auch therapeutische Relevanz. Zu den Typ II-Karzinomen gehören seröse und klarzellige Karzinome. Ihr Wachstum wird nicht durch Östrogen beeinflusst. Deshalb werden sie auch als östrogen-unabhängig bezeichnet. Es handelt sich zumeist um aggressive Tumore, die im Vergleich zu den Typ I-Karzinomen bei Diagnose häufig mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Typ I-Karzinome hingegen werden auch als östrogen-abhängig oder endometrioid-ähnlich bezeichnet. Histopathologisch fallen darunter fast ausschließlich endometrioides Endometriumkarzinome, zu einem kleinen Anteil beispielsweise auch muzinöse Karzinome und weitere Varianten. Sie machen 80% der Endometriumkarzinome aus. (Bokhman, 1983, Amant et al., 2005)

In Ergänzung zu dieser rein histopathologischen Klassifikation konnte für die endometrioiden Adenokarzinome des Korpus Uteri im Rahmen des oben erwähnten TCGA eine neue prognostisch, und wie sich später auch zeigte, therapeutisch relevante molekulare Klassifikation etabliert werden. Dabei wird in die vier folgenden Subtypen eingeteilt: *Polymerase Epsilon Exonuclease Domäne (POLE) (ultramutiert)*, *Mikrosatelliteninstabil (MSI) (hypermutiert)*, *Tumorsuppressorprotein-53 (TP53) copy-number low* und *TP53 copy-number high* (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013).

Von den Erkenntnissen des TCGA abgeleitet, konnten die Arbeitsgruppen um Talhouk und Bosse et al. zeigen, dass die Bestimmung der vier molekularen Typen mit wenigen Surrogatparametern ausreichend möglich ist (Talhouk et al., 2015, Talhouk et al., 2017, Kommoss et al., 2018, Church et al., 2015, Stelloo et al., 2016). Bei diesen Surrogatparametern handelt es sich zum einen um die in der klinischen Routine vielfach verwendete immunhistochemische Bestimmung

des p53- und **MisMatch-Repair-Protein-Status (MMR-Status)** und zum anderen um eine molekulare Analyse des **POLE-Status**. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass diese Einteilung in nach der neuen Methode dann **POLEmut** (vorher: POLE (ultramutiert)), **MMRd (MisMatch-Repair-deficient)** (vorher: MSI (hypermutiert)), **p53abn** (vorher: TP53 copy-number high) und **NSMP (No-Specific Molecular Profile)** (vorher: TP53 copy-number low) nicht nur prognostisch relevant ist, sondern auch prädiktiv bezüglich des Ansprechens von Therapien (McAlpine et al., 2018, Reijnen et al., 2019). Mittlerweile fand, durch die Erweiterung dieser Klassifikation mit etablierten klinischen und histologischen Prognosefaktoren wie Stadium, Grading und L1CAM -Status, die erste klinische Studie zur adjuvanten Strahlentherapie statt (van den Heerik et al., 2020). Weitere klinische Studien sind in Vorbereitung (Giustozzi et al., 2021, De Nederlandse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie (NVOG), 2022). Auch in der aktuell gültigen WHO-Klassifikation *Tumore der weiblichen Reproduktionsorgane* werden für die endometrioiden Adenokarzinome des Korpus Uteri wie oben erwähnt nun die vier molekularen Subtypen unterschieden (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2020). Ebenso wurden sie wie oben beschrieben in der aktuellen ESGO/ESTRO/ESP Leitlinie berücksichtigt (Concin et al., 2021).

1.3 Das Ovarialkarzinom

Gemäß der aktuell gültigen WHO-Klassifikation werden für das Ovarialkarzinom fünf wesentliche histologische Typen unterschieden: High-grade-seröses Ovarialkarzinom (HGSC), endometrioides, klarzelliges, muzinöses und Low-grade-seröses Ovarialkarzinom (LGSC). Das high-grade-seröse Ovarialkarzinom ist mit etwa 70% mit Abstand der häufigste Typ, endometrioides und klarzelliges teilen sich mit jeweils etwa 10-12% den zweiten Platz (Prat, 2012, Kobel et al., 2010).

Bei den histologischen Typen des Ovarialkarzinoms handelt es sich im Grunde um unterschiedliche Entitäten mit unterschiedlicher Morphologie, Prognose, Ätiologie und molekularen Eigenschaften (Kommoss und Gilks, 2017, Meinhold-Heerlein et al., 2016, Kobel et al., 2016). Trotz des Wissens über die deutlichen

Unterschiede werden Ovarialkarzinome weiterhin weitestgehend unabhängig vom histologischen Typ behandelt. Therapieentscheidungen werden größtenteils anhand etablierter klinisch-pathologischer Merkmale wie Grading, TNM- und Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) -Stadium getroffen (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2020).

Im Zuge des TCGA wurde auch für das Ovarialkarzinom versucht, eine molekulare Einteilung zu finden. Auf Grund der Häufigkeitsverhältnisse beschränken sich die Erkenntnisse des TCGA bisher allerdings auf seröse Ovarialkarzinome (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011).

Für den zweithäufigsten Typ, das endometrioides Ovarialkarzinom (ENOC), finden sich in der Literatur lediglich Erkenntnisse zu einzelnen Biomarkern wie BRAF, KRAS (Singer et al., 2003), PTEN, PPP2R1A (Jayson et al., 2014), CTNNB1 (Cybulska et al., 2019, McConechy et al., 2014, Palacios und Gamallo, 1998) ARID1A, PI3KCA (Jayson et al., 2014, Wiegand et al., 2010) und Mismatch-Repair-Protein-Insuffizienz (Murphy und Wentzensen, 2011, Aysal et al., 2012). Im klinischen Alltag werden diese Biomarker allerdings nicht routinemäßig angewendet (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2020).

Bei histopathologischer Betrachtung des endometrioiden Ovarialkarzinoms, welches sich im Vergleich zu den übrigen histologischen Typen durch einen günstigen prognostischen Verlauf, ein meist geringer fortgeschrittenes klinisches Stadium und ein jüngeres Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose auszeichnet (Groen et al., 2015, Kommos et al., 2016), fällt eine deutliche Ähnlichkeit mit dem endometrioiden Adenokarzinom des Korpus Uteri auf. Für beide Entitäten ist beispielsweise ein drüsenförmiges Wachstum typisch (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2020).

Neben morphologischen Gemeinsamkeiten mehren sich die Hinweise auf einen gemeinsamen Entstehungsmechanismus des endometrioiden Adenokarzinom des Ovars und dem des Korpus Uteri. Beispielsweise sind synchron auftretende Adenokarzinome in Korpus Uteri und Ovar in der großen Mehrzahl endometrioider Histologie (Rodolakis et al., 2012). Darüber hinaus wird zunehmend davon ausgegangen, dass ein Teil der endometrioiden Ovarialkarzinome im Zusammenhang mit Endometriose steht, bei welcher man

wiederum davon ausgeht, dass diese dem Endometrium entspringt (Anglesio et al., 2016, Schultheis et al., 2016, Cochrane et al., 2017, Wiegand et al., 2010, Matsumoto et al., 2015). In Anbetracht dieser morphologischen und wie oben erläutert wahrscheinlich auch ätiologisch engen Verwandtschaft des endometrioiden Adenokarzinom des Ovars und des endometrioiden Adenokarzinom des Korpus Uteri stellt sich die Frage, ob die vom TCGA abgeleitete molekulare Klassifikation des Endometriumkarzinoms auch im endometrioiden Adenokarzinom des Ovars zur Individualisierung therapeutischer Konzepte hinzugezogen werden könnte. In der Literatur finden sich hierzu lediglich Daten aus einer kleinen Fallserie einer Forschungsgruppe aus Toronto (Parra-Herran et al., 2017). Darüber hinaus konnten die vier molekularen Subtypen in einer Whole-Genome-Sequencing Analyse eines kleinen Kollektivs (n=36) endometrioider Adenokarzinome des Ovars nachgewiesen werden (Cybulska et al., 2019). Die Daten sind vielversprechend, Analysen an einem großen Kollektiv endometrioider Ovarialkarzinome sind zur Einschätzung der klinischen Relevanz dieser molekularen Klassifikation allerdings dringend nötig.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die vom Endometriumkarzinom abgeleitete molekulare Klassifikation in einem großen Kollektiv endometrioider Ovarialkarzinome anzuwenden. Dabei war die primäre Fragestellung der Promotionsarbeit, die Häufigkeiten und die prognostische Relevanz der molekularen Subtypen im endometrioiden Adenokarzinom des Ovars zu untersuchen und diese Ergebnisse mit denen aus dem Endometriumkarzinom zu vergleichen.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und der damit einhergehenden geringen Fallzahl in einzelnen Zentren war zur Umsetzung der oben genannten Fragestellung die Planung einer umfassenden retrospektiven Multicenterstudie unabdingbar. Einschlusskriterien der Studie waren:

1. Histologische Originaldiagnose: Endometrioides Ovarialkarzinom
2. Verfügbares Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe
3. Ethikvotum

Teilnehmenden Studienzentren wurde es freigestellt, die im Studienablauf vorgesehenen Analysen selbst vor Ort („*dezentrale Testung*“) durchzuführen oder alternativ eine im Rahmen dieser Doktorarbeit angebotene „*zentrale Testung*“ in Anspruch zu nehmen. In letztgenannten Fall war neben der Bereitstellung klinischer Daten auch die Übermittlung repräsentativer Tumorproben erforderlich.

Für alle Fälle waren folgende Untersuchungen vorgesehen (Krämer et al., 2020):

- i. Verifikation des histologischen Einschlusskriteriums mittels immunhistochemischer Bestimmung des *WT1*- und *p53*-Status.
- ii. Molekulare Klassifikation gemäß TCGA Endometriumkarzinom.
 - a. *POLE*-Mutationsstatus: Next-Generation-Sequencing (NGS) oder Sequenzierung nach Sanger. Folgende Mutationen wurden als pathologisch anerkannt: p.P286R, p.S297F, p.V411L, p.S459F, p.M295R, p.S297F, p.V411L, p.L424I, p.A456P und p.S459F (genaueres s. *Festlegung der POLE mutierten Fälle*, S.18) (Leon-Castillo et al., 2020a).
 - b. *MMR*-Status: immunhistochemische Bestimmung.
 - c. *p53*-Status: immunhistochemische Bestimmung.

Um eine einheitliche Auswertbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die folgenden Mindeststandards definiert:

1. Von der verwendeten Methode zur POLE-Mutationstestung (NGS oder Sequenzierung nach Sanger) mussten mindestens die vier häufigsten, als pathogen anerkannten Hotspots des POLE-Gens der Plattform Cosmic (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) abgedeckt werden: p.P286R, p.S297F, p.V411L und p.S459F.
2. Zur immunhistochemischen Bestimmung des MMR-Status mussten mindestens die Marker PMS2 und MSH6 bestimmt werden.

2.2 Ethikvotum und Tumorbanksantrag

Eine ethische Beratung zur Verwendung des Materials und der jeweiligen Daten wurde entsprechend dem Studiendesign von den jeweiligen Institutionen gemäß den lokalen Bestimmungen verlangt (Krämer et al., 2020).

Für die Fälle der Universitätsklinik Tübingen wurde entsprechend vor Beginn der Untersuchungen der folgenden Arbeit auf Basis der revidierten Deklaration von Helsinki, der Generalversammlung des Weltärztebundes und des geltenden Rechts unter der Projektnummer (488/2018B02) ein positives Ethikvotum bei der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität eingeholt. Zusätzlich wurde die Verwendung des FFPE-Gewebes des Südwestdeutschen Tumorzentrums, Comprehensive Cancer Center Tübingen, per Antrag genehmigt.

2.3 Etablierung Studienkollektiv Universitätsfrauenklinik Tübingen

Zur Etablierung des Studienkollektives am Department für Frauengesundheit der Universitätsklinik Tübingen wurden zunächst alle zwischen 2003 und 2017 behandelten Ovarialkarzinome mit der Originaldiagnose „*endometrioides Ovarialkarzinom*“ in einer klinikinternen Datenbank identifiziert. Für diese Patientinnen wurden alle tumortragenden Schnittpräparate herausgesucht, diese entsprechend der aktuell gültigen WHO-Klassifikation begutachtet und der histologische Typ bestätigt oder gegebenenfalls korrigiert. Zur Erstellung eines

Tissue Micro Arrays (TMA) geeignete Paraffinblöcke wurden identifiziert und aus dem Archiv des pathologischen Instituts Tübingen herausgesucht.

2.4 Immunhistochemie und Mutationsanalyse – zentrale Testung

Im Folgenden werden die Spezifika der zentral durchgeführten immunhistochemischen und molekularen Analysen beschrieben, die gleichzeitig auch den Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit darstellen.

2.4.1 Erstellung der TMAs

Für die Beantwortung pathologischer Fragestellungen an großen Kollektiven ist die Verwendung von TMAs immer mehr zum Standard geworden. Diese Methode macht eine äußerst effektive und in erster Linie auch einheitlich standardisierte Auswertung möglich (Jawhar, 2009). In einem TMA werden kleinste Gewebeprobe, sogenannte *Cores*, aus verschiedenen Spender-Paraffinblöcken in einem Empfänger-Paraffinblock zusammengefasst (s. Abbildung 1). Anschließend kann der TMA wie jeder andere Paraffinblock geschnitten, auf einen Objektträger aufgezogen und mit jeglicher Färbung eingefärbt werden.

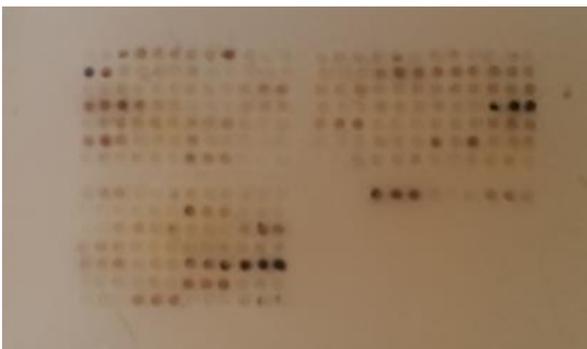


Abbildung 1 Foto des Tissue Micro Arrays der endometrioiden Ovarialkarzinome aus dem Department für Frauengesundheit der Universitätsklinik Tübingen.

Zur Erstellung der TMAs wurde die Tumorregion auf einem Hämatoxylin-Eosin-(H.E.-) Schnitt eines FFPE-Blocks unter dem Mikroskop dargestellt, mit einem Markierstift eingekreist und auf den Paraffinblock übertragen. TMA Maps wurden

erstellt (s. Abbildung 2). Die TMAs wurden je Fall mit drei Cores à 6mm Durchmesser einheitlich gebaut.

Für Fälle, deren Material aus vorherigen Studien schon auf bestehenden TMAs repräsentiert war, wurden diese TMAs verwendet.

18-007 - endometrioid OvCa Tübingen - Sector Map Block A																									
C4	C13	Q4	Q13																						
Sector 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Sector 5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	1	57	57	57	58	58	58	59	59	59	60	60	60
2	8	8	8	7	7	7	6	6	6	5	5	5	2	64	64	64	63	63	63	62	62	62	61	61	61
3	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	3	65	65	65	66	66	66	67	67	67	68	68	68
4	16	16	16	15	15	15	14	14	14	13	13	13	4	72	72	72	71	71	71	70	70	70	69	69	69
5	17	17	17	18	18	18	19	19	19	20	20	20	5	73	73	73	74	74	74	75	75	75	76	76	76
6	24	24	24	23	23	23	22	22	22	21	21	21	6	80	80	80	79	79	79	78	78	78	77	77	77
7	25	25	25	26	26	26	27	27	27	28	28	28	7	81	81	81	82	82	82	83	83	83	84	84	84
Sector 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Sector 6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	29	29	29	30	30	30	31	31	31	32	32	32	1	85	85	85	86	86	86	87	87	87			
2	36	36	36	35	35	35	34	34	34	33	33	33	2												
3	37	37	37	38	38	38	39	39	39	40	40	40	3												
4	44	44	44	43	43	43	42	42	42	41	41	41	4												
5	45	45	45	46	46	46	47	47	47	48	48	48	5												
6	52	52	52	51	51	51	50	50	50	49	49	49													
7	53	53	53	54	54	54	55	55	55	56	56	56													

Abbildung 2 TMA Map der endometrioiden Ovarialkarzinome aus dem Department für Frauengesundheit der Universitätsklinik Tübingen.

2.4.2 WT1- und p53-Immunhistochemie

Zur Erstellung der immunhistochemischen Färbungen für WT1 und p53 wurden Schnittpräparate à 4 µm der erstellten TMAs angefertigt.

Für die WT1-Färbungen wurde eine Ventana Discovery XT Platform mit dem Clone 6F-H2 (Novocastra) verwendet, zur Bestimmung des p53-Status eine DAKO Omnis Platform mit dem Marker p53 (H30-10M-30, Clone DO-7 (GA61661-2; DAKO)) (Krämer et al., 2020).

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen wurden mittels Scores codiert und je immunhistochemischer Färbung in die TMA Map (s. Abbildung 2) eingetragen. Wurde einer der Cores eines Falls als *present* bzw. *abnormal* bewertet, wurde der komplette Fall entsprechend klassifiziert. Waren Fälle auf mehreren TMAs repräsentiert, wurden alle verfügbaren Cores für die Auswertung berücksichtigt. (Krämer et al., 2020)

Interpretiert wurde wie folgt:

	0	1	2	3	8	9	Interpretation
WT1	negativ	focal	diffuse>50%			Uninterpretable	0=absent 1,2=present
p53	complete absence	wild type	overexpression	cytoplasmic = loss of function	No internal control	Uninterpretable	1=wildtype 0,2,3=abnormal

Tabelle 1 Legende zur Kodierung des TMA Scorings für die Marker WT1 und p53 gemäß Kobel et al., 2016 (Krämer et al., 2020).

2.4.3 POLE Mutationsanalyse

DNA-Extraktion

Die DNA für die POLE-Mutationsanalyse wurde aus FFPE-Gewebe gewonnen. Bei Fällen mit einem Tumoranteil von über 50% des Schnitts wurden vom Paraffinblock mit Hilfe eines Mikrotoms 3-5 Schnitte à 10µm in ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß gegeben. Betrug der Tumoranteil unter 50% des Schnittes, wurden 3-8 Schnitte à 10µm der Paraffinblocks auf Objektträger aufgezogen und mit einem Skalpell nur die Tumorregion des Schnitts in ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß gegeben.

Deparaffinisierung:

1. Hinzugabe von 1ml Xylol
2. 10 Sekunden Vortexen und Xylol abpipettieren
3. Hinzugabe von 1ml Ethanol (100%)
4. 10 Sekunden Vortexen und Ethanol abpipettieren
5. 10 Minuten mit offenem Deckel in einer Vakuumzentrifuge zentrifugieren

Zur DNA-Extraktion wurde das QIAamp DNA FFPE Tissue Kit sowie das entsprechende Protokoll verwendet:

1. 180µl ATL Puffer und 20µl Proteinase K hinzugeben, vortexen und eine Nacht bei 56°C inkubieren
2. Proteinase K hinzufügen, bis eine homogene Flüssigkeit entsteht
3. 1 Stunde bei 90°C inkubieren
4. Auf Raumtemperatur abkühlen lassen

5. 2µl RNase A (7000 U/ml) hinzugeben und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
6. Zu jeder Probe eine Mischung aus 200µl AL Puffer und 200µl Ethanol (100%) geben und vortexen
7. Die Lösung auf die Chromatographiesäule transferieren, bei 8000 rpm zentrifugieren und die abgeflossene Flüssigkeit verwerfen
8. 500µl AW1 Puffer auf die Chromatographiesäule geben und bei 8000 rpm zentrifugieren und die abgeflossene Flüssigkeit verwerfen
9. 500µl AW2 Puffer auf die Chromatographiesäule geben und bei 8000 rpm zentrifugieren und die abgeflossene Flüssigkeit verwerfen
10. Chromatographiesäule durch 3 minütiges Zentrifugieren auf höchster Stufe trocknen
11. 50µl ATE Puffer auf die Chromatographiesäule geben, 1 Minute inkubieren lassen und durch Zentrifugieren auf höchster Stufe herausgelöste DNA in einem 1,5ml Mikroreaktionsgefäß auffangen

Quantifizierung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA-Proben wurde mittels eines Qubit Fluorimeters bestimmt. Dazu wurde zunächst pro Probe 200µl Arbeitslösung aus 199µl Qubit Puffer und 1µl Qubit Reagenz (Qubit dsDNA BR Assay Kit, ThermoFisher) hergestellt. Anschließend wurde 1µl der gelösten DNA in 199µl Arbeitslösung gegeben und gegen zwei 1:20 gemischte Qubit Standards (Qubit dsDNA BR Assay Kit, ThermoFisher) gemessen.

Amplifikation der zu sequenzierenden Exons

In frischen Mikroreaktionsgefäßen wurde von der extrahierten DNA durch Verdünnen mit ultradestilliertem Wasser Aliquots mit einer einheitlichen Konzentration von 2,5ng/µl hergestellt.

Für die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) wurden pro Exon je drei verschiedene Primersets verwendet. Diese wurden so entworfen, dass entsprechend der Plattform Cosmic (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer)

die vier wichtigsten Hotspots (p.P286R, p.S297F, p.V411L und p.S459F) abgedeckt wurden (Krämer et al., 2020). Abbildung 3 zeigt die Primersequenzen.

POLE EXON 9 (hotspots: P286 & S297)

```

133253331 CCAGAGGGAGGTAGAGCAGGCTGGGGGTGGGTGTTACAGGGAGGCCTAA TGGGGAGTTAG 133253272
133253271 AGCTTGGG TTTATGCTTATTT TGTCCCCACAG GACCCGTGGTTTTTGGCATTGACATTG 133253212
133253211 AGACGA CCAAAGTCCCCTCAAGTTT CTTGATGCTGAGACAGACCAGATTATGATGATTT 133253152
133253151 CCTACATGATCGATGGCCAG GTGAGCAGGTGGCTTCTGGGAAGTAAGCTCCTGGGA TGGG 133253092
133253091 GACCTTG TCTGGTCCCCATACTACAGCAGCATCTGCCCACTGTTAG TATTTGTTGAGTG 133253032

```

```

Primer set 1
Primer set 2
Primer set 3

```

POLE EXON 13 (hotspot: V411)

```

133250391 TTGCATCTGTCTGTGTGGTG CCCAGTT TTGCCAGTTCTCAGGGGTTG CCGGGCTGCATGT 133250332
133250331 TAGAATCAT CCTGGCTTCTGTTCTCATTCT CCTTCCAGTGGGTGAAGAGGGACAGTTAC 133250272
133250271 CTTCTGTGGGCAGTCATAATCTCAAGGCGGCCGCAAGGCCAAGCTAGGCTATGATCCC 133250212
133250211 GTGGAGCTAGACCCGGAGGACA GTGCCGGATGGCCACGGAGCAGCCCCAGGCACGTAAG 133250152
133250151 CCACATG CCGGCTGCCCTGCTGCCGTGTGCACGCATCCAGATGGCCACGGAGCAGCCCC 133250092

```

```

Primer set 1
Primer set 2
Primer set 3

```

POLE EXON 14 (hotspot: A456)

```

133249971 ACTGTGTGTGCGGCAGGCTGGTCAGGCCA TGGGGTCTTGATT TTGATGGCCCTGCTCTCTGGCGTTCTCTCCTCAG ACTCTGGCCAG 133249912
133249911 TGGGCTCTTGATT TTGATGGCCCTGCTCTCTGGCGTTCTCTCCTCAG ACTCTGGCCAG 133249852
133249851 TATTCGTGTGTCAGATGCTGTGCCACTTACTACCTGTACATGAAGTACGTCCACCCATT 133249792
133249791 ATCTTTGCTCTGTGC ACCATTATCCCATTGGAGCCCGACGAG GTGAGCATTATCTGTCT 133249732
133249731 GTCGGCAC CCTGGCCTCCTCAGCCCTTGCCCACTTCCAAATGCACTGGAGCTGAATGGAG 133249672

```

```

Primer set 1
Primer set 2
Primer set 3

```

Location of hotspot

Abbildung 3 Primersequenzen der drei Exons 9/13/14 auf Chromosom 12 entsprechend Homo sapiens hg19 Version der University of California, Santa Cruz (UCSC) für das Next-Generation Sequencing der Polymerase Epsilon Exonuclease Domäne. Designt, um die vier Hotspots (p.P286R, p.S297F, p.V411L und p.S459F) abzudecken.

