

Universitätsfrauenklinik Tübingen  
Department für Frauengesundheit

**Mutationsspezifische Sequenzierung krebsassoziierter  
Gene in tief infiltrierender und oberflächlicher  
Endometriose**

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

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

**vorgelegt von  
Praetorius, Teresa Henriette**

**2026**

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Pichler

1. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. Stefan Kommos

2. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. O. Rieß

Tag der Disputation:

28.01.2026

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Überblick.....	1
1.2	Endometriosetypen.