Die Primer wurden mit Hilfe der primerquest software von Integrated DNA Technologies designt, in 100µM geliefert und mit ultradestilliertem Wasser in 2µM verdünnt. Anschließend wurde für jedes Primerset pro Probe 4µl Mastermix durch Mischen von 2,5µl PowerUP SYBR Green MasterMix (ThermoFisher), 0,5µl Forward Primer, 0,5µl Reverse Primer und 0,5µl ultradestilliertes Wasser hergestellt. Zu diesem Mastermix wurde je 1µl Probe gegeben.

Als Reaktionsgefäß wurde ein 384-well Plate verwendet. Als System verwendeten wir das QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System von Thermo Fisher. Programmiert wurde wie folgt:

1. 25°C > Δ 1,6 °C/s
2. 50°C für 2min > Δ 1,6 °C/s
3. 95°C für 10min
4. 95°C für 15s > Δ 1,6 °C/s
5. 60°C für 1min
6. 40 Wiederholungen der Schritte 4-5
7. 95°C für 15s > Δ 0,05 °C/s
8. 25°C bis Ende

Zeigte sich in der Schmelzkurve eines Falls ein zweiter Peak, wurde die qPCR für diesen Fall und das entsprechende Primerset wiederholt.

Konnte in der Amplifikationskurve eines Falls keine Vervielfältigung nachgewiesen werden, wurde auch dieser Fall wiederholt. War für den zu wiederholenden Fall genug DNA vorhanden, wurde anstatt einer Konzentration von 2,5ng/µl, eine Konzentration von 10ng/µl verwendet.

Zusätzlich lief je Mastermix eine Negativ-Kontrolle, bei der an Stelle der Probe 1µl ultradestilliertes Wasser verwendet wurde. Zeigte die Negativkontrolle einen Peak in der Schmelzkurve oder einen Anstieg in der Amplifikationskurve wurde die qPCR für das komplette Primerset wiederholt.

Vorbereitung der Amplikons für die Miseq (Barcoding)

Nachdem die entsprechenden Exons vervielfältigt wurden, wurden je 2µl aller Amplicons eines Falls gepoolt und 1:50 mit ultradestilliertem Wasser verdünnt und mit Illumina clustergenerating Adapter enthaltenden Barcodesequenzen markiert. Zum Barcoding wurde anstelle des 48x48 Access Array™ systems von Fluidigm ein normaler Thermocycler verwendet. Die Primer und Barcodes wurden entsprechend der Fluidigm Primer und Barcodes bei Integrated DNA

Technologies bestellt ((Access Array Barcode Library for Illumina Sequencers – 384, Single Direction (Fluidigm, Product #100-4876), Tabelle 2). Gemäß des *Access Array System for Illumina Sequencing Systems User Guides* (Fluidigm Corporation, 2019) wurden für jeden Barcode 12µl ultradestilliertes Wasser, 4µl PE1_CS1 Forward-Primer (10 µM) und 4µl des barcodespezifischen PE2_BC_CS2 Reverse-Primer (10 µM) gemischt, um auf eine Konzentration von 2 µM zu kommen.

Primer	Sequenz
PE1-CS1	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGACGACATGGTTCTACA-3'
PE2-BC-CS2	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-[BC]-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT-3'

Table 2 Primersequenz gemäß *Access Array System for Illumina Sequencing Systems User Guide* (Fluidigm Corporation, 2019).

Je Probe wurden 1,5µl Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Reaktionspuffer ohne MgCl₂ (10x), 2,47µl MgCl₂ Stock Solution (25mM), 3µl GC-RICH Solution (5x), 0,3µl PCR Nucleotide Mix (10µM), 0,15µl FastStart Taq DNA Polymerase (5 U/µl) und 7.58µl ultradestilliertem Wasser zu einem Mastermix gemischt und 4µl des entsprechenden Barcodes (2µM) sowie 1µl der Probe hinzugegeben.

Als Negativkontrolle verwendeten wir je Mastermix anstelle der Probe 1µl ultradestilliertes Wasser.

Die PCR lief auf einem Tetrad 2 Thermocycler (BioRad) wie folgt:

1. 95°C für 10min
2. 95°C für 15s
3. 60°C für 30s
4. 72°C für 1min
5. 15 Wiederholungen der Schritte 2-4
6. 72°C für 3min
7. 10°C bis Ende

Die Produkte der Barcoding-PCR wurden mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht und deren Basenpaarlänge bestimmt. Die Barcoding-PCR wurde als erfolgreich betrachtet, wenn die Proben etwa eine Länge von 300 Basenpaaren aufwiesen. Zusätzlich durfte die Negativkontrolle keine Bande aufweisen. War

die Barcoding-PCR nicht erfolgreich, wurde diese für den entsprechenden Fall wiederholt.

Jede Probe wurde erneut mittels Qubit Fluorometer entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll gemessen und anschließend je 50ng in ein gemeinsames Mikroreaktionsgefäß gepoolt.

Um die Probe zu reinigen, wurden 120µl des Pools und 240µl DNA Suspensionspuffer mit 360µl DNA Waschperlen (Agencourt AMPure XP for PCR Purification, Beckman Coulter) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das Mikroreaktionsgefäß für 1,5 Minuten in einen magnetischen Separator gestellt. Der Überstand wurde abpipettiert und die Probe zweimal mit 1ml Ethanol (70%) gewaschen und wiederum auf dem magnetischen Separator getrennt. Nachdem die Probe für 10 Minuten mit offenem Deckel bei Raumtemperatur getrocknet war, wurden 200µl eines low TE Puffers (Invitrogen) hinzugegeben und nach erneuter Separation der Überstand in ein frisches Mikroreaktionsgefäß pipettiert.

Zusätzlich zu einer letzten Bestimmung der Gesamtkonzentration anhand des oben beschriebenen Protokolls für das Qubit Fluorometer wurde mittels eines Agilent Bioanalyzer DNA 1000 Kit die durchschnittliche Basenpaarlänge und die Reinheit der Probe bestimmt.

Aus der Gesamtkonzentration und der Basenpaarlänge wurde die Molarität der Probe berechnet:

$$\frac{\text{Conc. Pool} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) \times 10^6}{650 \times \text{Basenpaarlänge}}$$

Die Probe wurde mit ultradestilliertem Wasser auf eine Konzentration von 4nM verdünnt, bevor sie auf die Miseq geladen wurde (Illumina Inc., 2019).

Vorbereitung der Miseq

Die Sequenzierung der Amplikons erfolgte mit Hilfe des MiSeq Systems von Illumina. Wir verwendeten das MiSeq Reagent Kit v2. Für dieses Kit wird vom Hersteller eine Proben-Konzentration von 6-10 pM und ein Volumen von 600µl

angegeben. Wir folgten dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll zur Vorbereitung der Probe, der Reagenzien und der Maschine (Illumina Inc., 2018, Illumina Inc., 2019): Als erstes holten wir das Kit aus dem Gefrierschrank (-20°C), lagerten den HT1 Puffer auf Eis und legten die Reaktionskassette mit den Reagenzien in ein Wasserbad mit Raumtemperatur, um sie dort für 1 Stunde auftauen zu lassen. Anschließend stellten wir 1ml 0,2N NaOH Lösung aus 880µl ultradestilliertem Wasser und 20µl 10.0N NaOH her. 5µl unsers 4nM-Pools wurden mit 5µl der 0,2 N NaOH Lösung verdünnt. Um zu einer Konzentration von 20pM zu gelangen, fügten wir 990µl HT1 Puffer hinzu. Zusätzlich ergänzten wir eine PhiX control library (Illumina Inc., 2019). Entsprechend des vom Hersteller vorgegebenen Protokolls (Illumina Inc., 2019) wurden 2µl der 10nM PhiX library mit 3µl 10mM *Tris-Cl*, *pH 8.5 mit 0.1% Tween 20* vermischt. 5µl der 0,2 N NaOH Lösung wurden hinzugegeben und für 5 Minuten inkubiert. 990µl HT1 Puffer wurden hinzugefügt. Daraus resultiert eine Konzentration von 20pM. 375µl der 20pM PhiX Library wurden erneut mit 225µl HT1 Puffer verdünnt, um zu einer Konzentration von 12.5pM zu gelangen. Um zu einer Endkonzentration der Probe von 8pM zu gelangen, wurden 240µl der 20nM Probe, 60µl der 12.5pM PhiX Library und 300µl HT1 Puffer in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben, vermischt und in das dafür vorgesehene Reservoir auf der Reaktionskassette geladen.

Die Primer wurden gemäß des *Access Array System for Illumina Sequencing Systems User Guides* (Fluidigm Corporation, 2019) vorbereitet: Zunächst wurden FL1 und FL2 Sequencing Primer hergestellt. Für FL1 wurden 30µl CS1 (Custom LNA™ Oligos, Qiagen) und 30µl CS2 (Custom LNA™ Oligos, Qiagen), für FL2 30µl CS1rc (Custom LNA™ Oligos, Qiagen) und 30µl CS2rc (Custom LNA™ Oligos, Qiagen) gemischt (Primersequenzen s. Tabelle 3). Um zu einer Endkonzentration von 500nM zu gelangen, wurde für Read 1 (Reservoir 12) zu 7µl FL1 Stock 13µl HT1 Buffer, für Read 2 (Reservoir 13) 7µl FL2 Stock 13µl HT1 Buffer und für Read 3 (Reservoir 14) 7µl FL1 Stock 13µl HT1 Buffer gemischt. Anschließend wurden die Lösungen in die entsprechenden Reservoirs pipettiert.

Name	Oligo Name	Sequenz (5' - 3')
FL1	CS1	A+CA+CTG+ACGACATGGTTCTACA
	CS2	T+AC+GGT+AGCAGAGACTTGGTCT
FL2	CS1rc	T+GT+AG+AACCATGTCGTCAGTGT
	CS2rc	A+GAC+CA+AGTCTCTGCTACCGTA

Table 3 Primersequenzen gemäß Access Array System for Illumina Sequencing Systems User Guide (Fluidigm Corporation, 2019).

Vor Einsetzen der Reaktionskassette und Starten des Sequenzierungsprogramms wurde die Maschine dreimal mit TWEEN® 20 (0,5%) gewaschen und die Flow Cell mit ultradestilliertem Wasser und Ethanol gereinigt. In einem Manifest wurde die *Homo sapiens hg19* Version der University of California, Santa Cruz (UCSC) als unser Referenzgenom definiert und festgelegt, an welcher Stelle dieses Genoms unsere Primer beginnen und wie lang unsere Primersequenzen sind.

Auswertung der Miseq

Durch Verwenden des *Terminals* auf einem MacOs High Sierra Version 10.13.6 wurden die einzelnen vcf-files all unserer Fälle in einer Excel-Datei kombiniert, die die Daten jeder Einzeldatei dem Dateinamen und damit unserer ID und dem entsprechenden Barcode zuordnet. Zunächst wurden Fälle mit *LowGQX* und *Low Genotype Quality* herausgefiltert. Im nächsten Schritt wurden *silent* und *synonymous* Mutationen ausgeschlossen. Die bam-files der übrigen Alterationen wurden mit Hilfe von Integrative Genomics Viewer (IGV) überprüft. Mutationen, die ganz am Anfang oder ganz am Ende eines Primersets und in sehr vielen Fällen vorkamen, wurden als Artefakt gewertet.

Ausschluss von Fails im Miseq Run

Um sicherzustellen, dass mindestens zwei aus drei Primersets pro Fall sequenziert wurden, wurde jeder einzelnen Fall anhand der bam-files in IGV überprüft. Für jeden Fall wurde festgehalten, wie viele verschiedene Sequenzen angezeigt werden, sowie, ob jedes der Primersets ausreichend repräsentiert ist. War noch genug DNA vorhanden, wurden fehlgeschlagene Runs wiederholt. War

nicht mehr genug DNA vorhanden, wurde der Fall von der Auswertung ausgeschlossen.

Festlegung der POLE mutierten Fälle

Die identifizierten Alterationen wurden in vier Gruppen eingeteilt: (1) *germline*: Keimbahnmutationen, überprüft bei genomAD (Broad Institute) (p.D287E); (2) *pathogenic somatic variant*: Mutationen, die die Polymerase Epsilon in ihrer Funktion einschränken (p.P286R, p.M295R, p.S297F, p.V411L, p.L424I, p.A456P und p.S459F) (Leon-Castillo et al., 2020a) (3) *non-pathogenic somatic variants*: Mutationen, die in anderen Studien beschrieben wurden, aber nicht als funktionseinschränkend gewertet wurden, da sie nicht zu einer Mutationsrate von >100/Mb führen (p.T278M, p.V474I, p.P476L, p.P476S, p.T457M) (Leon-Castillo et al., 2020a); (4) *somatic variants of unknown significance (VUS)*: gefundene Mutationen, die nicht als Keimbahnmutationen bekannt sind und in anderen Studien noch nicht beschrieben wurden (p.D462E and p.S421N). Als *POLEmut* klassifiziert wurden nur Fälle, die eine *pathogenic somatic variant* aufwiesen (Krämer et al., 2020).

In IGV wurde zusätzlich bewertet, in wie vielen und welchen der 3 Primersets die Alteration zu sehen ist. Als tatsächliche Mutation wurden die Alterationen gewertet, die sich in mindestens 2 der 3 Primersets zeigen ließen (Krämer et al., 2020).

2.4.4 MMR-Immunhistochemie

Auch zur Bestimmung des *MMR*-Status wurden Schnitte à 4 µm der erstellten TMAs angefertigt.

Zur Erstellung der Färbungen wurde eine DAKO Omnis Plattform mit den Färbungen zu den Markern MLH1 (H30-10M-30, Clone ES05 (DAKO)), PMS2 (H20-10R-20, Clone EP51 (DAKO)), MSH2 (H30-10M-30, Clone FE11 (DAKO)), MSH6 (H30-10R-30, Clone EP49 (DAKO)) verwendet (Krämer et al., 2020).

Auch hierfür wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mittels Scores codiert und je immunhistochemischer Färbung in die TMA Map

eingetragen. Waren Fälle auf mehreren TMAs repräsentiert, wurden auch hier alle verfügbaren Cores für die Auswertung berücksichtigt (Krämer et al., 2020).

Interpretiert wurde wie folgt:

	0	1	2	8	9	Interpretation
MMR	absent	present	subclonal loss	No internal control	Uninterpretable	1=intact 0,2=deficient

Tabelle 4 Legende zur Kodierung des TMA Scorings für die vier MMR-Marker gemäß Kobel et al., 2016 (Krämer et al., 2020).

Für die Evaluation des *MMRd*-Status wurde das Vier-Färbeschema mit MLH1, MLH2, PMS2 und MSH6 angewandt. Fehlten Daten zu MLH1 oder MSH2, wurde der *MMR*-Status anhand des Zwei-Färbe-Schema mit PMS2 und MSH6 bestimmt. Alle Fälle mit dem Verlust von mindestens einem MisMatch-Repair-Protein in mindestens einem Core wurden als *MMRd* klassifiziert (McConechy et al., 2015, Roth et al., 2016, Stelloo et al., 2017). (Krämer et al., 2020)

2.5 Bereinigung des Studienkollektivs

Zur Verifikation des histologischen Einschlusskriteriums „*endometrioides Ovarialkarzinom*“ und dem Ausschluss möglicher Fehldiagnosen wurden entsprechend Kobel et al., 2016 folgende Ausschlusskriterien festgelegt:

- *WT1 present* und *p53 abnormal*
- *WT1*-Status fehlend und *p53 abnormal*
- *WT1 present* und *p53*- Status fehlend
- *WT1*- und *p53*-Status fehlend

2.6 Molekulare Klassifikation

Die Zuordnung der Fälle zu den einzelnen molekularen Subtypen wurde gemäß des Algorithmus nach McAlpine et al., 2018 und Leon-Castillo et al., 2020b durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgt die Identifikation POLE mutierter Fälle, im zweiten Schritt die Festlegung der Fälle mit MisMatch-Repair-Deficiency und

zuletzt wurden die übrigen Fälle entsprechend ihres *p53*-Status in *p53abn* und *NSMP* differenziert (s. Abbildung 4). (Krämer et al., 2020)

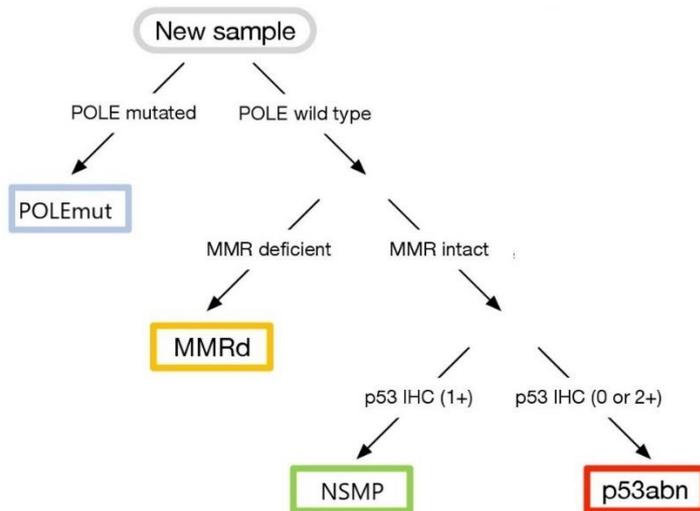


Abbildung 4 Klassifikationsalgorithmus für die Zuordnung der molekularen Subtypen. Abgewandelt aus McAlpine et al., 2018, Leon-Castillo et al., 2020b und Krämer et al., 2020.

2.7 Erhebung klinischer Daten des Studienkollektivs

Sämtliche Studienzentren erhielten eine Liste der benötigten klinischen Daten. Diese waren: Geburtsdatum, Alter bei Erstdiagnose, FIGO-Stadium, Grading, postoperativer Tumorrest, adjuvante Therapie, Zeitpunkt des letzten Follow-ups, Zeitpunkt des ersten Progresses/Rezidivs, Status beim letzten Follow-up und Todesursache. Die klinischen Daten des Studienkollektivs wurden von den jeweiligen Institutionen gesammelt, zentral zusammengeführt und wie folgt vereinheitlicht:

1. Alter bei Erstdiagnose: War das Alter bei Erstdiagnose nicht angegeben, wurde es aus Diagnosedatum und Geburtsdatum errechnet. War das Diagnosedatum nicht angegeben, wurde das OP-Datum verwendet. War nur das Jahr der Erstdiagnose angegeben, wurde der 30. Juni dieses Jahres angenommen.
2. FIGO-Stadium: Als *low-stage* wurden Karzinome bis einschließlich FIGO IIA betrachtet. Bei Karzinomen dieser Gruppe mit fehlender Angabe über den postoperativen Tumorrest wurde angenommen, dass bei diesen Patientinnen die Tumorreduktion makroskopisch vollständig erfolgt war. War bei entsprechenden

Patientinnen ein post-operativer Tumorrest beschrieben, wurde für diese Patientin in den Analysen ein fortgeschrittenes Stadium ohne weitere Spezifizierung (*advanced-stage NOS*) angenommen. Karzinome mit einem FIGO-Stadium >IIA wurden als *advanced-stage* bezeichnet. (Krämer et al., 2020).

3. Grading: Fälle, bei denen ein dedifferenziertes Grading angegeben wurde, wurden bei Analysen, die das Grading berücksichtigen, ausgeschlossen. (Krämer et al., 2020)

4. Resektionsstatus: Der postoperative Tumorrest wurde kategorisiert in Fälle ohne Anhalt für einen makroskopischen Tumorrest (*postoperativ makroskopisch tumorfrei*, „keiner“) und Fälle mit postoperativ nachweisbaren Tumorresiduen ($\geq 1\text{mm}$, „jeglicher“).

5. Adjuvante Therapie: Aufgrund der vielfältigen institutsspezifischen adjuvanten Therapieverfahren wurde bei der Datenerfassung lediglich erfasst, ob eine adjuvante Therapie durchgeführt wurde oder nicht. Auf eine detailliertere Analyse verschiedener Substanzklassen oder Dosierung wurde in dieser Doktorarbeit verzichtet.

Für die Tübinger Fälle wurden die Daten mittels retrospektiver Durchsicht der Krankenakte erhoben. Hierbei waren von besonderer Bedeutung: verfügbare Arztbriefe, Untersuchungsbefunde sowie pathologische Berichte.

2.8 Vergleich der Ergebnisse im endometrioiden Ovarialkarzinom mit denen im endometrioiden Endometriumkarzinom

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zum endometrioiden Ovarialkarzinom sollten mit einem repräsentativen Kollektiv endometrioider Endometriumkarzinome verglichen werden. Hierzu wurden entsprechende Daten aus drei bereits publizierten Arbeiten (Talhouk et al., 2015, Talhouk et al., 2017, Kommos et al., 2018) im Sinne einer Metaanalyse zusammengefasst. (Krämer et al., 2020)

2.9 Statistische Auswertung

Die Auswertungen wurden mittels der Statistiksoftware R (R Core Team, 2019), R Version 3.5.3 (2019-03-11) durchgeführt (Krämer et al., 2020).

Das Signifikanzniveau wurde auf <0.05 festgelegt. Es handelt sich um zweiseitige P-Werte. Für die univariaten Analysen von kategorischen Variablen wurden Chi Quadrat Tests, für kontinuierliche Variablen Welch-Tests angewendet. Kaplan-Maier-Analysen (Log-Rank-Tests (LRT)) wurden für Gesamtüberleben (OS), rezidiv-freies Überleben (PFS) und krankheitsspezifisches Überleben (DSS) durchgeführt. Das Coxsche Regressionsmodell wurde verwendet, um Zusammenhänge zwischen Überleben und den molekularen Subtypen beziehungsweise anderen klinischen Variablen zu eruieren. Dabei wurden Likelihood-Quotienten-Tests angewendet, um die statistische Signifikanz der einzelnen Kovariablen zu erhalten. Wurden mehr als 80% der Daten in einer der Kategorien einer Variable gecensored, wurde eine Firth-Bias-Korrektur vorgenommen. Konfidenzintervalle wurden mit Likelihood-Funktionen ermittelt. Dass nur Fälle mit komplettem Datensatz in den Modellen verwendet wurden, wurde durch list-wise deletion gewährleistet. (Krämer et al., 2020)

Für den Vergleich der Ergebnisse im ENOC und im EEC wurden zusammenfassende 5-Jahres-Überlebensraten berechnet und univariate- und multivariate Coxsche Regressionsmodelle erstellt. Da die Überlebensdaten der EC-Kohorten nach 5 Jahren zensiert wurden, wurden auch für das ENOC ein nach 5 Jahren zensiertes univariates Coxsches Regressionsmodell erstellt. Mittels Likelihood-Quotienten-Tests wurden je molekularem Subtyp die Hazard Ratios und klinisch-pathologischen Parameter Alter, Stadium (*low-stage* gegen *advanced-stage*) und Tumorigradung (Grade 1/2 gegen Grade 3) von allen EECs mit denen der ENOCs verglichen. *Low-stage* im EEC bedeutet FIGO Stage I und *advanced-stage* FIGO Stage II-IV (Talhouk et al., 2015, Talhouk et al., 2017, Kommoss et al., 2018). (Krämer et al., 2020)

3. Ergebnisse

3.1 Das Studienkollektiv

An dieser multizentrischen Studie haben neben dem Department für Frauengesundheit der Universitätsklinik Tübingen folgende Institutionen teilgenommen: die Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie der Kliniken Essen Mitte, die Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Heidelberg, die Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe Friedrichshafen des Medizin Campus Bodensee, das Department of Gynecological Oncology des Barts Health National Health Service Trust in London, United Kingdom (UK), das Department of Gynecology University Medical Centre in Leiden, Niederlande (NL), das Department of Obstetrics and Gynecology, University Medical Center Groningen, NL, die British Columbia's Gynecological Cancer Research Team (OVCARE) gynaecological tissue bank, in Vancouver, Kanada (CA), und die Canadian Ovarian Experimental Unified Resource (COEUR) (Le Page et al., 2018). Insgesamt standen n=604 Fälle zur Verfügung. (Krämer et al., 2020)

Die Zentren aus Tübingen, Friedrichshafen, Essen, OVCARE, COEUR und Heidelberg (Immunhistochemie) haben entsprechendes FFPE-Material zur zentralen Testung bereitgestellt (s. Tabelle 5), die Zentren in Leiden, Groningen, London und Heidelberg (POLE-Mutationstestung) entschieden sich dazu, die Analysen selbst vor Ort durchzuführen (dezentrale Testung, s. Tabelle 6).

Zentrale Testung

Zentrum	Bereitgestellte Proben	Durchzuführende Analysen	Anzahl der Fälle
Tübingen	FFPE-Blöcke	Immunhistochemische Analysen und POLE-Mutationstestung	87
Friedrichshafen	FFPE-Blöcke	Immunhistochemische Analysen und POLE-Mutationstestung	2
Essen	FFPE-Blöcke	Immunhistochemische Analysen und POLE-Mutationstestung	42
OVCARE	FFPE-Blöcke und TMAs (Triple Core)	Immunhistochemische Analysen und POLE-Mutationstestung	112
COEUR	TMA (Double Core), bereits extrahierte DNA	Immunhistochemische Analysen und POLE-Mutationstestung	183
Heidelberg	TMA (Hexa Core)	Immunhistochemische Analysen	42

Tabelle 5 Übersicht über die von den verschiedenen Institutionen zugesandten Materialien und die demnach auszuführenden zentralen Analysen.

Dezentrale Testung

Zentrum	Übermittelte Daten	Anzahl der Fälle
Heidelberg	POLE-Mutationsstatus	42 (s. Tabelle 5)
London/Leiden/ Groningen	WT1-, p53-, MMR-Immunhistochemie; POLE-Mutationsstatus	136

Tabelle 6 Übersicht über die von den verschiedenen Institutionen zugesandten Daten nach dezentraler Testung.

3.2 WT1- und p53-Immunhistochemie

Die immunhistochemische Analyse von p53 war bei n=600 Fällen erfolgreich, bei n=4 Fällen war sie nicht auswertbar. N=102 Fälle hatten ein abnormales p53-Färbemuster, n=498 eines, das einem Wildtyp entspricht (s. Tabelle 7).

Status	P53 N (%)
wildtype	498 (83%)
abnormal	102 (17%)
Fehlende	4
Total	604 (100%)

Tabelle 7 Ergebnisse der Immunhistochemie zu p53 zur Bereinigung des Studienkollektivs sowie zur späteren Klassifikation der molekularen Subtypen. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

Der WT1-Status konnte für n=566 Fälle bestimmt werden, in n=38 Fällen waren die Färbungen nicht auswertbar. N=83 erwiesen sich als *WT1 present*, n=438 als *WT1 absent* (s. Tabelle 8).

Status	WT1 N (%)
absent	483 (85%)
present	83 (15%)
Fehlende	38
Total	604 (100%)

Tabelle 8 Ergebnisse der Immunhistochemie zu WT1 zur Bereinigung des Studienkollektivs.

Bezüglich der zentralen Verifikation des histologischen Einschlusskriteriums waren unter den n=604 Fällen insgesamt n=42 Fälle, deren immunhistochemischer Phänotyp sich nicht unmittelbar mit einer endometrioiden Histologie vereinbaren ließ (s. Abbildung 5). N=36 dieser Fälle zeigten in der Immunhistochemischen Auswertung eine Kombination aus *WT1 present* und *p53 abnormal*, bei n=4 Fällen mit *p53 abnormal* fehlte der *WT1* Status und bei n=2 fehlten sowohl der *WT1* als auch der *p53*-Status. Damit standen abschließend n=562 Fälle zur *POLE*-Mutationsanalyse und *MMR*-Immunhistochemie zur Verfügung (s. Abbildung 5).

Gesamtkollektiv

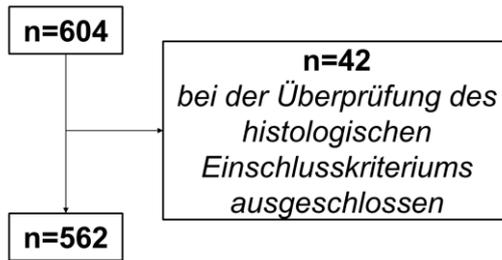


Abbildung 5 Übersicht über die Ergebnisse zur Überprüfung des histologischen Einschlusskriteriums mittels WT1- und p53-Testung.

3.3 POLE-Mutationsanalyse

3.3.1 POLE - Zentrale Testung

Für die zentrale POLE Mutationstestung wurde Tumormaterial von insgesamt 397 Fällen zur Verfügung gestellt. Die Testung konnte in 355 Fällen erfolgreich durchgeführt werden (s. auch Abbildung 6). Als pathologisch einzustufende POLE Mutationen wurden in n=12/355 Fällen identifiziert. Gefundene Mutationen waren p.P286R, p.V411L und p.S459F. Des Weiteren fanden wir zwei *Somatic variants of unknown significance (VUS)* (p.S421N, p.D462E), zwei *germline* Mutationen (p.D287E) und sechs verschiedene *Non-pathogenic somatic variants*. Die durchschnittliche Anzahl der Reads der drei entsprechenden Amplikons war an allen Mutationsstellen > 1700 (s. Tabelle 9). (Krämer et al., 2020)

Patient ID	ID Pauline	Basenaustausch	Aminosäure	Exon	Alterationstyp	Durchschnittl. Anzahl der Reads der drei Amplikons	Variante frequency
144	NA	c.1376C>T	p.S459F	14	Pathogenic somatic variants	28512	0.5
279	NA	c.857C>G	p.P286R	9	Pathogenic somatic variants	8514	0.395
351	NA	c.857C>G	p.P286R	9	Pathogenic somatic variants	4484	0.21
358	NA	c.857C>G	p.P286R	9	Pathogenic somatic variants	5485	0.122
374	NA	c.1231G>C	p.V411L	13	Pathogenic somatic variants	5485	0.445
457	NA	c.857C>G	p.P286R	9	Pathogenic somatic variants	11173	0.312
523	p118	c.861T>A	p.D287E	9	Germline	5995	0.503
523	p118	c.833C>T	p.T278M	9	Non-pathogenic somatic variants	5808	0.424
523	p118	c.1370C>T	p.T457M	14	Non-pathogenic somatic variants	5626	0.441
523	p118	c.1420G>A	p.V474I	14	Non-pathogenic somatic variants	5626	0.375
524	p119	c.1231G>T	p.V411L	13	Pathogenic somatic variants	6091	0.415
1529	NA	c.861T>A	p.D462E	14	Somatic variants of unknown significance (VUS)	7977	0.354
1568	NA	c.1231G>C	p.V411L	13	Pathogenic somatic variants	5267	0.194
1578	NA	c.857C>G	p.P286R	9	Pathogenic somatic variants	6879	0.16
1594	NA	c.1427C>T	p.P476L	14	Non-pathogenic somatic variants	5022	0.093
1594	NA	c.1426C>T	p.P476S	14	Non-pathogenic somatic variants	5022	0.212
1710	p022	c.833C>T	p.T278M	9	Non-pathogenic somatic variants	6328	0.183
1714	p026	c.857C>G	p.P286R	9	Pathogenic somatic variants	6265	0.234
1715	p027	c.1231G>T	p.V411L	13	Pathogenic somatic variants	5718	0.206
1717	p029	c.1376C>T	p.S459F	14	Pathogenic somatic variants	1729	0.254
1728	p040	c.861T>A	p.D287E	9	Germline	14511	0.3
1764	p076	c.1262G>A	p.S421N	13	Somatic variants of unknown significance (VUS)	7197	0.091

Tabelle 9 Übersicht der gefundenen POLE Mutationen in den zentralen Analysen (inklusive der Fälle aus Tabelle 11). Patient ID bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID in der für diese Studie angelegten Datenbank. ID Pauline bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID im Tübinger, Essener und Friedrichshafener Kollektiv. NA bedeutet, dass dieser Fall nicht aus dem Subkollektiv der Tübinger, Essener und Friedrichshafener Fälle stammt. Basenaustausch bezeichnet die ausgetauschte Base entsprechend der Nomenklatur der Human Genome Variation Society. Aminosäure bezeichnet die ausgetauschte Aminosäure entsprechend der Nomenklatur der Human Genome Variation Society. Exon bezeichnet das entsprechende Exon auf Chromosom 12.

Alterationstyp beschreibt die Relevanz der entsprechenden Alteration gemäß der Festlegung der POLE mutierten Fälle (S.18). Durchschnittl. Anzahl der Reads der drei Amplikons bezeichnet den Durchschnitt der Anzahl der Reads der drei Primersets pro Fall. Die Variant frequency beschreibt das Verhältnis der als Alteration angegebenen Base zu den anderen vorkommenden Basen an dieser Position. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

Exemplarisch sind im Folgenden die von der Doktorandin selbst durchgeführten Arbeiten dargestellt (n=106 Fälle; Tübingen/Essen/Friedrichshafen):

DNA-Extraktion

Durchschnittlich lag die Konzentration der extrahierten DNA der n=106 Fälle bei 164,9 ng/µl. Die geringste lag bei 7,7 ng/µl und die höchste bei 616,0 ng/µl (s. Tabelle 10).

Patient ID	ID Pauline	Kollektiv	DNA-Konzentration (ng/µl)	Patient ID	ID Pauline	Kollektiv	DNA-Konzentration (ng/µl)
1689	p001	Tübingen	40.4	1753	p065	Tübingen	190.0
1690	p002	Tübingen	270.0	1754	p066	Tübingen	188.0
1691	p003	Tübingen	90.6	1756	p068	Tübingen	166.0
1692	p004	Tübingen	144.0	1757	p069	Tübingen	21.6
1693	p005	Tübingen	326.0	1758	p070	Tübingen	242.0
1694	p006	Tübingen	101.0	1760	p072	Tübingen	192.0
1696	p008	Tübingen	29.6	1762	p074	Tübingen	316.0
1697	p009	Tübingen	65.8	1763	p075	Tübingen	172.0
1698	p010	Tübingen	65.8	1764	p076	Tübingen	49.6
1699	p011	Tübingen	113.0	1765	p077	Tübingen	139.0
1701	p013	Tübingen	106.0	1766	p078	Tübingen	79.0
1702	p014	Tübingen	85.2	1767	p079	Tübingen	334.0
1703	p015	Tübingen	7.7	1768	p080	Tübingen	228.0
1706	p018	Tübingen	90.4	1770	p082	Tübingen	206.0
1709	p021	Tübingen	85.2	536	p083	Friedrichshafen	106.0
1710	p022	Tübingen	61.6	537	p084	Friedrichshafen	312.0
1712	p024	Tübingen	67.0	494	p085	Essen	166.0
1713	p025	Tübingen	45.8	495	p086	Essen	155.0
1714	p026	Tübingen	95.2	496	p087	Essen	412.0
1715	p027	Tübingen	63.0	497	p088	Essen	127.0
1716	p028	Tübingen	125.0	498	p089	Essen	394.0
1717	p029	Tübingen	72.8	499	p090	Essen	210.0
1718	p030	Tübingen	67.6	501	p092	Essen	232.0
1719	p031	Tübingen	72.0	502	p093	Essen	358.0

Patient ID	ID Pauline	Kollektiv	DNA-Konzentration (ng/μl)	Patient ID	ID Pauline	Kollektiv	DNA-Konzentration (ng/μl)
1720	p032	Tübingen	57.0	504	p095	Essen	616.0
1721	p033	Tübingen	62.8	505	p096	Essen	222.0
1722	p034	Tübingen	22.6	506	p097	Essen	154.0
1723	p035	Tübingen	37.4	507	p098	Essen	36.0
1724	p036	Tübingen	41.2	508	p099	Essen	162.0
1725	p037	Tübingen	208.0	509	p100	Essen	195.0
1726	p038	Tübingen	195.0	510	p101	Essen	175.0
1728	p040	Tübingen	80.8	511	p103	Essen	362.0
1729	p041	Tübingen	56.6	512	p104	Essen	312.0
1730	p042	Tübingen	270.0	514	p106	Essen	226.0
1732	p044	Tübingen	52.0	515	p107	Essen	185.0
1733	p045	Tübingen	114.0	519	p114	Essen	242.0
1734	p046	Tübingen	43.2	520	p115	Essen	316.0
1735	p047	Tübingen	80.2	522	p117	Essen	426.0
1736	p048	Tübingen	106.0	523	p118	Essen	274.0
1737	p049	Tübingen	85.6	524	p119	Essen	436.0
1738	p050	Tübingen	182.0	525	p120	Essen	48.8
1739	p051	Tübingen	234.0	527	p122	Essen	199.0
1740	p052	Tübingen	426.0	528	p123	Essen	39.6
1741	p053	Tübingen	143.0	529	p124	Essen	18.1
1742	p054	Tübingen	266.0	530	p125	Essen	25.4
1744	p056	Tübingen	242.0	531	p126	Essen	282.0
1745	p057	Tübingen	101.0	532	p127	Essen	159.0
1746	p058	Tübingen	132.0	533	p128	Essen	84.2
1747	p059	Tübingen	156.0	534	p129	Essen	216.0
1748	p060	Tübingen	73.2	535	p130	Essen	120.0
1749	p061	Tübingen	49.4	1771	p131	Tübingen	169.0
1751	p063	Tübingen	39.6	1772	p132	Tübingen	258.0
1752	p064	Tübingen	384.0	1774	p134	Tübingen	298.0

Tabelle 10 DNA-Konzentration der extrahierten DNA der Tübinger, Essener und Friedrichshafener Fälle in ng/μl. Patient ID bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID in der für diese Studie angelegten Datenbank. ID Pauline bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID im Tübinger, Essener und Friedrichshafener Kollektiv.

Amplifikation der zu sequenzierenden Exons

Nach der ersten Amplifikationsrunde musste für jeweils ein Primerset von Exon 9 p013, p025, p026, p080, p089, p092 und 2 Primersets von p056 wiederholt werden sowie die komplette Platte von p097-p0134 wegen einer positiven Negativkontrolle.

Für Exon 13 musste keine der Proben wiederholt werden, für Exon 14 jeweils ein Primersets für p011, p013 und p122.

In der Wiederholungs-qPCR schlug nur eines der Primersets von Exon 14 des Falls p011 fehl. Dieser war im Folgenden für Exon 14 nur durch 2 Primersets repräsentiert.

Vorbereitung der Amplikons für die Miseq (Barcoding)

Keine der Barcoding PCRs musste wiederholt werden.

Auswertung der Miseq

Die zusammengeführte Excel-Datei mit potentiellen Alterationen für die Tübinger, Essener und Friedrichshafener Fälle umfasste 432 Zeilen. Für die Mehrzahl der n=106 Fälle zeigte die MiSeq Software mehrere Alterationen an.

Nachdem *LowGQX*, *Low Genotype Quality*, *silent* und *synonymous* Mutationen ausgeschlossen waren, blieben noch 238 Stellen mit möglichen Alterationen übrig. Bei 208 dieser Stellen handelte es sich um Stellen innerhalb der Primer. Auch diese wurden ausgeschlossen. Bei einer Stelle handelt es sich um die letzte im Exon. Auch diese wird ausgeschlossen.

Ausschluss von Fails im Miseq Run

In IGV zeigten sich n=3 (p011, p031, p068) der Tübinger, Essener und Friedrichshafener Fälle als nicht ausreichend repräsentiert. Diese wurden als Fails betrachtet und ausgeschlossen. In n=2 dieser Fälle hatten sich drei der 29 Alterationen befunden.

Festlegung der POLE mutierten Fälle

Von den übrigen 26 Stellen waren 16 unter den in *Festlegung der POLE mutierten Fälle* (S.18) angegebenen Alterationen. Diese 16 Alterationen befanden sich in n=11 Fällen. Fünf der Alterationen zeigten sich in IGV entweder nur in einem oder in keinem der drei Primersets und wurden deshalb als *POLE wildtype* eingestuft (grau hinterlegt in Tabelle 11). Für die übrigen 11 Alterationen

war die Sequenzierung von mindesten 2 Primersets jeweils vor- und rückwärts erfolgreich und es zeigten sich in mindestens 4/4 bzw. 4/6 Sequenzen und somit in mindestens 2/3 Primersets die Alteration. Diese wurden so entsprechend *Festlegung der POLE mutierten Fälle (S.18)* in *pathogenic somatic variant*, *Somatic variants of unknown significance (VUS)*, *germline* und *Non-pathogenic somatic variants* eingeteilt (s. Alterationstyp in Tabelle 11).

Patient ID	ID Pauline	Kollektiv	Chromosom	Position	Mutations-typ	Aminosäure	Überprüfung IGV (x/y)		Alterationstyp
1710	p022	Tübingen	chr12	133253208	Missense	T278M	4/6	Primerset (1),(3)	somatic, non-pathogenic
1714	p026	Tübingen	chr12	133253184	Missense	P286R	6/6	alle	pathogenic somatic variant
1715	p027	Tübingen	chr12	133249856	Missense	A456V	0/6	keines	Wildtype
1715	p027	Tübingen	chr12	133249839	Missense	D462N	2/6	Primerset (1)	Wildtype
1715	p027	Tübingen	chr12	133250289	Missense	V411L	4/6	Primerset (2),(3)	pathogenic somatic variant
1717	p029	Tübingen	chr12	133249847	Missense	S459F	6/6	alle	pathogenic somatic variant
1720	p032	Tübingen	chr12	133253208	Missense	T278M	2/5	Primerset (1)	Wildtype
1726	p038	Tübingen	chr12	133253208	Missense	T278M	2/5	Primerset (1)	Wildtype
1728	p040	Tübingen	chr12	133253180	Missense	D287E	6/6	alle	Germline
1763	p075	Tübingen	chr12	133249796	Missense	P476L	2/6	Primerset (1)	Wildtype
1764	p076	Tübingen	chr12	133250258	Missense	S421N	4/6	Primerset (1),(2)	pathogenic somatic variant
523	p118	Essen	chr12	133253180	Missense	D287E	6/6	alle	somatic, non-pathogenic
523	p118	Essen	chr12	133253208	Missense	T278M	4/5	Primerset (1),(3)	somatic, non-pathogenic
523	p118	Essen	chr12	133249853	Missense	T457M	6/6	alle	somatic, non-pathogenic
523	p118	Essen	chr12	133249803	Missense	V474I	6/6	alle	somatic, non-pathogenic
524	p119	Essen	chr12	133250289	Missense	V411L	6/6	alle	pathogenic somatic variant

Tabelle 11 Gesuchte POLE Alterationen im Tübinger, Essener und Friedrichshafener Kollektiv. Patient ID bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID in der für diese Studie angelegten Datenbank. ID Pauline bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID im Tübinger, Essener und Friedrichshafener Kollektiv. Position beschreibt die Position der Basenalteration bezogen auf das Referenzgenom. Überprüfung IGV beschreibt von wie vielen der 3 Primerpaare (3x vorwärts und rückwärts) die Sequenzierung funktioniert hat (y) und in wie vielen von eben diesen die entsprechende Alteration in IGV zu sehen war (x) und in welchen Primersets. Alterationstyp beschreibt die Relevanz der entsprechenden Alteration gemäß der Festlegung der POLE mutierten Fälle (S.18). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

3.3.2 POLE - Dezentrale Testung

Im Kollektiv der n=165 dezentral getesteten Fälle wurde in n=6 Fällen für POLE eine *pathogenic somatic variant* nachgewiesen (s. Tabelle 12). Das Mutationsspektrum umfasste die Aminosäuren p.P286R und p.V411L. Außerdem fand sich eine *germline* Mutation (p.D287E). (Krämer et al., 2020)

Patient ID	Basenaustausch	Aminosäure	Exon	Alterationstyp
14	c.857C>G	p.P286R	9	Pathogenic somatic variants
1455	c.1231G>C	p.V411L	13	Pathogenic somatic variants
1464	c.861T>A	p.D287E	9	Germline
1487	c.857C>G	p.P286R	9	Pathogenic somatic variants
1796	c.1231G>T	p.V411L	13	Pathogenic somatic variants
1798	c.857C>G	p.P286R	9	Pathogenic somatic variants
1800	c.857C>G	p.P286R	9	Pathogenic somatic variants

Tabelle 12 Übersicht der dezentral gefundenen *POLE*-Mutationen. Patient ID bezeichnet eine eindeutig zuordenbare ID in der für diese Studie angelegten Datenbank. Basenaustausch bezeichnet die ausgetauschte Base entsprechend der Nomenklatur der Human Genome Variation Society. Aminosäure bezeichnet die ausgetauschte Aminosäure entsprechend der Nomenklatur der Human Genome Variation Society. Exon bezeichnet das entsprechende Exon auf Chromosom 12. Alterationstyp beschreibt die Relevanz der entsprechenden Alteration gemäß der Festlegung der *POLE* mutierten Fälle (S.18). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

3.3.3 *POLE* - Gesamtkollektiv

Zusammenfassend konnte im Gesamtkollektiv der *POLE*-Mutationsstatus für n=520 Fälle ermittelt werden (s. Abbildung 6). Insgesamt wurden n=18/520 Fälle (3,5%) als *POLEmut* klassifiziert (s. Tabelle 9 und Tabelle 12). (Krämer et al., 2020)

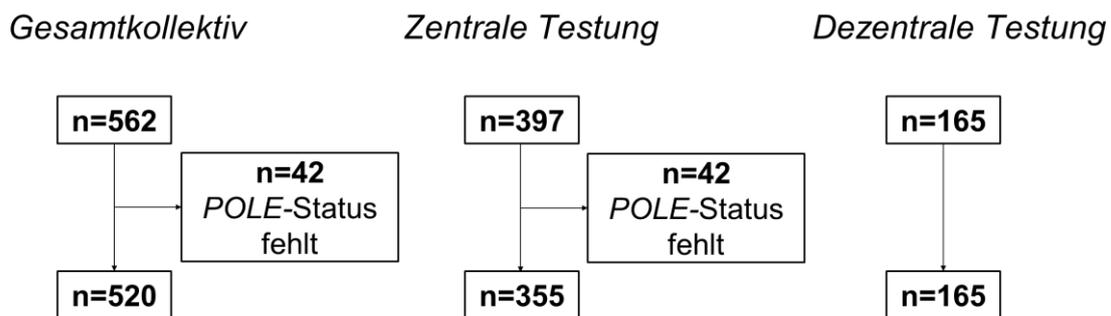


Abbildung 6 Übersicht über die Größe des Studienkollektivs nach Ausschluss der bei der *POLE*-Mutationsanalyse nicht auswertbaren Fälle.

3.4 MMR-Immunhistochemie

3.4.1 MMR - Zentrale Testung

Die zentrale Testung der MMR-Immunhistochemie umfasste n=387 Fälle. Bei n=8 dieser Fälle ließ sich der MMR-Status nicht bestimmen. Ein

immunhistochemischer Verlust von mindestens einem der vier Mismatch-Repair-Proteine ließ sich in n=53 der übrigen n=379 Fälle nachweisen (s. Tabelle 13).

Status	MLH1 N (%)	MSH2 N (%)	MSH6 N (%)	PMS2 N (%)	Status	MMR N (%)
Absent	24 (6%)	11 (3%)	26 (7%)	24 (6%)	Deficient	53 (14%)
Present	349 (94%)	372 (97%)	357 (93%)	357 (94%)	Intact	326 (86%)
Missing	14	4	4	6	Missing	8
Total	387 (100%)	387 (100%)	387 (100%)	387 (100%)	Total	387 (100%)

Tabelle 13 Ergebnisse der zentral durchgeführten Immunhistochemie zu den vier Mismatch-Repair-Proteinen. Der MMR Status in der letzten Zeile fasst die Daten der einzelnen Marker entsprechend Tabelle 4 zusammen. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

3.4.2 MMR - Dezentrale Testung

Aus der dezentralen Testung wurden uns die Ergebnisse von n=133 Fälle übermittelt. Davon wurden n=17 Fälle als *MMRd* klassifiziert (s. Tabelle 14 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Status	MLH1 N (%)	MSH2 N (%)	MSH6 N (%)	PMS2 N (%)	Status	MMR N (%)
Absent	5 (5%)	NA	4 (3%)	13 (10%)	Deficient	17 (13%)
Present	96 (95%)	NA	129 (97%)	120 (90%)	Intact	116 (87%)
Missing	32	NA	0	0	Missing	0
Total	133 (100%)	NA	133 (100%)	133 (100%)	Total	133 (100%)

Tabelle 14 Ergebnisse der dezentral durchgeführten Immunhistochemie zu den vier Mismatch-Repair-Proteinen. Der MMR-Status in der letzten Zeile fasst die Daten der einzelnen Marker entsprechend Tabelle 4 zusammen. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

3.4.3 MMR - Gesamtkollektiv

Zusammenfassend ließ sich der *MMR*-Status im Gesamtkollektiv bei n=512 Fälle bestimmen (s. Abbildung 7). Insgesamt erwiesen sich n=70/512 Fälle (13,7%) als Mismatch-Repair-deficient (s. Tabelle 13 und Tabelle 14). (Krämer et al., 2020)

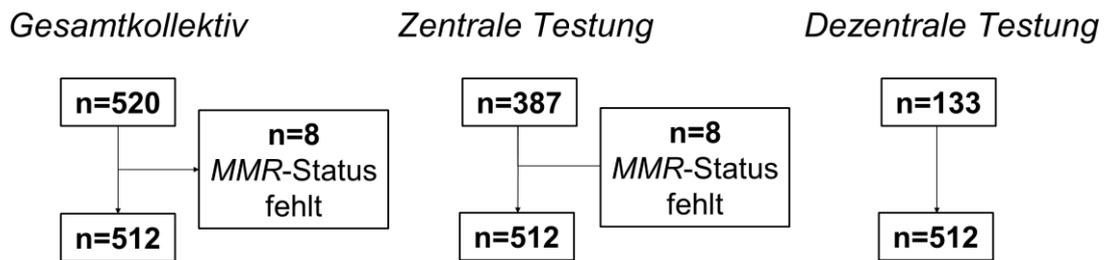


Abbildung 7 Übersicht über die Größe des Studienkollektivs nach Ausschluss der bei der MMR-Immunhistochemie nicht auswertbaren Fälle.

3.5 Molekulare Klassifikation

Abschließend standen für n=511 Fälle die vollständigen Daten zur molekularen Klassifikation zur Verfügung (s. Abbildung 8). Nach Anwendung des unter 2.6 erläuterten Algorithmus wurden n=18 (3,5%) dieser n=511 Fälle als *POLEmut* klassifiziert, n=70 Fälle (13,7%) als *MMRd*, n=49 Fälle (9,6%) als *p53abn* und 374 Fälle (73,2%) als *NSMP* (s. Abbildung 8). (Krämer et al., 2020)

Keiner der als *POLEmut* klassifizierten Fälle war Mismatch-Repair-deficient, noch hatte einer ein mutiertes/abnormales p53-Färbemuster. Acht der Fälle mit Mismatch-Repair-Deficiency hatten zusätzlich ein abnormales p53-Färbemuster, wurden aber entsprechend des Klassifikationsalgorithmus als *MMRd* klassifiziert. (Krämer et al., 2020)

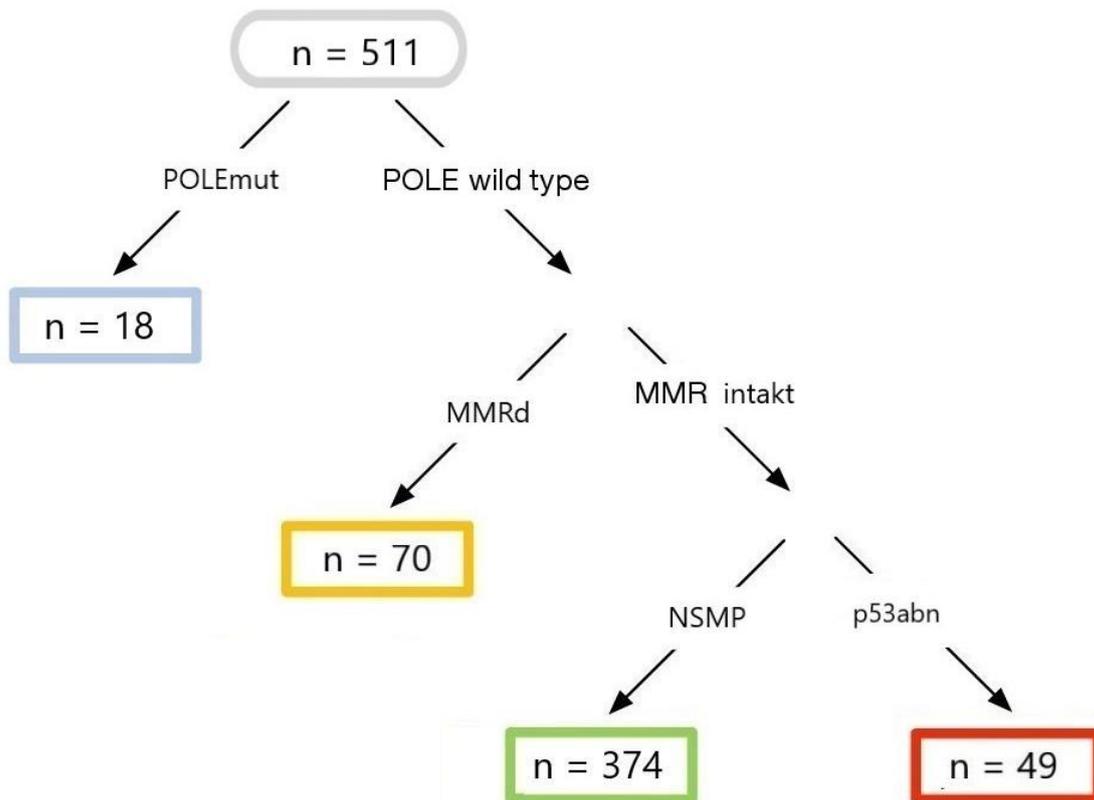


Abbildung 8 Ergebnis und Algorithmus der Zuordnung der endometrioiden Ovarialkarzinome in die vier molekularen Subtypen. Abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

3.6 Klinische Charakteristika des Studienkollektivs

48% der Fälle kamen aus Kanada, 52% aus Europa. Die Erstdiagnosen der Patientinnen wurden zwischen 1985 und 2018 gestellt. Medianes Follow-up für das Gesamtüberleben betrug 5,34 Jahre (reverse Kaplan-Meier). Das durchschnittliche Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose in diesem Kollektiv lag bei 57 Jahren (s. Tabelle 15). N=43 Patientinnen (8,4%) waren bei Erstdiagnose unter 40 Jahre oder jünger, n=321 (63%) unter 60 Jahre alt. 57% der Patientinnen hatte bei Diagnose ein FIGO Stadium IIA oder kleiner (*low-stage*), 81% der Karzinome waren gut differenziert (G1/2) und 86% hatten keinen post-operativen Tumorrest. Die Rate an adjuvanter Therapie lag bei 72% (s. Tabelle 15). (Krämer et al., 2020)

Bezüglich der klinischen und pathologischen Charakteristika gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fällen aus Europa und Kanada (s. Tabelle 15) (Krämer et al., 2020).

Variable	Level	Kanada	Europa	Gesamtzahl	p-Wert
Gesamtzahl	N (%)	246 (48%)	265 (52%)	511 (100%)	
Alter bei Diagnose	Mittelwert (sd)	56 (12)	57 (13)	57 (13)	0.332
	Median (IQR)	55 (48 - 64)	56 (47 - 67)	55 (48 - 66)	
	Fehlende	2	0	2	
Stadium	Low	143 (61%)	135 (53%)	278 (57%)	0.082
	Advanced	90 (39%)	119 (47%)	209 (43%)	
	Fehlende	13	11	24	
FIGO Stadium	I	137 (59%)	134 (53%)	271 (56%)	0.111
	II	53 (23%)	68 (27%)	121 (25%)	
	III	38 (16%)	37 (15%)	75 (15%)	
	IV	5 (2%)	15 (6%)	20 (4%)	
	Fehlende	13	11	24	
Grade	Grade 1	106 (46%)	125 (47%)	231 (47%)	0.397
	Grade 2	85 (37%)	83 (31%)	168 (34%)	
	Grade 3	41 (18%)	56 (21%)	97 (20%)	
	Fehlende	14	1	15	
Postoperativer Tumorrest	keiner	193 (88%)	202 (85%)	395 (86%)	0.392
	jeglicher	27 (12%)	37 (15%)	64 (14%)	
	Fehlende	26	26	52	
Adjuvante Therapie	nein	60 (27%)	70 (28%)	130 (28%)	0.899
	ja	160 (73%)	178 (72%)	338 (72%)	
	Fehlende	26	17	43	

Tabelle 15 Univariate Analyse der Unterschiede klinisch-pathologischer Charakteristika zwischen kanadischen und europäischen Fällen. Beim Mittelwert ist in Klammer die Standardabweichung (sd) mit angegeben, beim Median der Interquartilsabstand (IQR). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

3.7 Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter und der molekularen Subtypen

In der univariaten Analyse zwischen den molekularen Subtypen und klinisch-pathologischen Variablen zeigen sich signifikante Zusammenhänge zwischen den molekularen Subtypen und Alter ($p < 0,001$), FIGO Stadium ($p = 0,002$), Tumorgrading ($p < 0,001$), postoperativem Tumorrest ($p = 0,010$) und adjuvanter Therapie ($p = 0,040$) (s. Tabelle 16). (Krämer et al., 2020)

Patientinnen mit Karzinomen vom *POLEmut*-Subtyp waren mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 47 Jahren tendenziell jünger, hatten bei Diagnose ein früheres FIGO Stadium, einen höheren Differenzierungsgrad, es konnte häufiger eine komplette Tumorresektion erfolgen, und sie erhielten seltener adjuvante Therapie (s. Tabelle 16). (Krämer et al., 2020)

Ein *p53abn*-Färbemuster in der Immunhistochemie des Tumors korrelierte hingegen mit einem höheren Erkrankungsalter (Mittelwert: 57 Jahre), einem fortgeschrittenerem Tumorstadium (57% FIGO IIA oder höher), einem geringeren Differenzierungsgrad und der höchsten Wahrscheinlichkeit, nicht vollständig reseziert zu werden (29%). Darüber hinaus erhielten Patientinnen mit einem Karzinom mit abnormalem p53-Färbemuster oder einer MisMatch-Repair-Deficiency am häufigsten eine adjuvante Therapie (83%) (s. Tabelle 16). (Krämer et al., 2020)

Patientinnen mit Karzinomen vom *MMRd*- und *NSMP*-Subtyp zeigten in den klinischen Parametern nur geringe Unterschiede. Während Patientinnen mit Karzinomen vom *MMRd*-Subtyp bei Diagnose etwas jünger waren als die mit einem Karzinom vom *NSMP*-Subtyp (55 vs. 58 Jahre), korrelierte eine MisMatch-Repair-Deficiency häufiger mit einem schon fortgeschrittenen FIGO Stadium (58% vs. 38%) und einem geringeren Differenzierungsgrad (Grade 3: 25% vs. 16%) (s. Tabelle 16). Die vollständige Tumorresektionsrate der beiden Gruppen war vergleichbar (88 bzw. 86%) (s. Tabelle 16). Die Rate an adjuvanter Therapie von Patientinnen, die keinen der molekularen Marker aufwiesen, war mit 69% näher an der von Patientinnen, deren Karzinom eine *POLE*-Mutation aufwies, als an der von Patientinnen mit *p53abn*- und *MMRd*-Karzinomen (je 83%) (s. Tabelle 16). (Krämer et al., 2020)

Variable	Level	NSMP	p53abn	POLEmut	MMRd	Gesamtzahl	p-Wert
Gesamtzahl	N (%)	374 (73%)	49 (10%)	18 (4%)	70 (14%)	511 (100%)	
Alter bei Diagnose	Mittelwert (sd)	58 (13)	57 (13)	47 (10)	55 (13)	57 (13)	<0.001
	Median (IQR)	56 (49 – 67)	57 (48 – 67)	45 (42 – 48)	53 (46 – 62)	55 (48 – 66)	
	Fehlende	2	0	0	0	2	
FIGO-Stadium	Low	219 (62%)	20 (43%)	11 (61%)	28 (42%)	278 (57%)	0.003
	Advanced	136 (38%)	27 (57%)	7 (39%)	39 (58%)	209 (43%)	
	Fehlende	19	2	0	3	24	
Grade	Grade 1	191 (52%)	7 (15%)	10 (56%)	23 (34%)	231 (47%)	<0.001
	Grade 2	116 (32%)	19 (41%)	5 (28%)	28 (41%)	168 (34%)	
	Grade 3	57 (16%)	20 (43%)	3 (17%)	17 (25%)	97 (20%)	
	Fehlende	10	3	0	2	15	
Postoperativer Tumorrest	keiner	290 (88%)	34 (71%)	17 (94%)	54 (86%)	395 (86%)	0.010
	jeglicher	40 (12%)	14 (29%)	1 (6%)	9 (14%)	64 (14%)	
	Fehlende	44	1	0	7	52	
Adjuvante Therapie	ja	105 (31%)	8 (17%)	6 (33%)	11 (17%)	130 (28%)	0.040
	nein	234 (69%)	39 (83%)	12 (67%)	53 (83%)	338 (72%)	
	Fehlende	35	2	0	6	43	

Tabelle 16 Univariate Analyse zwischen molekularen Subtypen und klinisch-pathologischen Variablen. Beim Mittelwert ist in Klammer die Standardabweichung (sd) mit angegeben, beim Median der Interquartilsabstand (IQR). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

3.8 Prognostische Bedeutung der molekularen Klassifikation endometrioider Ovarialkarzinome

Die Patientinnen mit endometrioidem Ovarialkarzinom zeigen in Abhängigkeit von ihrem molekularen Subtyp ein signifikant unterschiedliches Gesamt (OS)-, krankheitsspezifisches (DSS)- und rezidiv-freies (PFS) 10-Jahres-Überleben ($p < 0,001$, s. Abbildung 9). Während Patientinnen mit Karzinomen vom *POLEmut*-Subtyp weder ein Rezidiv erleiden noch krankheitsbedingt versterben (s. Abbildung 9 und Tabelle 17), haben *p53abn*-Patientinnen eine krankheitsspezifische 10-Jahres-Überlebensrate von 39% (s. Tabelle 17). Patientinnen mit Karzinomen vom *MMRd*- und *NSMP*-Subtyp haben ähnlich

moderate 10-Jahresüberlebensraten (s. Tabelle 17). Entsprechend verhält es sich mit den Hazard Ratios (s. Tabelle 17). (Krämer et al., 2020)

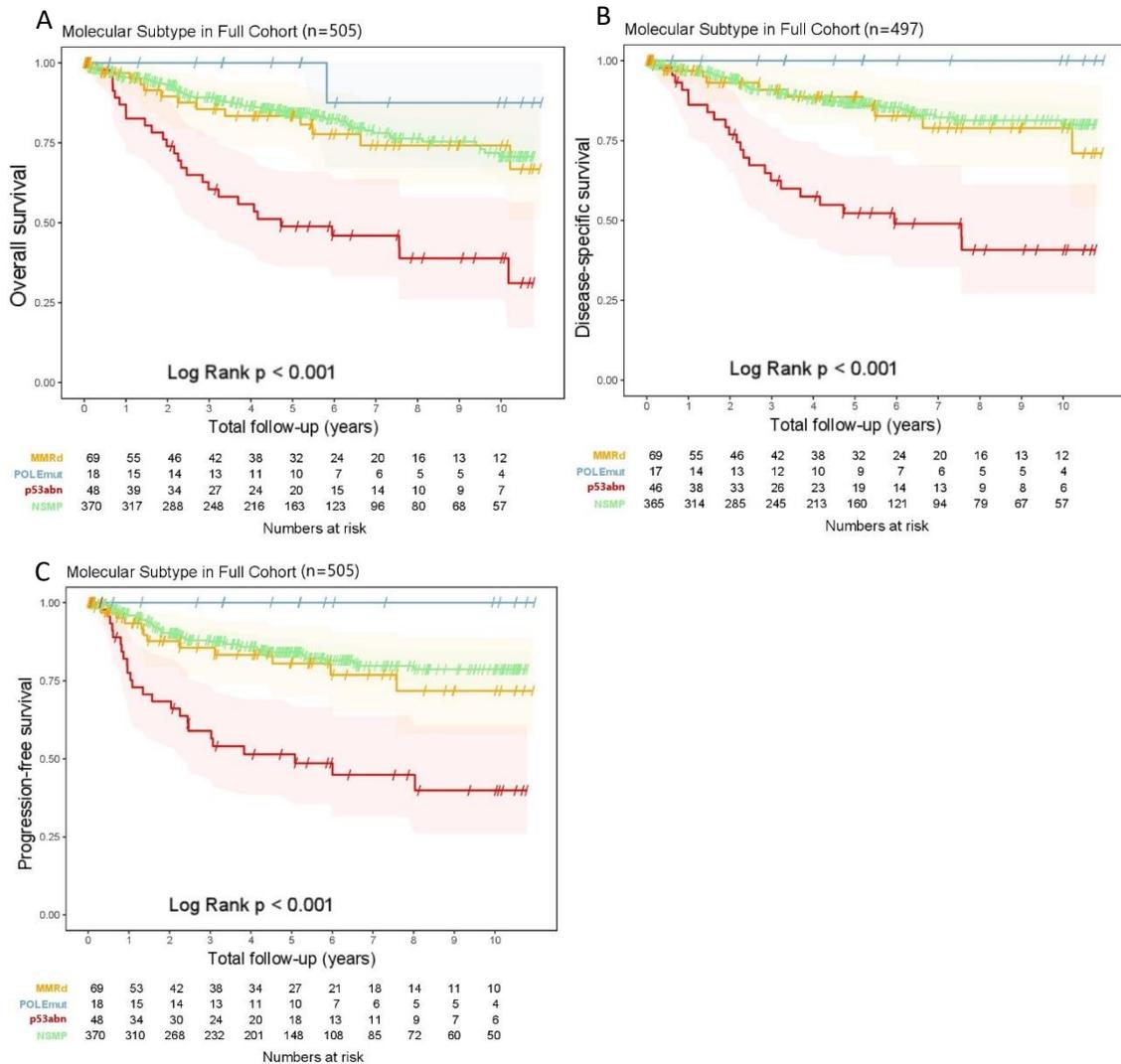


Abbildung 9 (A) Gesamt (Overall survival)-, (B) krankheitsspezifisches (Disease-specific survival)- und (C) rezidiv-freies (Progression-free survival) Überleben (Kaplan-Meier-Analyse) von Patientinnen mit endometrioidem Ovarialkarzinom aller FIGO Stadien (Full Cohort) in Abhängigkeit ihres molekularen Subtyps. In Gelb sind die Patientinnen mit Karzinomen des MMRd Typs, in Blau des POLEmut Typs, in Rot des p53abn Typs und in Grün des NSMP Typs abgebildet. Unterhalb des Graphen sind die Fallzahlen (Numbers at risk) im jeweiligen Jahr nach Diagnose (Total follow-up (years)) angegeben. Abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

10-Jahres Überlebensraten		OS		DSS		PFS	
NSMP		(n=370) 0.707		(n=364) 0.798		(n=357) 0.784	
p53abn		(n=48) 0.389		(n=45) 0.39		(n=46) 0.393	
POLEmut		(n=18) 0.875		(n=17) 1		(n=18) 1	
MMRd		(n=69) 0.742		(n=67) 0.777		(n=68) 0.716	
Gesamtkohorte		(n=505) 0.68		(n=493) 0.754		(n=489) 0.739	
Hazard ratios (95% CI)		OS	LRT	DSS	LRT	PFS	LRT
Anzahl an events / n		104 / 505	p-Wert	80 / 497	p-Wert	90 / 505	p-Wert
Vergleichs- gruppe: NSMP	p53abn	3.56 (2.24-5.5) ^F	< 0.001	4.2 (2.52-6.81) ^F	< 0.001	3.98 (2.43-6.33) ^F	< 0.001
	POLEmut	0.45 (0.05-1.66) ^F		0.22 (0-NA) ^F		0.17 (0-NA) ^F	
	MMRd	1.2 (0.64-2.09) ^F		1.25 (0.6-2.34) ^F		1.35 (0.7-2.41) ^F	

Tabelle 17 10-Jahres-Überlebensraten und Hazard Ratios für Gesamt (OS)-, krankheitsspezifisches (DSS)- und rezidiv-freies (PFS) Überleben der vier molekularen Subtypen. Unter den Hazard ratios ist in Klammer das 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

In der multivariaten Analyse blieb für die drei Endpunkte sowohl der Zusammenhang mit den molekularen Subtypen signifikant ($p < 0,001$) als auch der mit dem FIGO-Stadium ($p \leq 0,001$), dem Tumorgrading ($p < 0,04$) und dem post-operativen Tumorrest ($p < 0,001$) (s. Tabelle 18). Ein Zusammenhang zum Alter zeigt sich allerdings nur im Gesamtüberleben ($p = 0,0356$) (s. Tabelle 18). Ob die Patientinnen adjuvante Therapie erhielten oder nicht, hatte multivariat nur auf das Gesamt- ($p = 0,0375$) und nur knapp auf das rezidiv-freie Überleben ($p = 0,0496$) statistisch signifikanten Einfluss (s. Tabelle 18). (Krämer et al., 2020)

Multivariates Überleben Anzahl an events / n		OS 79 / 411		DSS 57 / 405		PFS 72 / 411	
Variable	Level	Hazard Ratio (95% CI)	LRT p-Wert	Hazard Ratio (95% CI)	LRT p-Wert	Hazard Ratio (95% CI)	LRT p-Wert
Molekularer Subtyp (Vergleichsgruppe: NSMP)	p53abn	3.75 (2.17-6.34) ^F	0.001	5.32 (2.85-9.78) ^F	< 0.001	3.51 (1.95-6.13) ^F	< 0.001
	POLEmut	0.68 (0.08-2.54) ^F		0.63 (0-4.71) ^F		0.16 (0-1.14) ^F	
	MMRd	1.1 (0.53-2.09) ^F		1.07 (0.44-2.28) ^F		0.95 (0.44-1.87) ^F	
Alter bei Diagnose		1.02 (1-1.04) ^F	0.036	1.02 (1-1.04) ^F	0.088	1 (0.98-1.01) ^F	0.720
Stadium (Vergleichsgruppe: Low)	Advanced	3.14 (1.62-6.17) ^F	0.001	3.91 (1.71-9.35) ^F	0.001	4.47 (2.16-9.55) ^F	< 0.001
Grade (Vergleichsgruppe: Grade 1/2)	Grade 3	1.73 (1.04-2.88) ^F	0.037	1.95 (1.1-3.45) ^F	0.023	1.79 (1.05-3.02) ^F	0.036
Postoperativer Tumorrest (Vergleichsgruppe: keiner)	jeglicher	3.06 (1.8-5.3) ^F	< 0.001	3.94 (2.14-7.5) ^F	< 0.001	4.09 (2.38-7.16) ^F	< 0.001
Adjuvante Therapie (Vergleichsgruppe: nein)	ja	0.48 (0.25-0.94) ^F	0.038	0.53 (0.23-1.28) ^F	0.174	0.45 (0.22-0.98) ^F	0.050

Tabelle 18 Multivariate Analyse zwischen Überleben, molekularen Subtypen und den in der univariaten Analyse signifikanten klinisch-pathologischen Variablen. Unter den Hazard ratios ist in Klammer das 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

3.9 Subgruppenanalyse der frühen (*low-stage*) endometrioiden Ovarialkarzinome

3.9.1 Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter und der molekularen Subtypen im *low-stage* endometrioiden Ovarialkarzinom

Die univariate Analyse der *low-stage* Fälle zwischen den molekularen Subtypen und den klinisch-pathologischen Variablen Alter, FIGO Stadium, Tumorgrading, post-operative Therapie und adjuvante Therapie ergibt nur für das FIGO Substadium einen signifikanten Zusammenhang ($p=0,032$) (s. Tabelle 19).

Variable	Level	NSMP	p53abn	POLEmut	MMRd	Gesamtzahl	p-Wert
Gesamtzahl	N (%)	219 (79%)	20 (7%)	11 (4%)	28 (10%)	278 (100%)	
Alter bei Diagnose	Mittelwert (sd)	58 (12)	55 (12)	49 (13)	55 (14)	57 (13)	0.101
	Median (IQR)	57 (49 - 67)	57 (48 - 60)	46 (42 - 49)	54 (46 - 68)	56 (48 - 67)	
Stadium	IA	95 (43%)	2 (10%)	4 (36%)	9 (32%)	110 (40%)	0.032
	I	12 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (7%)	14 (5%)	
	IB	11 (5%)	2 (10%)	0 (0%)	2 (7%)	15 (5%)	
	IC	93 (42%)	12 (60%)	7 (64%)	14 (50%)	126 (45%)	
	IIA	8 (4%)	4 (20%)	0 (0%)	1 (4%)	13 (5%)	
Grade	Grade 1/2	201 (92%)	16 (84%)	11 (100%)	22 (81%)	250 (91%)	0.140
	Grade 3	17 (8%)	3 (16%)	0 (0%)	5 (19%)	25 (9%)	
	Fehlende	1	1	0	1	3	
Adjuvante Therapie	nein	94 (47%)	6 (33%)	6 (55%)	9 (35%)	115 (45%)	0.416
	ja	106 (53%)	12 (67%)	5 (45%)	17 (65%)	140 (55%)	
	Fehlende	19	2	0	2	23	

Tabelle 19 Univariate Analyse zwischen molekularen Subtypen und klinisch-pathologischen Variablen im Subkollektiv der low-stage (FIGO IIA und niedriger) endometrioiden Ovarialkarzinome. Beim Mittelwert ist in Klammer die Standardabweichung (sd) mit angegeben, beim Median der Interquartilsabstand (IQR). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

3.9.2 Prognostische Bedeutung der molekularen Klassifikation im low-stage endometrioiden Ovarialkarzinom

Auch für das Subkollektiv der low-stage (FIGO Stadium IIA und niedriger) endometrioiden Ovarialkarzinome mit insgesamt besserem Überleben ergeben sich signifikante Unterschiede im Gesamt (OS)-, krankheitsspezifischen (DSS)- und rezidiv-freien (PFS) Überleben ($p < 0,003$, s. Abbildung 10). Patientinnen mit Karzinomen vom *POLEmut*- sowie *NSMP*-Subtyp haben mit 100% bzw. 94% exzellente krankheitsspezifische 10-Jahres-Überlebensraten (s. Tabelle 20). Karzinome mit *MMRd*- und *p53abn*-Immunhistochemie haben trotz frühem FIGO Stadium krankheitsspezifische 10-Jahres-Überlebensraten von 87% bzw. 67% (s. Tabelle 20). Ähnliches spiegeln die Hazard Ratios wider, wobei die Konfidenzintervalle durch die kleinen Fallzahlen groß sind (s. Tabelle 20). (Krämer et al., 2020)

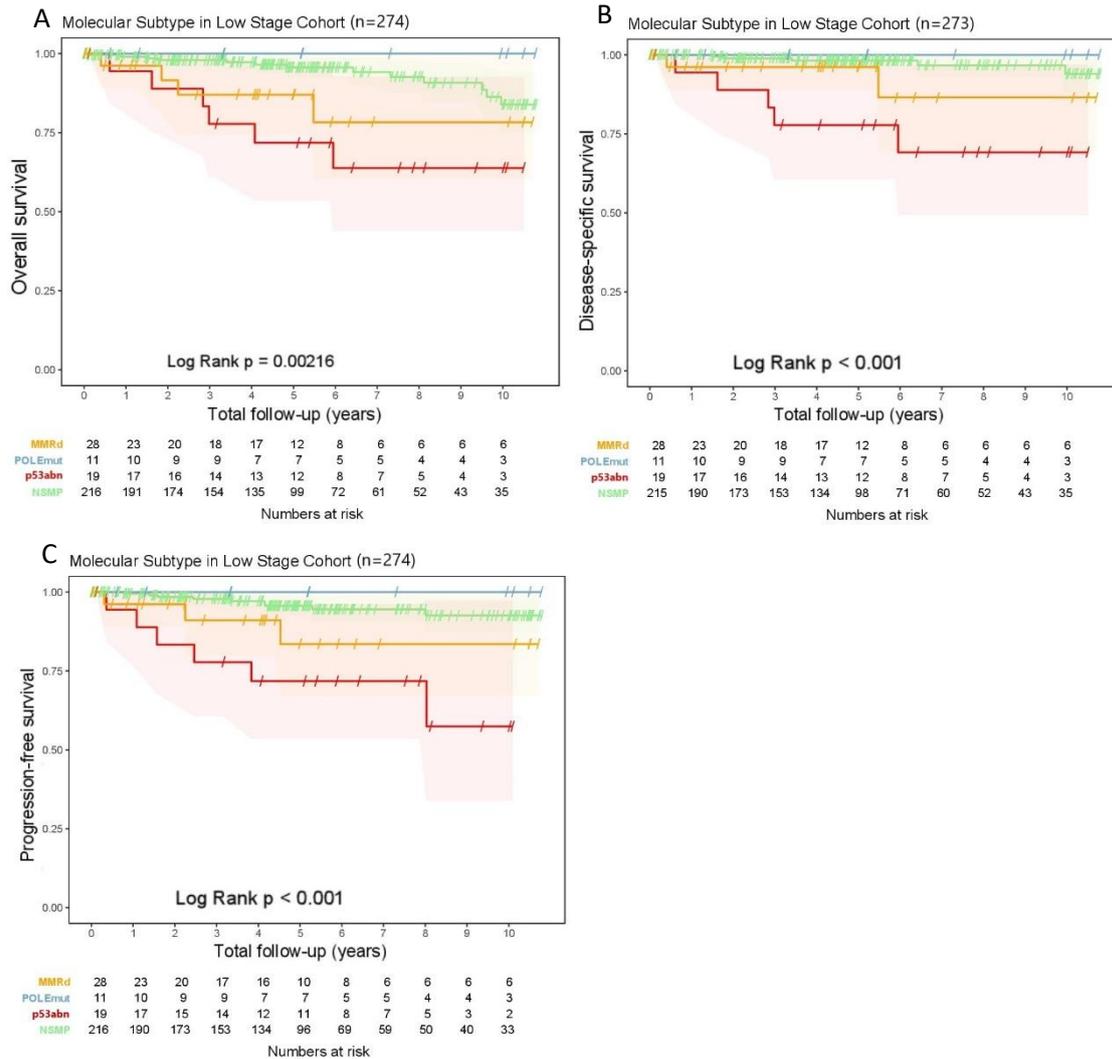


Abbildung 10 (A) Gesamt (Overall survival)-, (B) krankheitsspezifisches (Disease-specific survival)- und (C) rezidiv-freies (Progression-free survival) Überleben (Kaplan-Meier-Analyse) von Patientinnen mit low-stage (FIGO IIA und niedriger) endometrioidem Ovarialkarzinom in Abhängigkeit ihres molekularen Subtyps. In Gelb sind die Patientinnen mit Karzinomen des MMRd Typs, in Blau des POLEmut Typs, in Rot des p53abn Typs und in Grün des NSMP Typs abgebildet. Unterhalb des Graphen sind die Fallzahlen (Numbers at risk) im jeweiligen Jahr nach Diagnose (Total follow-up (years)) angegeben. Abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

10-Jahres Überlebensraten		OS		DSS		PFS	
NSMP		(n=216) 0.839		(n=215) 0.94		(n=216) 0.926	
p53abn		(n=19) 0.638		(n=18) 0.669		(n=19) 0.574	
POLEmut		(n=11) 1		(n=11) 1		(n=11) 1	
MMRd		(n=28) 0.783		(n=28) 0.865		(n=28) 0.835	
Hazard ratios (95% CI)		OS	LRT	DSS	LRT	PFS	LRT
Anzahl an events / n		104 / 505	p-Wert	80 / 497	p-Wert	90 / 505	p-Wert
Vergleichsgruppe: NSMP	p53abn	5.04 (1.84-12.44)F	< 0.001	10.23 (3.02-34.6)F	< 0.005	7.43 (2.6-19.95)F	< 0.004
	POLEmut	0.6 (0-4.5)F		1.55 (0.01-13.71)F		0.93 (0.01-7.35)F	
	MMRd	2.72 (0.83-7.39)F		3.74 (0.67-15.53)F		3.16 (0.79-9.97)F	

Tabelle 20 10-Jahres-Überlebensraten und Hazard Ratios der vier molekularen Subtypen im Subkollektiv der low-stage (FIGO IIA und niedriger) endometrioiden Ovarialkarzinome. Unter den Hazard ratios ist in Klammer das 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

In der Multivariaten Analyse erweisen sich für das krankheitsspezifische (DSS)- und das rezidiv-freie (PFS) Überleben nur die molekularen Subtypen als signifikant (PFS: $p=0,0339$, DSS: $p=0,0476$, s. Tabelle 21). Auf das Gesamtüberleben hat zusätzlich zu den molekularen Subtypen das Tumorgrading einen signifikanten multivariaten Einfluss ($p=0,0393$, s. Tabelle 21). (Krämer et al., 2020)

Anzahl an events / n		OS 21 / 252		DSS 11 / 252		PFS 16 / 252	
Variable	Level	Hazard Ratio (95% CI)	LRT p-Wert	Hazard Ratio (95% CI)	LRT p-Wert	Hazard Ratio (95% CI)	LRT p-Wert
Molekularer Subtyp (Vergleichsgruppe: NSMP)	p53abn	7.72 (2.28-24.05) ^F	0.0042	7.65 (1.86-30.23) ^F	0.0339	4.96 (1.41-15.89) ^F	0.0476
	POLEmut	0.65 (0-5.53) ^F		0.92 (0.01-9.16) ^F		0.63 (0-5.51) ^F	
	MMRd	3.99 (1.09-12.37) ^F		2.79 (0.45-13.25) ^F		2.52 (0.58-9.04) ^F	
Alter bei Diagnose		1.03 (1-1.07) ^F	0.0574	1.02 (0.97-1.07) ^F	0.4927	1.01 (0.97-1.05) ^F	0.7201
Stadium (Vergleichsgruppe: IA)	I	2.28 (0.24-10.38) ^F	0.8058	2.69 (0.02-33.84) ^F	0.4912	1.61 (0.01-16.7) ^F	0.2589
	IB	0.44 (0.04-2.42) ^F		1.54 (0.12-14.34) ^F		3.8 (0.69-21.18) ^F	
	IC	0.81 (0.27-2.39) ^F		2.87 (0.6-17.72) ^F		2.98 (0.82-13.14) ^F	
	IIA	1.55 (0.13-10.58) ^F		8.63 (0.55-109) ^F		9.14 (0.68-84.15) ^F	
Grade (Vergleichsgruppe: Grade 1/2)	Grade 3	0.19 (0-1.55) ^F	0.0393	0.23 (0-2.45) ^F	0.0903	0.23 (0-2.28) ^F	0.0800
Adjuvante Therapie (Vergleichsgruppe: nein)	ja	0.5 (0.18-1.32) ^F	0.1538	0.4 (0.1-1.57) ^F	0.1711	0.36 (0.11-1.11) ^F	0.0670

Tabelle 21 Multivariate Analyse der low-stage (FIGO IIA und niedriger) endometrioiden Ovarialkarzinome zwischen Überleben, molekularen Subtypen und den in der univariaten Analyse signifikanten klinisch-pathologischen Variablen. Unter den Hazard ratios ist in Klammer das 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

3.10 Vergleich der Ergebnisse im endometrioiden Ovarialkarzinom mit denen im endometrioiden Endometriumkarzinom

In der vergleichenden Analyse der in dieser Doktorarbeit generierten Daten zum endometrioiden Ovarialkarzinom und den zusammengefassten Daten aus den endometrioiden Endometriumkarzinomkollektiven aus Talhouk et al., 2015, Talhouk et al., 2017 und Kommoss et al., 2018 stellen Patientinnen mit Karzinomen vom NSMP-Subtyp jeweils die größte und die mit Karzinomen vom MMRd-Subtyp die zweitgrößte Gruppe an Patientinnen (s. Abbildung 11). Die Häufigkeiten der Gruppen der p53abn-Karzinomen und der POLE-Karzinomen verhalten sich gegenläufig (s. Abbildung 11). Der Anteil der NSMP-Karzinome am Gesamtkollektiv ist mit 73,2% im endometrioiden Ovarialkarzinom im Vergleich zum endometrioiden Endometriumkarzinom (56,5%) größer. Der Anteil

an *POLEmut*- und *MMRd*-Karzinomen hingegen ist entsprechend des größeren *NSMP*-Anteils im endometrioiden Ovarialkarzinom kleiner (s. Abbildung 11). Die Unterschiede in der Verteilung der molekularen Subtypen zwischen ENOC und EEC sind statistisch signifikant (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$). (Krämer et al., 2020)

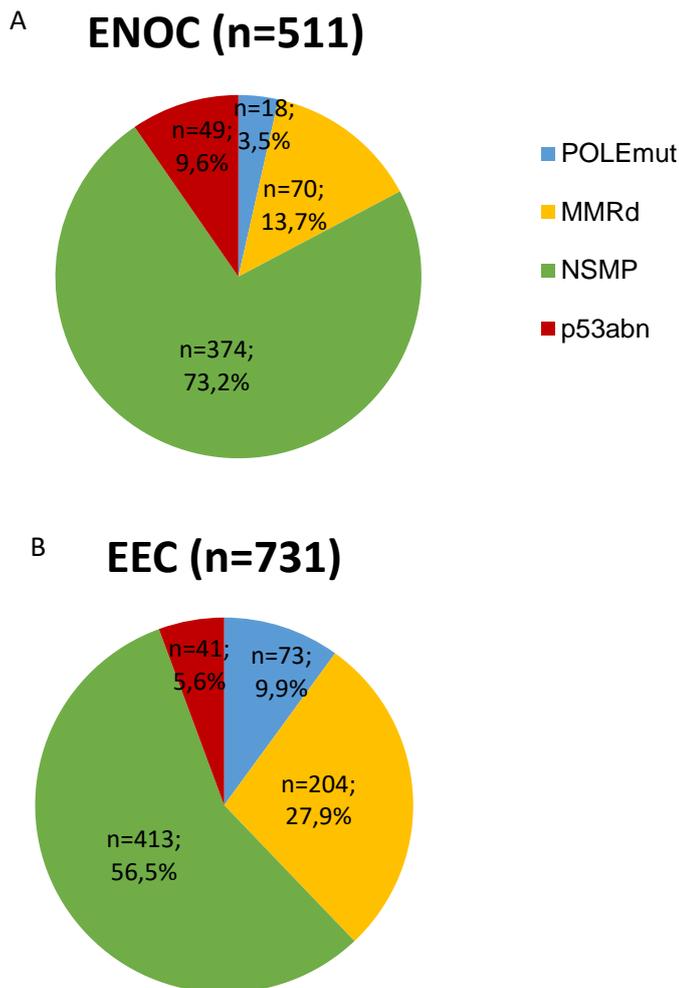


Abbildung 11 Verteilung der molekularen Subtypen im (A) endometrioiden Ovarialkarzinom (ENOC) und (B) endometrioiden Endometriumkarzinom (EEC) (zusammengefasste Daten aus Talhouk et al., 2015, Talhouk et al., 2017, Kommos et al., 2018). In Gelb sind die Patientinnen mit Karzinomen des MMRd Typs, in Blau des POLEmut Typs, in Rot des p53abn Typs und in Grün des NSMP Typs abgebildet. Abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

Tabelle 22 zeigt das nach 5 Jahren zensierte multivariate Modell der endometrioiden Ovarialkarzinome, um diese mit den veröffentlichten Daten für

das endometrioides Endometriumkarzinom aus Talhouk et al., 2015, Talhouk et al., 2017 und Kommos et al., 2018 vergleichen zu können. (Krämer et al., 2020)

Anzahl an events / n	Variable	OS 62 / 411		DSS 48 / 408		PFS 65 / 404	
		Hazard Ratio (95% CI)	LRT p-Wert	Hazard Ratio (95% CI)	LRT p-Wert	Hazard Ratio (95% CI)	LRT p-Wert
Molekularer Subtype (Vergleichsgruppe: NSMP)	p53abn	4.14 (2.28-7.35) ^F	< 0.001	4.96 (2.54-9.51) ^F	< 0.001	3.43 (1.85-6.14) ^F	< 0.001
	POLEmut	0.27 (0-1.93) ^F		0.32 (0-2.38) ^F		0.17 (0-1.23) ^F	
	MMRd	1.23 (0.54-2.51) ^F		0.98 (0.35-2.3) ^F		0.86 (0.36-1.8) ^F	
Alter bei Diagnose		1.02 (1-1.04) ^F	0.077	1.01 (0.99-1.04) ^F	0.206	1 (0.98-1.02) ^F	0.971
Stadium (Vergleichsgruppe: Low)	Advanced	2.77 (1.26-6.2) ^F	0.012	3.15 (1.22-8.56) ^F	0.017	4.2 (1.96-9.3) ^F	< 0.001
Grade (Vergleichsgruppe: Grade 1/2)	Grade 3	2.15 (1.22-3.8) ^F	0.008	2.26 (1.21-4.24) ^F	0.010	1.9 (1.08-3.3) ^F	0.027
Postoperativer Tumorrest (Vergleichsgruppe: keiner)	jeglicher	3.66 (2.01-6.87) ^F	< 0.001	4.78 (2.44-9.83) ^F	< 0.001	3.89 (2.19-7.03) ^F	< 0.001
Adjuvante Therapie (Vergleichsgruppe: nein)	ja	0.41 (0.19-0.9) ^F	0.031	0.51 (0.2-1.41) ^F	0.214	0.46 (0.21-1.03) ^F	0.066

Tabelle 22 Nach 5 Jahren zensierte multivariate Überlebensanalysen des endometrioiden Ovarialkarzinoms. Unter den Hazard ratios ist in Klammer das 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

Der Trend der 5-Jahres-Überlebensraten von Patientinnen der molekularen Subtypen ist im endometrioiden Ovarialkarzinom und im endometrioiden Endometriumkarzinom vergleichbar. Lediglich das krankheitsspezifische Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen, deren Karzinom eine *p53abn*-Immunhistochemie aufweist, ist im Vergleich zur entsprechenden Gruppe im endometrioiden Endometriumkarzinom deutlich schlechter. Ein endometrioides Ovarialkarzinom mit einer *MMRd*-Immunhistochemie korreliert mit einem leicht schlechteren, der Nachweis von keinem der molekularen Marker mit einem leicht besseren Gesamt- und krankheitsspezifischen 5-Jahres-Überleben verglichen mit Endometriumkarzinompatientinnen (s. Tabelle 23). (Krämer et al., 2020)

5-Jahres Überlebensraten			
ENOC	OS	DSS	PFS
NSMP	(n=370) 84,3 %	(n=364) 86,6%	(n=357) 83,9 %
p53abn	(n=48) 48,8 %	(n=45) 51,1%	(n=46) 50,7 %
POLEmut	(n=18) 100 %	(n=17) 100 %	(n=18) 100 %
MMRd	(n=69) 83,4 %	(n=67) 88,2%	(n=68) 80,4 %
Full Cohort	(n=505) 80,8 %	(n=493) 83,4%	(n=489) 80,6 %
EEC	OS	DSS	PFS
NSMP	(n=413) 84 %	(n=410) 92 %	(n=380) 90,2 %
p53abn	(n=41) 48,7 %	(n=40) 70,4 %	(n=33) 69,4 %
POLEmut	(n=73) 88,3 %	(n=72) 97 %	(n=70) 97,1 %
MMRd	(n=204) 71,1%	(n=200) 80,4 %	(n=185) 80,9 %

Tabelle 23 5-Jahres-Überlebensraten der Patientinnen mit endometrioidem Ovarialkarzinom (ENOC) sowie von Patientinnen mit endometrioidem Endometriumkarzinom (EEC) (zusammengefasst aus Talhouk et al., 2015, Talhouk et al., 2017, Kommoss et al., 2018). Tabelle abgewandelt aus Krämer et al., 2020.

4. Diskussion

Bei den unterschiedlichen histologischen Typen des Ovarialkarzinoms handelt es sich nach aktuellem Verständnis um verschiedene Entitäten mit unterschiedlicher Ätiologie, Prognose und biologischen Eigenschaften (Kommoss und Gilks, 2017, Meinhold-Heerlein et al., 2016, Kobel et al., 2016). Dennoch werden die meisten Forschungsprojekte und klinischen Studien entweder unabhängig vom histologischen Typ oder am häufigsten histologischen Typ, dem HGSC, durchgeführt. Auch Projekte zur weiteren molekularen Charakterisierung befassen sich aufgrund der Häufigkeitsverteilung bisher fast ausschließlich mit dem HGSC. So auch die weltweit umfangreichste molekulare Untersuchung von Tumorerkrankungen, das TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011). Das Ziel der hier vorgelegten Dissertationsschrift war eine an das *TCGA Endometriumkarzinom* angelehnte molekulare Analyse des endometrioiden Ovarialkarzinoms durchzuführen.

Die spezifischen Charakteristika des endometrioiden Ovarialkarzinoms beinhalten unter anderem einen prognostisch günstigeren Verlauf und ein jüngeres Erkrankungsalter (Groen et al., 2015, Kommoss et al., 2016). Besonders in der Prämenopause stellen eine nicht abgeschlossene Familienplanung und die Bedeutung der endokrinen Funktion des Ovars immer wieder eine besondere Herausforderung dar. Ein weiteres Spezifikum des endometrioiden Ovarialkarzinoms ist die Diagnosestellung in einem häufig noch frühen Erkrankungsstadium (Prat, 2012), das grundsätzlich ein fertilitätserhaltendes operatives Management zulassen würde (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2020). Vor dem Hintergrund der geringen Fallzahlen ist die Durchführung klinischer Studien zum endometrioiden Ovarialkarzinom allerdings nahezu unmöglich und die Datenlage zu diesen wichtigen Fragestellungen mehr als überschaubar. Durch die Einbeziehung internationaler Zentren konnte in dieser retrospektiven internationalen Multicenterstudie mit insgesamt neun Zentren in Kanada und Europa mit n=511 Fällen ein großes und repräsentatives Kollektiv endometrioider Ovarialkarzinome zusammengestellt werden.

Bezugnehmend auf die morphologische Ähnlichkeit des endometrioiden Ovarialkarzinoms zum endometrioiden Endometriumkarzinom wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die morphologische Ähnlichkeit auch bezüglich der molekularen Eigenschaften niederschlagen würde. Diese Frage kann, wie im Folgenden erläutert, mit einem deutlichen *Ja* beantwortet werden.

Mit einem Anteil von 3,5% *POLEmut*-Patientinnen in dem vorliegenden Kollektiv liegt dieser Wert geringfügig unter dem Wert bisheriger Studien zum endometrioiden Ovarialkarzinom (4,5-10% (Hoang et al., 2015, Parra-Herran et al., 2017)). Dies könnte zum einen daran liegen, dass die selteneren Mutationen p.P436R and p.M444K nicht von allen und p.F367S, p.D368Y von keiner unserer Methoden abgedeckt wurden. Da diese allerdings äußerst selten sind (Leon-Castillo et al., 2020a), ist diese Erklärung eher unwahrscheinlich. Darüber hinaus könnte der Unterschied an der strengen Definition von ausschließlich *pathogenic somatic variants* als *POLEmut* in dieser Studie liegen. Dies birgt zwar die Gefahr, weitere Fälle mit einer POLE-Mutation zu übersehen, verringert allerdings die Wahrscheinlichkeit einer Überschätzung des POLE-mutierten Anteils. Da für Patientinnen vom *POLEmut* Subtyp, wie später erläutert, aufgrund des exzellenten Überlebens eine Therapiereduktion diskutiert werden könnte, scheint eine eher enge Definition von *POLEmut* der sicherere Ansatz zu sein und wird deshalb auch bei anderen Tumorarten, wie dem Endometriumkarzinom (McAlpine et al., 2018), bevorzugt. Bekräftigt wird diese Entscheidung durch den Anteil von nur 3% POLE (ultramutated) in der zwar nur sehr kleinen, aber hingegen Whole-Genome-Sequencing Studie von Cybulska et al., 2019.

Mit 13,7% war der Anteil an *MMRd*-Patientinnen in diesem Kollektiv nur geringfügig höher als mit 10-12% (Murphy und Wentzensen, 2011, Aysal et al., 2012) erwartet. Dieser lag mit 19% MSI aber auch in der Whole-Genome-Sequencing Studie von Cybulska et al., 2019 (dort hypermutated) höher.

Auch der Anteil an *NSMP*-Karzinomen war mit 73,2% der Fälle etwas höher als von den kleineren Studien erwartet (58% (Parra-Herran et al., 2017) und 61% (Cybulska et al., 2019)).

Der Anteil an *p53abn*-Karzinomen lag mit n=49 plus der acht Fälle, die zwar ein abnormales p53-Färbemuster aufwiesen, entsprechend dem Klassifikationsalgorithmus allerdings als *MMRd* klassifiziert wurden, mit 11,4% etwas niedriger als die erwarteten 14,9% (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2020, Kobel et al., 2016). In der Arbeit von Parra-Herran et al. 2017 lag dieser Anteil bei 24%. Die Methodik zu p53-Färbung ist vergleichbar und auch diese Fälle wurden nach der aktuellen WHO-Klassifikation diagnostiziert. Außer den Unterschieden in der Fallzahl (Parra-Herran et al.: n=72) und der Tatsache, dass bei Parra-Herran et al. Fälle mit synchronen Endometriumkarzinom konsequent ausgeschlossen wurden, waren die Verteilung des Tumorgradings und das Alter des Kollektivs mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Die Daten zu synchronen Endometriumkarzinomen waren zu unserem Kollektiv leider nicht ausreichend vorhanden. Bezüglich des FIGO Stadium hatten Parra-Herran et al. mit 64% (vs. 56% in dieser Arbeit) mehr Patientinnen im FIGO Stadium I. Die genaue Aufteilung auf die restlichen Stadien ist bei Parra-Herran et al. leider nicht angegeben. Damit lässt sich der Unterschied in der Häufigkeit nicht eindeutig klären.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass nach der Bestimmung der vom Endometriumkarzinom abgeleiteten molekularen Marker für den *POLE*-, *MMR*- und *p53*-Status im vorliegenden Kollektiv endometrioider Ovarialkarzinome die etwas geringeren Zahlen für *POLEmut* wie oben erläutert am ehesten an der strengen, von uns aber dennoch bevorzugten, Definition von *POLEmut* liegen könnte. Der Grund für den geringfügig kleineren Anteil an *p53abn* Fällen und den unwesentlich höheren Anteil an *MMRd* und *NSMP* endometrioiden Ovarialkarzinomen im Gegensatz zu bislang publizierten Studien konnte auf Basis der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Allerdings muss an dieser Stelle festgehalten werden, dass das hier vorliegende Kollektiv deutlich größer als die zum Vergleich verfügbaren Kollektive war.

In Übereinstimmung mit bisher vorliegender Literatur waren die Patientinnen in dieser Arbeit insgesamt jünger als Patientinnen mit HGSC (durchschnittlich 60-62 Jahre (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011, Rambau et al., 2018,

Le Page et al., 2018, Krämer et al., 2020)). 8,4 % der Patientinnen waren bei Erstdiagnose 40 Jahre oder jünger und damit potenziell noch fertil. Diese jungen Patientinnen mit eventuell noch vorhandenem Kinderwunsch stellen, wie oben beschrieben, im klinischen Alltag immer wieder eine besondere Herausforderung dar. Zudem sind 63% der Patientinnen unter 60 Jahre alt. Auch der hohe Anteil an *low-stage* Karzinomen (im HGSC hingegen durchschnittlich 18-19,5% (Rambau et al., 2018, Le Page et al., 2018)) und die zudem gute Differenzierung der endometrioiden Ovarialkarzinome unterstrich nochmals die eindrucklichen Unterschiede zum HGSC (Krämer et al., 2020).

Mit dem durchschnittlich jüngeren Alter, dem niedrigen Stadium und dem guten Differenzierungsgrad befindet sich ein bedeutender Anteil der Patientinnen, die Gegenstand dieser Arbeit waren, zum einen in einem Bereich, in dem im Rahmen nationaler und internationaler Leitlinienkommissionen und Konferenzen in den letzten Jahren mit noch vielen offenen Fragen vermehrt eine Diskussion über Therapiereduktionen aufkommt (Minig et al., 2017, Colombo et al., 2019, Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2020) und zum anderen um Patientinnen, die jünger sind und bei denen es unter anderem um Fragen der Fertilitätserhaltung oder Therapiefolgen von radikaler Lymphadenektomie oder aggressiver Chemotherapie geht. Während die radikalen Lymphadenektomie beispielsweise bei Patientinnen mit *advanced-stage* Karzinom nach einer Operation ohne residualen Tumor und klinisch unauffälligen Lymphknoten in der aktuellen S3-Leitlinie 2020 nicht mehr empfohlen wird (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2020), ist diese Frage für Patientinnen mit *low-stage* Karzinom weiterhin nicht ausreichend geklärt (Minig et al., 2017).

Die Überlebensanalysen zeigen in Analogie zum endometrioiden Endometriumkarzinom klare prognostische Unterschiede in den vier molekularen Subtypen. Während in der Gruppe der *POLEmut*-Patientinnen keine der n=18 Patientinnen an ihrer Erkrankung verstarben, hatten *p53abn*-Patientinnen eine krankheitsspezifische 10-Jahres-Überlebensrate von 39% und lassen sich damit prognostisch eher mit einem HGSC vergleichen (Verhaak et al., 2013). Auch *MMRd*- und *NSMP*-Patientinnen hatten mit 78% und 80% 10-

Jahresüberlebensrate ein für eine Ovarialkarzinom vergleichsweise gutes Überleben. (Krämer et al., 2020)

Das exzellente Überleben von *POLEmut*-Patientinnen unabhängig von FIGO Stadium, Tumorgrading, Alter und sogar adjuvanter Therapie bestätigt deutlich die Ergebnisse vorheriger kleinerer Studien (Hoang et al., 2015, Parra-Herran et al., 2017). Die Tatsache, dass *POLEmut*-Patientinnen auch innerhalb der Gruppe der wie oben beschrieben tendenziell jüngeren endometrioiden Ovarialkarzinompatientinnen, im Vergleich zu den anderen molekularen Subtypen zusätzlich signifikant jünger erkranken, könnte *POLE*-Mutationstestung umso mehr zu einem nützlichen Instrument bei Therapieentscheidungen von jüngeren Patientinnen im Zusammenhang mit beispielsweise fertilitätserhaltender Therapie machen. (Krämer et al., 2020)

Insgesamt hatten auch *MMRd*- und *NSMP*-Patientinnen verglichen zu *POLEmut*- und *p53abn*-Patientinnen ein eher gutes bis mittelmäßiges Überleben. *MMRd*-Patientinnen waren in der vorliegenden Arbeit bei Erstdiagnose zum einen etwas jünger als *NSMP*-Patientinnen, zum anderen hatten sie häufiger schon ein fortgeschrittenes FIGO Stadium und einen geringeren Differenzierungsgrad. Dieses vergleichsweise scheinbar aggressivere Karzinomprofil spiegelt sich im Überleben allerdings nur bei Patientinnen mit frühem FIGO Stadium wider: Bei *MMRd*- und *NSMP*-Patientinnen aller FIGO Stadien gab es im Überleben kaum Unterschiede (HR DSS (*MMRd* vs. *NSMP*): 1,25, s. Tabelle 17). In der Gruppe der *low-stage* Patientinnen hatten *MMRd*-Patientinnen hingegen deutlich schlechteres Überleben als *NSMP*-Patientinnen (HR DSS (*MMRd* vs. *NSMP*): 3,74, s. Tabelle 20).

NSMP-Patientinnen dienten in den Analysen dieser Arbeit jeweils als Referenzgruppe, da sie keines der untersuchten molekularen Charakteristika aufwiesen. Wie oben beschrieben, hatten sie in den Ergebnissen des gesamten Studienkollektivs mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 79,8% (s. Tabelle 17) ein ähnliches Überleben wie *MMRd*-Patientinnen, im *low-stage* Subkollektiv mit 94% (s. Tabelle 20) allerdings ein deutlich besseres. Um die Behandlungsangebote für diese große Gruppe risikoadaptiert zu optimieren,

müssten in Zukunft weitere molekulare Marker untersucht werden (Krämer et al., 2020).

Unabhängig vom kleineren prozentualen Anteil der *p53abn*-Fälle der vorliegenden Arbeit hatten diese wie erwartet (Parra-Herran et al., 2017) mit Abstand das schlechteste Überleben (HR DSS (*p53abn* vs. *NSMP*): 4,2, s. Tabelle 17). Bemerkenswert ist dabei insbesondere auch das schlechte Überleben von *low-stage p53abn*-Patientinnen (HR DSS (*MMRd* vs. *NSMP*): 7,43, s. Tabelle 20). Dies wirft die Frage auf, ob Patientinnen dieses Subtyps nicht auch in niedrigen FIGO Stadien von adjuvanter Therapie profitieren könnten. Als mögliche Einschränkung muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass aus der Literatur bekannt ist, dass das chirurgische Staging bei frühen Ovarialkarzinomen häufig inkomplett erfolgt (Trimbos et al., 2003, Laven et al., 2022), was teilweise zu fälschlich als *low-stage* klassifizierten Fällen führen könnte und damit auch ein möglicher Erklärungsansatz für den schlechteren prognostischen Verlauf von *low-stage p53abn*-Patientinnen wäre.

Insgesamt kann aus den Überlebensanalysen für zukünftige Studien zum Ovarialkarzinom festgehalten werden, dass ein bedeutender Anteil an Patientinnen mit einem endometrioiden Ovarialkarzinom letzten Endes gar nicht an ihrer Erkrankung verstirbt und damit in Zukunft entgegen der überwiegenden bisherigen Praxis nicht mehr nur das Gesamtüberleben, sondern auch das krankheitsspezifische Überleben ausgewertet werden sollte (Krämer et al., 2020). Darüber hinaus spielen nach diesen Erkenntnissen Langzeitfolgen von Chemotherapeutika oder radikalen Operationstechniken im endometrioiden Ovarialkarzinom eine weitaus bedeutendere Rolle als im HGSC. Dies unterstreicht nochmals, dass für Patientinnen mit einem endometrioiden Ovarialkarzinom andere therapeutische Überlegungen als für Patientinnen mit einem HGSC angestellt werden sollten, insbesondere bei Patientinnen mit einem *low-stage* endometrioiden Ovarialkarzinom.

Vergleicht man die Häufigkeiten der molekularen Subtypen zwischen dem endometrioiden Ovarialkarzinom und dem Endometriumkarzinom, ähneln sich diese. Lediglich die Anteile an *p53abn*- und *POLEmut*-Patientinnen verhalten

sich umgekehrt. Der geringere Anteil an *p53abn* in der Gruppe der endometrioiden Endometriumkarzinome könnte durch die bekannte Schwierigkeit der eindeutigen Bestimmung des histologischen Typs von insbesondere high-grade Endometriumkarzinomen (Gilks et al., 2013) im Endometriumkarzinom bedingt sein (McAlpine et al., 2018, Krämer et al., 2020). Stellt man die Ergebnisse zur prognostischen Relevanz der molekularen Subtypen des endometrioiden Adenokarzinom des Ovars und die des Adenokarzinom des Korpus Uteri gegenüber, sind ihre Ergebnisse vergleichbar. In beiden Entitäten zeigen *POLEmut*-Patientinnen ein exzellentes Überleben (5-Jahres-DSS: ENOC (100%), EEC (97%)), wohingegen *p53abn*-Patientinnen vergleichsweise früh versterben (5-Jahres-DSS: ENOC (51%), EEC (70%)). Der Unterschied zwischen dem krankheitsspezifischen 5-Jahres-Überleben der *p53abn*-Patientinnen von EEC und ENOC könnte sich am ehesten durch die anatomischen Unterschiede zwischen den beiden Entitäten erklären lassen. Vom Ovar scheinen sich die aggressiven *p53*-mutierten Zellen schneller auszubreiten als aus dem Uterus. Das fast mit der *POLEmut*-Gruppe vergleichbare Überleben der *NSMP*-Patientinnen im Uterus scheint sich im Ovar allerdings nicht zu bestätigen. Zwar haben auch diese Patientinnen ein vergleichsweise gutes Überleben (5-Jahres-DSS: ENOC (87%)), allerdings nicht so gut wie Patientinnen mit einem EEC vom *NSMP*-Subtyp (5-Jahres-DSS: EEC (92%)). Auch die Tatsache, dass diese Gruppe im Ovar größer ist als im Uterus (ENOC (73%) vs. EEC (57%)) scheint darauf hinzudeuten, dass es sich hier im Ovar um eine heterogenere Gruppe als im Uterus handelt und dass weitere molekulare Marker nötig sein werden, diese Gruppe genauer zu beschreiben. (Krämer et al., 2020)

Unabhängig von den geringfügigen Unterschieden zwischen den beiden Entitäten ergibt sich mit den vergleichenden Analysen ein weiterer wegweisender Punkt für künftige wissenschaftliche Bemühungen: die Ergänzung der Erkenntnisse zur ähnlichen Morphologie und Ätiologie der endometrioiden Adenokarzinome des Korpus Uteri und des Ovars durch bestätigende Ergebnisse zu molekularen Analogien. Dies könnte für Patientinnen mit endometrioidem Adenokarzinom des Ovars bedeuten, dass sie von

Entwicklungen und Erkenntnissen zum endometrioiden Adenokarzinom des Korpus Uteri profitieren, und so beispielsweise klinische Studien für Patientinnen mit endometrioidem Adenokarzinom des Ovars schneller auf den Weg gebracht werden könnten (Krämer et al., 2020). Überlegungen in diese Richtung könnten beispielsweise Abwandlungen des sich aktuell für das Endometriumkarzinom in Vorbereitung befindenden RAINBO-Projekts (Giustozzi et al., 2021) (De Nederlandse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie (NVOG), 2022) sein. In diesem Projekt werden Patientinnen nach erfolgter Operation gemäß der vier molekularen Subtypen in vier verschiedenen Studien eingeschlossen. In der sogenannten p53abn-RED-Studie, der Studie für Patientinnen mit *p53abn*-Krazinomen, erhalten die Patientinnen randomisiert entweder nur Chemotherapie oder Chemotherapie in Kombination mit dem PARP-Inhibitor Olaparip. Im Rahmen der MMRd-GREEN-Studie wird in einen Arm randomisiert, der nur Radiotherapie erhält und einen, der Radiotherapie in Kombination mit dem PDL1-Inhibitor Durvalumab erhält. In der NSMP-ORANGE-Studie wird in einen Radiochemotherapie und eine Radiotherapie in Kombination mit einer Hormontherapie mit Progesteron randomisiert. Bei der *POLE*mut-BLUE-Studie für Patientinnen mit *POLE* mutierten Karzinomen handelt es sich um eine einarmige Phase II Studie, in der bis auf Radiotherapie für Patientinnen mit einem Endometriumkarzinom im fortgeschrittenen Stadium keine adjuvante Therapie geplant ist. Mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit ließe sich die Forderung nach klinischen Studien zur molekularen Klassifikation von endometrioiden Ovarialkarzinomen in Anlehnung an dieses Projekt stellen.

Eine der größten Stärken der vorliegenden Arbeit ist die Größe des Studienkollektivs und die annähernde Vollständigkeit der klinischen Daten (Krämer et al., 2020). Vorteil der internationalen Zusammenarbeit ist aber nicht nur die Größe des Kollektivs, sondern auch, dass die Ergebnisse unabhängig von lokalen Unterschieden in Diagnostik und Therapie übertragbar sind. Weltweit herrschen zwar weiterhin geringfügig unterschiedliche Behandlungsstandards (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2020, Colombo et al., 2019, Armstrong et al., 2019). Da sich im Vergleich der europäischen mit der kanadischen

Subkohorte allerdings keine signifikanten Unterschiede in den klinisch-pathologischen Eigenschaften zeigten, kann von einem geringen Einfluss dessen auf die Ergebnisse ausgegangen werden (Krämer et al., 2020).

Eine weitere Stärke der Untersuchungen ist die Überprüfung der pathologischen Diagnose mittels TMA-basierter Immunhistochemie (Krämer et al., 2020). Mit dem immunhistochemischen Ausschluss von Fällen, bei denen es sich potenziell um high-grade-seröse Ovarialkarzinome handelt, ist die Wahrscheinlichkeit, nicht-endometrioide Fälle im Kollektiv zu haben, als gering einzuschätzen (Krämer et al., 2020).

Darüber hinaus ist positiv hervorzuheben, dass die Methoden, die zur Bestimmung der molekularen Subtypen in den zentralen Analysen verwendet wurden, im Endometriumkarzinom schon vielfach validiert sind (Talhok et al., 2015, Talhok et al., 2017, Kommoss et al., 2018).

Mögliche Limitation der Arbeit ist, dass die Methodik, insbesondere die Bestimmung der *POLE*-Mutationsstatus, durch den multizentrischen Ansatz nicht in allen Zentren einheitlich erfolgte. Dennoch wurden von allen Methoden mindestens die vier häufigsten Mutationshotspots des *POLE*-Gens abgedeckt. Deshalb wurden - wenn überhaupt - nur sehr seltene und wenig beschriebene Mutationsstellen für *POLE* nicht erfasst. Darüber hinaus scheint, wie oben erläutert, bei einer Diskussion über eine mögliche Therapiereduktion ein Ansatz der sicherere, bei dem eher zu wenige als zu viele *POLEmut*-Fälle identifiziert werden. (Krämer et al., 2020)

Bedingt durch das retrospektive Studiendesign liegt der Zeitpunkt der Erstdiagnose und Therapie bei einigen Patientinnen über 40 Jahre zurück. Zum einen haben sich die Therapiestandards in diesen Jahren schrittweise verändert. Der Einfluss auf die Ergebnisse könnte allerdings als gering einzuschätzen sein. Dies lässt sich beispielsweise daran erkennen, dass in der Begründung zur Standardsystemtherapie für das fortgeschrittene Ovarialkarzinom in der S3 Leitlinie von 2016 (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2016) eine Studie von 1999 (du Bois et al., 1999) herangeführt wird. Darüber hinaus ergaben sich über die Zeit Änderungen in der FIGO-Klassifikation. Da es sich bei der FIGO Klassifikation um eine pathologische und klinische Einschätzung handelt, lässt

sich diese im Nachhinein nur schwer den neuen Standards anpassen. Die Unterschiede in der FIGO Klassifikation von 2014 wurden in dieser Arbeit nicht angeglichen. Dies betrifft im Besonderen Fälle im FIGO Stadium IIC, da es dieses in der aktuellen Klassifikation nicht mehr gibt, sowie Fälle im FIGO Stadium IIIC, die in der FIGO Klassifikation von 2014 überwiegend als FIGO IIIA eingestuft würden. Dies ist darin begründet, dass in der alten FIGO Klassifikation allein retroperitoneale Lymphknoten ausreichen, um als FIGO IIIC eingestuft zu werden, in der aktuellen wären diese Fälle allerdings FIGO IIIA und damit einem geringeren Stadium zuzuordnen (Meinhold-Heerlein et al., 2015, Duska und Kohn, 2017). Durch die genauere Betrachtung der *low-stage* Karzinome in dieser Studie hätte vor allem die Änderung bezüglich FIGO Stadium IIC Auswirkungen. Dennoch wurden in der vorliegenden Arbeit alle FIGO IIC (n=51) so wie auch FIGO II ohne weitere Subspezifizierung (n=17) als *advanced-stage* Karzinome eingeteilt (Krämer et al., 2020). Auch die Daten der adjuvanten Therapie ließen sich in manchen Fällen nicht genau erfassen (Krämer et al., 2020). Ein Vorteil der lang zurückliegenden Erstdiagnose mancher Patientinnen ist der lange Follow-up Zeitraum. Dennoch stellten sich einige unserer Patientinnen als lost-to-follow-up heraus (medianes Follow-up für das Gesamtüberleben: 5,34 Jahre (reverse Kaplan-Meier)).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Einteilung von endometrioiden Ovarialkarzinomen in die vom Endometriumkarzinom abgeleiteten molekularen Subtypen möglich und unter der Beachtung der deutlichen prognostischen Unterschiede insbesondere auch bei *low-stage* Patientinnen sinnvoll ist. Mit der insgesamt besseren Prognose, dem meist früheren klinischen Stadium, dem jüngeren (häufiger prämenopausalen) Alter und den sich damit ergebenden besonders wichtigen Fragestellungen wie beispielsweise Fertilitätserhaltung oder Reduzierung von nebenwirkungsreichen Therapien (adjuvante Therapie, systematische Lymphadenektomie etc.) kann die molekulare Klassifikation endometrioider Ovarialkarzinome einen wertvollen Beitrag zur zukünftigen Entwicklung risikoadaptierter Behandlungskonzepte für diese Patientinnen leisten und damit letzten Endes helfen, die

Patientinnenversorgung zu verbessern. Dies gilt insbesondere auch für die Ableitung von Erkenntnissen zum endometrioiden Endometriumkarzinom für Forschungsprojekte zum endometrioiden Ovarialkarzinom. (Krämer et al., 2020)

Wie am Beispiel des endometrioiden Ovarial- und Endometriumkarzinom eindrucksvoll gezeigt, darf für die gynäkologische Onkologie durch die Erweiterung bisheriger Konzepte und Einbeziehung molekularer Charakteristika ein deutlicher Fortschritt in der risikoadaptierten und personalisierten Therapie maligner Erkrankungen des weiblichen Genitaltrakts erwartet werden. Patientinnen werden letztendlich nicht nur durch günstigere prognostische Verläufe, sondern insbesondere auch von einer Verbesserung der Lebensqualität profitieren.

5. Zusammenfassung der Arbeit

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand die Frage, ob sich die auf den Erkenntnissen des Cancer Genome Atlas Project (TCGA) basierende und mittlerweile in internationalen Leitlinien etablierte molekulare Klassifikation des Endometriumkarzinoms auf das endometrioides Ovarialkarzinom übertragen lässt. Diese These lässt sich von der morphologischen Nähe der beiden Entitäten ableiten.

Die Fragestellung dieser Doktorarbeit ist insbesondere vor dem Hintergrund relevant, dass die verschiedenen histologischen Typen des Ovarialkarzinoms trotz deutlicher Unterschiede weiterhin überwiegend unabhängig ihres histologischen Typs behandelt werden. So zeichnet sich das endometrioides Ovarialkarzinom im Gegensatz zu den anderen histologischen Typen durch ein junges Erkrankungsalter der Patientinnen sowie ein frühes Krankheitsstadium und einen insgesamt günstigen prognostischen Verlauf aus. Aus diesen klinisch bedeutsamen Unterschieden ergibt sich ein dringender Bedarf an histotypspezifischer Forschung.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit war es möglich, ein bislang beispielloses Kollektiv von n=511 endometrioiden Ovarialkarzinomen zu etablieren. In Analogie zum Endometriumkarzinom wurde dieses Kollektiv mittels POLE-Mutationsanalyse sowie p53- und MMR-Immunhistochemie untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass sich die molekulare Klassifikation des Endometriumkarzinoms durchaus auf das endometrioides Ovarialkarzinom übertragen lässt. Dies zeigt sich zum einen in der ersichtlichen Ähnlichkeit der Häufigkeitsverteilungen der molekularen Subtypen in beiden Entitäten. Zum anderen war die aus den Überlebensanalysen des Endometriumkarzinoms bekannte prognostische Bedeutung der molekularen Subtypen auch für das endometrioides Ovarialkarzinom signifikant nachweisbar. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Patientinnen mit POLE-mutierten Ovarialkarzinomen eine 10-Jahresüberlebensrate von 100% hatten, während Patientinnen mit p53-abnormalen Ovarialkarzinomen selbst im frühen Krankheitsstadium einen schlechten prognostischen Verlauf aufwiesen. Diese

Ergebnisse ließen sich auch in der Subgruppenanalyse der *low-stage* Karzinome bestätigen.

Schlussfolgernd könnte die molekulare Klassifikation endometrioider Ovarialkarzinome einen wichtigen Baustein in der histotyp-spezifischen und risikoadaptierten Beratung junger Patientinnen zur fertilitätserhaltenden Therapie oder Vermeidung einer iatrogenen Postmenopause darstellen. Darüber hinaus könnten sich aus der Nähe zum Endometriumkarzinom weitere Forschungsfragen bezüglich adjuvanter Therapien ergeben.

Dies könnte insbesondere für junge Frauen nicht nur zu einer Verbesserung des Überlebens, sondern zu einer Verbesserung ihrer Lebensqualität beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- AMANT, F., MOERMAN, P., NEVEN, P., TIMMERMAN, D., VAN LIMBERGEN, E. & VERGOTE, I. 2005. Endometrial cancer. *Lancet*, 366, 491-505.
- ANGLESIO, M. S., WANG, Y. K., MAASSEN, M., HORLINGS, H. M., BASHASHATI, A., SENZ, J., MACKENZIE, R., GREWAL, D. S., LI-CHANG, H., KARNEZIS, A. N., SHEFFIELD, B. S., MCCONECHY, M. K., KOMMOSS, F., TARAN, F. A., STAEBLER, A., SHAH, S. P., WALLWIENER, D., BRUCKER, S., GILKS, C. B., KOMMOSS, S. & HUNTSMAN, D. G. 2016. Synchronous Endometrial and Ovarian Carcinomas: Evidence of Clonality. *J Natl Cancer Inst*, 108, djv428.
- ARMSTRONG, D. K., ALVAREZ, R. D., BAKKUM-GAMEZ, J. N., BARROILHET, L., BEHBAKHT, K., BERCHUCK, A., BEREK, J. S., CHEN, L. M., CRISTEA, M., DEROSA, M., ELNAGGAR, A. C., GERSHENSON, D. M., GRAY, H. J., HAKAM, A., JAIN, A., JOHNSTON, C., LEATH, C. A., III, LIU, J., MAHDI, H., MATEI, D., MCHALE, M., MCLEAN, K., O'MALLEY, D. M., PENSON, R. T., PERCAC-LIMA, S., RATNER, E., REMMENGA, S. W., SABBATINI, P., WERNER, T. L., ZSIROS, E., BURNS, J. L. & ENGH, A. M. 2019. NCCN Guidelines Insights: Ovarian Cancer, Version 1.2019. *J Natl Compr Canc Netw*, 17, 896-909.
- AYSAL, A., KARNEZIS, A., MEDHI, I., GRENERT, J. P., ZALOUDEK, C. J. & RABBAN, J. T. 2012. Ovarian endometrioid adenocarcinoma: incidence and clinical significance of the morphologic and immunohistochemical markers of mismatch repair protein defects and tumor microsatellite instability. *Am J Surg Pathol*, 36, 163-72.
- BAILEY, M. H., TOKHEIM, C., PORTA-PARDO, E., SENGUPTA, S., BERTRAND, D., WEERASINGHE, A., COLAPRICO, A., WENDL, M. C., KIM, J., REARDON, B., NG, P. K., JEONG, K. J., CAO, S., WANG, Z., GAO, J., GAO, Q., WANG, F., LIU, E. M., MULARONI, L., RUBIO-PEREZ, C., NAGARAJAN, N., CORTÉS-CIRIANO, I., ZHOU, D. C., LIANG, W. W., HESS, J. M., YELLAPANTULA, V. D., TAMBORERO, D., GONZALEZ-PEREZ, A., SUPHAVILAI, C., KO, J. Y., KHURANA, E., PARK, P. J., VAN ALLEN, E. M., LIANG, H., LAWRENCE, M. S., GODZIK, A., LOPEZ-BIGAS, N., STUART, J., WHEELER, D., GETZ, G., CHEN, K., LAZAR, A. J., MILLS, G. B., KARCHIN, R. & DING, L. 2018. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*, 173, 371-385.e18.
- BLUM, A., WANG, P. & ZENKLUSEN, J. C. 2018. SnapShot: TCGA-Analyzed Tumors. *Cell*, 173, 530.
- BOKHMAN, J. V. 1983. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 15, 10-7.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK 2011. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474, 609-15.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE, ANALYTICAL BIOLOGICAL SERVICES, BARRETOS CANCER HOSPITAL, BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE,

BECKMAN RESEARCH INSTITUTE OF CITY OF HOPE, BUCK INSTITUTE FOR RESEARCH ON AGING, CANADA'S MICHAEL SMITH GENOME SCIENCES CENTRE, HARVARD MEDICAL SCHOOL, HELEN F. GRAHAM CANCER CENTER & RESEARCH INSTITUTE AT CHRISTIANA CARE HEALTH SERVICES, HUDSONALPHA INSTITUTE FOR BIOTECHNOLOGY, ILSBIO, L., INDIANA UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE, INSTITUTE OF HUMAN VIROLOGY; INSTITUTE FOR SYSTEMS BIOLOGY, INTERNATIONAL GENOMICS CONSORTIUM; LEIDOS BIOMEDICAL, MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL; MCDONNELL GENOME INSTITUTE AT WASHINGTON UNIVERSITY, MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN; MEDICAL UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA, MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER, MONTEFIORE MEDICAL CENTER, NANTOMICS; NATIONAL CANCER INSTITUTE, NATIONAL HOSPITAL, A., NIGERIA,, NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES, NATIONAL INSTITUTE ON DEAFNESS & OTHER COMMUNICATION DISORDERS, ONTARIO TUMOUR BANK, L. H. S. C., ONTARIO TUMOUR BANK, O. I. F. C. R., ONTARIO TUMOUR BANK, T. O. H., OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY, SAMUEL OSCHIN COMPREHENSIVE CANCER INSTITUTE, C.-S. M. C., SRA INTERNATIONAL, ST JOSEPH'S CANDLER HEALTH SYSTEM, ELI & EDYTHE L. BROAD INSTITUTE OF MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY & HARVARD UNIVERSITY, RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL, SIDNEY KIMMEL COMPREHENSIVE CANCER CENTER AT JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, UNIVERSITY OF BERGEN; UNIVERSITY OF TEXAS MD ANDERSON CANCER CENTER, UNIVERSITY OF ABUJA TEACHING HOSPITAL, UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, UNIVERSITY OF CALIFORNIA, I. U. O. C. S. C., UNIVERSITY OF KANSAS MEDICAL CENTER, UNIVERSITY OF LAUSANNE, UNIVERSITY OF NEW MEXICO HEALTH SCIENCES CENTER, UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL, UNIVERSITY OF OKLAHOMA HEALTH SCIENCES CENTER, UNIVERSITY OF PITTSBURGH, UNIVERSITY OF SÃO PAULO, R. Ã. P. M. S., UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA; UNIVERSITY OF WASHINGTON, UNIVERSITY OF WISCONSIN SCHOOL OF MEDICINE & PUBLIC HEALTH & LOUIS, V. A. R. I. W. U. I. S. 2017. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*, 543, 378-384.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, KANDOTH, C., SCHULTZ, N., CHERNIACK, A. D., AKBANI, R., LIU, Y., SHEN, H., ROBERTSON, A. G., PASHTAN, I., SHEN, R., BENZ, C. C., YAU, C., LAIRD, P. W., DING, L., ZHANG, W., MILLS, G. B., KUCHERLAPATI, R., MARDIS, E. R. & LEVINE, D. A. 2013. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 497(7447), 67-73.

CHURCH, D. N., STELLOO, E., NOUT, R. A., VALTCHEVA, N., DEPREEUW, J., TER HAAR, N., NOSKE, A., AMANT, F., TOMLINSON, I. P., WILD, P. J., LAMBRECHTS, D., JURGENLIEMK-SCHULZ, I. M., JOBSEN, J. J.,

- SMIT, V. T., CREUTZBERG, C. L. & BOSSE, T. 2015. Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst*, 107, 402.
- COCHRANE, D. R., TESSIER-CLOUTIER, B., LAWRENCE, K. M., NAZERAN, T., KARNEZIS, A. N., SALAMANCA, C., CHENG, A. S., MCALPINE, J. N., HOANG, L. N., GILKS, C. B. & HUNTSMAN, D. G. 2017. Clear cell and endometrioid carcinomas: are their differences attributable to distinct cells of origin? *J Pathol*, 243, 26-36.
- COLOMBO, N., SESSA, C., DU BOIS, A., LEDERMANN, J., MCCLUGGAGE, W. G., MCNEISH, I., MORICE, P., PIGNATA, S., RAY-COQUARD, I., VERGOTE, I., BAERT, T., BELAROUSSI, I., DASHORA, A., OLBRECHT, S., PLANCHAMP, F., QUERLEU, D. & ESMO-ESGO OVARIAN CANCER CONSENSUS CONFERENCE WORKING GROUP 2019. ESMO-ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent diseasedagger. *Ann Oncol*, 30, 672-705.
- CONCIN, N., MATIAS-GUIU, X., VERGOTE, I., CIBULA, D., MIRZA, M. R., MARNITZ, S., LEDERMANN, J., BOSSE, T., CHARGARI, C., FAGOTTI, A., FOTOPOULOU, C., GONZALEZ MARTIN, A., LAX, S., LORUSSO, D., MARTH, C., MORICE, P., NOUT, R. A., O'DONNELL, D., QUERLEU, D., RASPOLLINI, M. R., SEHOULI, J., STURDZA, A., TAYLOR, A., WESTERMANN, A., WIMBERGER, P., COLOMBO, N., PLANCHAMP, F. & CREUTZBERG, C. L. 2021. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, 31, 12-39.
- CYBULSKA, P., PAULA, A. D. C., TSENG, J., LEITAO, M. M., JR., BASHASHATI, A., HUNTSMAN, D. G., NAZERAN, T. M., AGHAJANIAN, C., ABU-RUSTUM, N. R., DELAIR, D. F., SHAH, S. P. & WEIGELT, B. 2019. Molecular profiling and molecular classification of endometrioid ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol*, 154, 516-523.
- DE NEDERLANDSE VERENIGING VOOR OBSTETRIE EN GYNAECOLOGIE (NVOG). 2022. *RAINBO: Refining Adjuvant treatment IN endometrial cancer Based On molecular features, TransPORTEC platform trials* [Online]. <https://www.nvog.nl/koepels-en-pijlers/pijler-oncologie/dgog/lopende-studies/rainbo/>. [Accessed 13/02/2022].
- DU BOIS, A., NEIJT, J. P. & THIGPEN, J. T. 1999. First line chemotherapy with carboplatin plus paclitaxel in advanced ovarian cancer--a new standard of care? *Ann Oncol*, 10 Suppl 1, 35-41.
- DUSKA, L. R. & KOHN, E. C. 2017. The new classifications of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and their clinical implications. *Annals of Oncology*, 28, viii8-viii12.
- FLUIDIGM CORPORATION. 2019. *Access Array System for Illumina Sequencing Systems User Guides* [Online]. <https://jp.fluidigm.com/binaries/content/documents/fluidigm/resources/aa-illumina-100-3770/aa-illumina-100-3770/fluidigm%3Afile>. [Accessed 19/04/2020].

- GILKS, C. B., OLIVA, E. & SOSLOW, R. A. 2013. Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 37, 874-81.
- GIUSTOZZI, A., SALUTARI, V., GIUDICE, E., MUSACCHIO, L., RICCI, C., LANDOLFO, C., PERRI, M. T., SCAMBIA, G. & LORUSSO, D. 2021. Refining Adjuvant Therapy for Endometrial Cancer: New Standards and Perspectives. *Biology (Basel)*, 10.
- GROEN, R. S., GERSHENSON, D. M. & FADER, A. N. 2015. Updates and emerging therapies for rare epithelial ovarian cancers: one size no longer fits all. *Gynecol Oncol*, 136, 373-83.
- GUO, X., JO, V. Y., MILLS, A. M., ZHU, S. X., LEE, C. H., ESPINOSA, I., NUCCI, M. R., VARMA, S., FORGÓ, E., HASTIE, T., ANDERSON, S., GANJOO, K., BECK, A. H., WEST, R. B., FLETCHER, C. D. & VAN DE RIJN, M. 2015. Clinically Relevant Molecular Subtypes in Leiomyosarcoma. *Clin Cancer Res*, 21, 3501-11.
- HAN, H. Y., MOU, J. T., JIANG, W. P., ZHAI, X. M. & DENG, K. 2021. Five candidate biomarkers associated with the diagnosis and prognosis of cervical cancer. *Biosci Rep*, 41.
- HOANG, L. N., MCCONECHY, M. K., KOBEL, M., ANGLÉSIO, M., SENZ, J., MAASSEN, M., KOMMOSS, S., MENG, B., POSTOVIT, L., KELEMEN, L. E., STAEBLER, A., BRUCKER, S., KRAMER, B., MCALPINE, J. N., GILKS, C. B., HUNTSMAN, D. G. & LEE, C. H. 2015. Polymerase Epsilon Exonuclease Domain Mutations in Ovarian Endometrioid Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, 25, 1187-93.
- ILLUMINA INC. 2018. *MiSeq System Guide* [Online]. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-system-guide-for-miseq-reporter-100000061014-00.pdf. [Accessed 19/04/2020].
- ILLUMINA INC. 2019. *MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide* [Online]. <https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/systemdocumentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-06.pdf>. [Accessed 19/04/2020].
- JAWHAR, N. M. 2009. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med*, 29, 123-7.
- JAYSON, G. C., KOHN, E. C., KITCHENER, H. C. & LEDERMANN, J. A. 2014. Ovarian cancer. *Lancet*, 384, 1376-88.
- KOBEL, M., KALLOGER, S. E., HUNTSMAN, D. G., SANTOS, J. L., SWENERTON, K. D., SEIDMAN, J. D., GILKS, C. B. & CHERYL BROWN OVARIAN CANCER OUTCOMES UNIT OF THE BRITISH COLUMBIA CANCER AGENCY, V. B. C. 2010. Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol*, 29, 203-11.
- KOBEL, M., RAHIMI, K., RAMBAU, P. F., NAUGLER, C., LE PAGE, C., MEUNIER, L., DE LADURANTAYE, M., LEE, S., LEUNG, S., GOODE, E. L., RAMUS, S. J., CARLSON, J. W., LI, X., EWANOWICH, C. A., KELEMEN, L. E., VANDERHYDEN, B., PROVENCHER, D., HUNTSMAN, D., LEE, C. H., GILKS, C. B. & MES MASSON, A. M. 2016. An

- Immunohistochemical Algorithm for Ovarian Carcinoma Typing. *Int J Gynecol Pathol*, 35, 430-41.
- KOMMOSS, F. & GILKS, C. B. 2017. Pathology of Ovarian Cancer: Recent Insights Unveiling Opportunities in Prevention. *Clin Obstet Gynecol*, 60, 686-696.
- KOMMOSS, S., GILKS, C. B., DU BOIS, A. & KOMMOSS, F. 2016. Ovarian carcinoma diagnosis: the clinical impact of 15 years of change. *Br J Cancer*, 115, 993-999.
- KOMMOSS, S., MCCONECHY, M. K., KOMMOSS, F., LEUNG, S., BUNZ, A., MAGRILL, J., BRITTON, H., KOMMOSS, F., GREVENKAMP, F., KARNEZIS, A., YANG, W., LUM, A., KRAMER, B., TARAN, F., STAEBLER, A., LAX, S., BRUCKER, S. Y., HUNTSMAN, D. G., GILKS, C. B., MCALPINE, J. N. & TALHOUK, A. 2018. Final validation of the ProMisE molecular classifier for endometrial carcinoma in a large population-based case series. *Ann Oncol*, 29, 1180-1188.
- KRÄMER, P., TALHOUK, A., BRETT, M. A., CHIU, D. S., CAIRNS, E. S., SCHEUNHAGE, D. A., HAMMOND, R. F. L., FARNELL, D., NAZERAN, T. M., GRUBE, M., XIA, Z., SENZ, J., LEUNG, S., FEIL, L., PASTERNAK, J., DIXON, K., HARTKOPF, A., KRAMER, B., BRUCKER, S., HEITZ, F., DU BOIS, A., HARTEP, P., KOMMOSS, F. K. F., SINN, H. P., HEUBLEIN, S., KOMMOSS, F., VOLLERT, H. W., MANCHANDA, R., DE KROON, C. D., NIJMAN, H. W., DE BRUYN, M., THOMPSON, E. F., BASHASHATI, A., MCALPINE, J. N., SINGH, N., TINKER, A. V., STAEBLER, A., BOSSE, T., KOMMOSS, S., KOBEL, M. & ANGLÉSIO, M. S. 2020. Endometrial Cancer Molecular Risk Stratification is Equally Prognostic for Endometrioid Ovarian Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 26, 5400-5410.
- KURMAN, R. J., CARCANGIU, M. L., HERRINGTON, C. S. & YOUNG, R. H. (eds.) 2014. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*, Lyon, France: IARC-WHO Press.
- LAVEN, P., BELTMAN, J. J., BENSE, J. E., VAN DER AA, M. A., VAN GORP, T., VOS, M. C., BOLL, D., ARTS, H., REESINK, N., TRIMBOS, J. B. & KRUITWAGEN, R. 2022. Incomplete surgical staging in clinical early-stage ovarian cancer: guidelines versus daily practice. *Surg Open Sci*, 7, 6-11.
- LE PAGE, C., RAHIMI, K., KOBEL, M., TONIN, P. N., MEUNIER, L., PORTELANCE, L., BERNARD, M., NELSON, B. H., BERNARDINI, M. Q., BARTLETT, J. M. S., BACHVAROV, D., GOTLIEB, W. H., GILKS, B., MCALPINE, J. N., NACHTIGAL, M. W., PICHE, A., WATSON, P. H., VANDERHYDEN, B., HUNTSMAN, D. G., PROVENCHER, D. M. & MESMASSON, A. M. 2018. Characteristics and outcome of the COEUR Canadian validation cohort for ovarian cancer biomarkers. *BMC Cancer*, 18, 347.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE & AWMF) 2016. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 2.0. <http://leitlinienprogramm->

onkologie.de/Ovarialkarzinom.61.0.html [Stand: 12.09.2018], AWMF-Registernummer: 032/035OL.

LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE & AWMF) 2020. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 4.0. <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Ovarialkarzinom.61.0.html> [Stand: 26.04.2020], AWMF-Registernummer: 032/035OL.

LEON-CASTILLO, A., BRITTON, H., MCCONECHY, M. K., MCALPINE, J. N., NOUT, R., KOMMOSS, S., BRUCKER, S. Y., CARLSON, J. W., EPSTEIN, E., RAU, T. T., BOSSE, T., CHURCH, D. N. & GILKS, C. B. 2020a. Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol*, 250, 323-335.

LEON-CASTILLO, A., GILVAZQUEZ, E., NOUT, R., SMIT, V. T., MCALPINE, J. N., MCCONECHY, M., KOMMOSS, S., BRUCKER, S. Y., CARLSON, J. W., EPSTEIN, E., RAU, T. T., SOSLOW, R. A., GANESAN, R., MATIAS-GUIU, X., OLIVA, E., HARRISON, B. T., CHURCH, D. N., GILKS, C. B. & BOSSE, T. 2020b. Clinicopathological and molecular characterisation of 'multiple-classifier' endometrial carcinomas. *J Pathol*, 250, 312-322.

MATSUMOTO, T., YAMAZAKI, M., TAKAHASHI, H., KAJITA, S., SUZUKI, E., TSURUTA, T. & SAEGUSA, M. 2015. Distinct beta-catenin and PIK3CA mutation profiles in endometriosis-associated ovarian endometrioid and clear cell carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 144, 452-63.

MCALPINE, J., LEON-CASTILLO, A. & BOSSE, T. 2018. The rise of a novel classification system for endometrial carcinoma; integration of molecular subclasses. *J Pathol*, 244, 538-549.

MCCONECHY, M. K., DING, J., SENZ, J., YANG, W., MELNYK, N., TONE, A. A., PRENTICE, L. M., WIEGAND, K. C., MCALPINE, J. N., SHAH, S. P., LEE, C. H., GOODFELLOW, P. J., GILKS, C. B. & HUNTSMAN, D. G. 2014. Ovarian and endometrial endometrioid carcinomas have distinct CTNNB1 and PTEN mutation profiles. *Mod Pathol*, 27, 128-34.

MCCONECHY, M. K., TALHOUK, A., LI-CHANG, H. H., LEUNG, S., HUNTSMAN, D. G., GILKS, C. B. & MCALPINE, J. N. 2015. Detection of DNA mismatch repair (MMR) deficiencies by immunohistochemistry can effectively diagnose the microsatellite instability (MSI) phenotype in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol*, 137, 306-10.

MEINHOLD-HEERLEIN, I., FOTOPOULOU, C., HARTEP, P., KURZEDER, C., MUSTEA, A., WIMBERGER, P., HAUPTMANN, S. & SEHOULI, J. 2015. Statement by the Kommission Ovar of the AGO: The New FIGO and WHO Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 75, 1021-1027.

MEINHOLD-HEERLEIN, I., FOTOPOULOU, C., HARTEP, P., KURZEDER, C., MUSTEA, A., WIMBERGER, P., HAUPTMANN, S. & SEHOULI, J. 2016. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet*, 293(4), 695-700.

- MINIG, L., HEITZ, F., CIBULA, D., BAKKUM-GAMEZ, J. N., GERMANOVA, A., DOWDY, S. C., KALOGERA, E., ZAPARDIEL, I., LINDEMANN, K., HARTEP, P., SCAMBIA, G., PETRILLO, M., ZORRERO, C., ZANAGNOLO, V., REBOLLO, J. M. C., DU BOIS, A. & FOTOPOULOU, C. 2017. Patterns of Lymph Node Metastases in Apparent Stage I Low-Grade Epithelial Ovarian Cancer: A Multicenter Study. *Annals of Surgical Oncology*, 24, 2720-2726.
- MURPHY, M. A. & WENTZENSEN, N. 2011. Frequency of mismatch repair deficiency in ovarian cancer: a systematic review This article is a US Government work and, as such, is in the public domain of the United States of America. *Int J Cancer*, 129, 1914-22.
- PALACIOS, J. & GAMALLO, C. 1998. Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res*, 58, 1344-7.
- PARRA-HERRAN, C., LERNER-ELLIS, J., XU, B., KHALOUEI, S., BASSIOUNY, D., CESARI, M., ISMIIL, N. & NOFECH-MOZES, S. 2017. Molecular-based classification algorithm for endometrial carcinoma categorizes ovarian endometrioid carcinoma into prognostically significant groups. *Mod Pathol*, 30, 1748-1759.
- PRAT, J. 2012. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch*, 460, 237-49.
- RAMBAU, P. F., VIERKANT, R. A., INTERMAGGIO, M. P., KELEMEN, L. E., GOODMAN, M. T., HERPEL, E., PHAROAH, P. D., KOMMOSS, S., JIMENEZ-LINAN, M., KARLAN, B. Y., GENTRY-MAHARAJ, A., MENON, U., POLO, S. H., CANDIDO DOS REIS, F. J., DOHERTY, J. A., GAYTHER, S. A., SHARMA, R., LARSON, M. C., HARNETT, P. R., HATFIELD, E., DE ANDRADE, J. M., NELSON, G. S., STEED, H., SCHILDKRAUT, J. M., CARNEY, M. E., HOGDALL, E., WHITTEMORE, A. S., WIDSCHWENDTER, M., KENNEDY, C. J., WANG, F., WANG, Q., WANG, C., ARMASU, S. M., DALEY, F., COULSON, P., JONES, M. E., ANGLÉSIO, M. S., CHOW, C., DE FAZIO, A., GARCIA-CLOSAS, M., BRUCKER, S. Y., CYBULSKI, C., HARRIS, H. R., HARTKOPF, A. D., HUZARSKI, T., JENSEN, A., LUBINSKI, J., OSZUREK, O., BENITEZ, J., MINA, F., STAEBLER, A., TARAN, F. A., PASTERNAK, J., TALHOUK, A., ROSSING, M. A., HENDLEY, J., GROUP, A., EDWARDS, R. P., FEREDAY, S., MODUGNO, F., NESS, R. B., SIEH, W., EL-BAHRAWY, M. A., WINHAM, S. J., LESTER, J., KJAER, S. K., GRONWALD, J., SINN, P., FASCHING, P. A., CHANG-CLAUDE, J., MOYSICH, K. B., BOWTELL, D. D., HERNANDEZ, B. Y., LUK, H., BEHRENS, S., SHAH, M., JUNG, A., GHATAGE, P., ALSOP, J., ALSOP, K., GARCIA-DONAS, J., THOMPSON, P. J., SWERDLOW, A. J., KARPINSKYJ, C., CAZORLA-JIMENEZ, A., GARCIA, M. J., DEEN, S., WILKENS, L. R., PALACIOS, J., BERCHUCK, A., KOZIAK, J. M., BRENTON, J. D., COOK, L. S., GOODE, E. L., HUNTSMAN, D. G., RAMUS, S. J. & KOBEL, M. 2018. Association of p16 expression with prognosis varies across ovarian carcinoma histotypes: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *J Pathol Clin Res*, 4, 250-261.

- REIJNEN, C., KÜSTERS-VANDEVELDE, H. V. N., PRINSEN, C. F., MASSUGER, L. F. M. L., SNIJDERS, M. P. M. L., KOMMOSS, S., BRUCKER, S. Y., KWON, J. S., MCALPINE, J. N. & PIJNENBORG, J. M. A. 2019. Mismatch repair deficiency as a predictive marker for response to adjuvant radiotherapy in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 154, 124-130.
- RODOLAKIS, A., THOMAKOS, N., AKRIVOS, N., SOTIROPOULOU, M., IOANNIDIS, I., HAIDOPOULOS, D., VLACHOS, G. & ANTSAKLIS, A. 2012. Clinicopathologic insight of simultaneously detected primary endometrial and ovarian carcinomas. *Arch Gynecol Obstet*, 285, 817-21.
- ROTH, R. M., HARALDSDOTTIR, S., HAMPEL, H., ARNOLD, C. A. & FRANKEL, W. L. 2016. Discordant Mismatch Repair Protein Immunoreactivity in Lynch Syndrome-Associated Neoplasms: A Recommendation for Screening Synchronous/Metachronous Neoplasms. *Am J Clin Pathol*, 146, 50-6.
- SCHULTHEIS, A. M., NG, C. K., DE FILIPPO, M. R., PISCUOGLIO, S., MACEDO, G. S., GATIUS, S., PEREZ MIES, B., SOSLOW, R. A., LIM, R. S., VIALE, A., HUBERMAN, K. H., PALACIOS, J. C., REIS-FILHO, J. S., MATIAS-GUIU, X. & WEIGELT, B. 2016. Massively Parallel Sequencing-Based Clonality Analysis of Synchronous Endometrioid Endometrial and Ovarian Carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 108, djv427.
- SINGER, G., OLDT, R., 3RD, COHEN, Y., WANG, B. G., SIDRANSKY, D., KURMAN, R. J. & SHIH IE, M. 2003. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 95, 484-6.
- STELLOO, E., JANSEN, A. M. L., OSSE, E. M., NOUT, R. A., CREUTZBERG, C. L., RUANO, D., CHURCH, D. N., MORREAU, H., SMIT, V., VAN WEZEL, T. & BOSSE, T. 2017. Practical guidance for mismatch repair-deficiency testing in endometrial cancer. *Ann Oncol*, 28, 96-102.
- STELLOO, E., NOUT, R. A., OSSE, E. M., JURGENLIEMK-SCHULZ, I. J., JOBSEN, J. J., LUTGENS, L. C., VAN DER STEEN-BANASIK, E. M., NIJMAN, H. W., PUTTER, H., BOSSE, T., CREUTZBERG, C. L. & SMIT, V. T. 2016. Improved Risk Assessment by Integrating Molecular and Clinicopathological Factors in Early-stage Endometrial Cancer-Combined Analysis of the PORTEC Cohorts. *Clin Cancer Res*, 22, 4215-24.
- TALHOUK, A., MCCONECHY, M. K., LEUNG, S., LI-CHANG, H. H., KWON, J. S., MELNYK, N., YANG, W., SENZ, J., BOYD, N., KARNEZIS, A. N., HUNTSMAN, D. G., GILKS, C. B. & MCALPINE, J. N. 2015. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer*, 113, 299-310.
- TALHOUK, A., MCCONECHY, M. K., LEUNG, S., YANG, W., LUM, A., SENZ, J., BOYD, N., PIKE, J., ANGLÉSIO, M., KWON, J. S., KARNEZIS, A. N., HUNTSMAN, D. G., GILKS, C. B. & MCALPINE, J. N. 2017. Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. *Cancer*, 123, 802-813.
- TRIMBOS, J. B., VERGOTE, I., BOLIS, G., VERMORKEN, J. B., MANGIONI, C., MADRONAL, C., FRANCHI, M., TATEO, S., ZANETTA, G., SCARFONE,

- G., GIURGEA, L., TIMMERS, P., COENS, C. & PECORELLI, S. 2003. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst*, 95, 113-25.
- VAN DEN HEERIK, A., HOREWEG, N., NOUT, R. A., LUTGENS, L., VAN DER STEEN-BANASIK, E. M., WESTERVELD, G. H., VAN DEN BERG, H. A., SLOT, A., KOPPE, F. L. A., KOMMOSS, S., MENS, J. W. M., NOWEE, M. E., BIJMOLT, S., CIBULA, D., STAM, T. C., JURGENLIEMK-SCHULZ, I. M., SNYERS, A., HAMANN, M., ZWANENBURG, A. G., COEN, V., VANDECASTEELE, K., GILLHAM, C., CHARGARI, C., VERHOEVEN-ADEMA, K. W., PUTTER, H., VAN DEN HOUT, W. B., WORTMAN, B. G., NIJMAN, H. W., BOSSE, T. & CREUTZBERG, C. L. 2020. PORTEC-4a: international randomized trial of molecular profile-based adjuvant treatment for women with high-intermediate risk endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 30, 2002-2007.
- VERHAAK, R. G., TAMAYO, P., YANG, J. Y., HUBBARD, D., ZHANG, H., CREIGHTON, C. J., FEREDAY, S., LAWRENCE, M., CARTER, S. L., MERMEL, C. H., KOSTIC, A. D., ETEMADMOGHADAM, D., SAKSENA, G., CIBULSKIS, K., DURAISAMY, S., LEVANON, K., SOUGNEZ, C., TSHERNIAK, A., GOMEZ, S., ONOFRIO, R., GABRIEL, S., CHIN, L., ZHANG, N., SPELLMAN, P. T., ZHANG, Y., AKBANI, R., HOADLEY, K. A., KAHN, A., KÖBEL, M., HUNTSMAN, D., SOSLOW, R. A., DEFAZIO, A., BIRRER, M. J., GRAY, J. W., WEINSTEIN, J. N., BOWTELL, D. D., DRAPKIN, R., MESIROV, J. P., GETZ, G., LEVINE, D. A. & MEYERSON, M. 2013. Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Clin Invest*, 123, 517-25.
- WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD 2020. Female Genital Tumours. 5th Ed.: International Agency for Research on Cancer Lyon, France.
- WIEGAND, K. C., SHAH, S. P., AL-AGHA, O. M., ZHAO, Y., TSE, K., ZENG, T., SENZ, J., MCCONECHY, M. K., ANGLÉSIO, M. S., KALLOGER, S. E., YANG, W., HERAVI-MOUSSAVI, A., GIULIANY, R., CHOW, C., FEE, J., ZAYED, A., PRENTICE, L., MELNYK, N., TURASHVILI, G., DELANEY, A. D., MADORE, J., YIP, S., MCPHERSON, A. W., HA, G., BELL, L., FEREDAY, S., TAM, A., GALLETTA, L., TONIN, P. N., PROVENCHER, D., MILLER, D., JONES, S. J., MOORE, R. A., MORIN, G. B., OLOUMI, A., BOYD, N., APARICIO, S. A., SHIH IE, M., MES-MASSON, A. M., BOWTELL, D. D., HIRST, M., GILKS, B., MARRA, M. A. & HUNTSMAN, D. G. 2010. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med*, 363, 1532-43.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die hier vorgelegte Doktorarbeit wurde im Department für Frauengesundheit der Universitätsklinik Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Stefan Kommos angefertigt. Im Rahmen meines neunmonatigen Forschungsaufenthaltes an der University of British Columbia (UBC), Vancouver war ich darüber hinaus in der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Anglesio tätig.

Konzipiert und initiiert wurde die Studie durch Prof. Dr. med. Stefan Kommos, Leitender Oberarzt im Department für Frauengesundheit der Universitätsklinik Tübingen und dessen Kooperationspartner Michael Anglesio, Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynaecology, University of British Columbia, OVCARE @ Robert HN Ho Research Centre, BCCA Cancer Research Centre, Department of Molecular Oncology, Vancouver, CA, sowie Aline Talhouk, Assistant Professor of Obstetrics and Gynecology, University of British Columbia, OVCARE @ Robert HN Ho Research Centre, BCCA Cancer Research Centre, Vancouver.

Im Rahmen der von mir persönlich durchgeführten Arbeitsschritte war ich zunächst insbesondere mit der Etablierung des Tübinger Studienkollektivs betraut. Dies beinhaltete unter anderem die folgenden Arbeitsschritte: Sichtung sämtlicher Tübinger Originalschnitte, Überprüfung der initialen Diagnose und Auswahl geeigneter Tumorblöcke (gemeinsam mit PD Dr. Annette Staebler, Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen), Heraussuchen der FFPE-Blöcke im Archiv des Instituts für Pathologie, Anfertigung von H.E.-Schnitten und Markierung geeigneter Tumoranteile auf den H.E.-Schnitten und FFPE-Blöcken für die Erstellung des Tübinger TMAs. Die letztgenannten Arbeitsschritte habe ich ebenso für die Fälle aus Friedrichshafen und Essener übernommen.

Als Koordinatorin der internationalen Multicenterstudie war ich darüber hinaus gemeinsam mit Samuel Leung für die Zusammenführung der Studienkollektive und mit Michael Anglesio für die Koordination der Daten- bzw. Materialübersendung sowie die abschließende Überprüfung der zur Verfügung gestellten klinischen Daten zuständig.

Die Anfertigung der TMAs erfolgte durch Angela Cheng, UBC, Vancouver. Die zentralen immunhistochemischen Färbungen und deren Auswertung wurden von Professor Dr. Martin Köbel und Mary Anne Brett, University of Calgary, Canada durchgeführt.

Sämtliche Laborarbeiten zur zentralen POLE-Mutationstestung wurden durch mich (Fälle aus Tübingen, Essen und Friedrichshafen) und Evan Cairns (Fälle aus Kanada) durchgeführt. Unterstützt wurden wir hierbei durch Janine Senz, UBC, Vancouver (Einarbeitung und Primerdesign). Die DNA-Sequenz wurde von mir unter Anleitung von Michael Anglesio und Katherine Dixon analysiert.

Die Datenanalyse und Statistik erfolgte gemeinsam mit Michael Anglesio, Aline Talhouk, Derek Chiu und Samuel Leung.

Ich versichere, das vorliegende Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Original Papers:

Krämer, P., Talhouk, A., Brett, M. A., Chiu, D. S., Cairns, E. S., Scheunhage, D. A., Hammond, R. F., Farnell, D., Nazeran, T. M., Grube, M., Xia, Z., Senz, J., Leung, S., Feil, L., Pasternak, J., Dixon, K., Hartkopf, A., Krämer, B., Brucker, S., Heitz, F., Du Bois, A., Harter, P., Kommoss, F., Sinn, H. P., Heublein, S., Kommoss, F., Vollert, H. W., Manchanda, R., De Kroon, C. D., Nijman, H. W., De Bruyn, M., Thompson, E. F., Bashashati, A., Mcalpine, J. N., Singh, N., Tinker, A. V., Staebler, A., Bosse, T., Kommoss, S., Köbel, M. & Anglesio, M. S. 2020. Endometrial Cancer Molecular Risk Stratification is Equally Prognostic for Endometrioid Ovarian Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 26. 5400-5410.

Abstracts:

Brett, M.A., Cairns, E., Chiu, D., **Haag, P.**, Farnell, D., Senz, J., Leung, S., Staebler, A., McAlpine, J.N., Kommoss, S., Talhouk, A., Köbel, M., Anglesio, M.S. 2019. Abstracts from USCAP 2019: Optimized molecular risk stratification for ovarian endometrioid carcinomas (1007). *Modern Pathology* 32 (2): 1-140.

Krämer, P., Talhouk, A., Bosse, T., Heitz, F., Singh, N., Kommoss, F., Krämer, B., Hartkopf, A., Brucker, S., McAlpine, J., Koebel, M., Anglesio, M., Kommoss, S. 2019. Translating endometrial molecular risk stratification to endometrioid ovarian carcinoma: a novel application of precision medicine. *International Journal of Gynecologic Cancer* 29 (Suppl 3): A2.

Krämer, P., Talhouk, A., Bosse, T., Heitz, F., Prader, S., Singh, N., Kommoss, F., Krämer, B., Hartkopf, A., Brucker, S., McAlpine, J., Koebel, M., Anglesio, M., Kommoss, S. 2019. Application of precision medicine: can molecular risk stratification provide new management options for low stage endometrioid ovarian carcinoma? *International Journal of Gynecologic Cancer* 29 (Suppl 4): A37.

9. Danksagungen

Zunächst gilt mein ausdrücklicher Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Stefan Kommos, der mir durch die Ermöglichung dieser Arbeit und die damit verbundene Zeit in Vancouver neben der fachlichen Weiterentwicklung zu einer sehr prägenden Erfahrung sowohl für mein berufliches als auch privates Leben verholfen hat.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Michael Anglesio und Prof. Aline Talhouk, die mich während und auch nach meiner Zeit in Vancouver zu jeder Zeit unterstützten und mir durch ihre wertschätzende Art weitreichende Einblicke in die medizinische Forschung ermöglichten.

Danken möchte ich auch Prof. David Huntsman, Prof. Jessica McAlpine, Prof. Martin Köbel, Prof. Dr. med. Sara Brucker, Prof. Dr. med. Friedrich Kommos und PD Dr. med. Florian Heitz.

Des Weiteren möchte ich mich bei Maddy, Dave, JP, Amy, Janine, Winnie, Derek, Sam, Jamie und Jessica, sowie Natasha, Irene, PA, Isabel, Javier, Saki, Ro, Liam, Theresa, Sarah, Brigitte und vielen mehr für eine unvergessliche Zeit in Vancouver im Labor und weit darüber hinaus bedanken.

Für die Unterstützung während meiner Zeit im Tübinger Labor der Pathologie geht mein Dank an PD Dr. med. Annette Staebler, Christine Beschorner und Karen Greif. Darüber hinaus gilt mein Dank insbesondere Marcel.

Ich danke allen Patientinnen, die ihre Gewebeproben und ihre klinischen Daten für diese Forschungsarbeit zur Verfügung gestellt haben.

Ein herzlicher Dank geht an Chrisi für ihre unübertroffene Schnelligkeit und Genauigkeit.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich schon von klein auf in meiner Neugierde für neue Orte und neue Menschen unterstützen und mir immer wieder einen sicheren Hafen bieten.

Für die Begleitung durch alle Hochs und Tiefs dieser Arbeit und meines gesamten Studiums geht mein Dank an Charlotte, Anna, Marlene, Simon, Kathi, Elisa, Katha, Matze, Pia, Lukas, sowie an Bella und Theri und an meine Geschwister Judith und Jakob.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Moritz für sein Vertrauen, die Ermutigung und Unterstützung in meiner Zeit in Vancouver, seine Liebe und Geduld in allen Lebenslagen und insbesondere in der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.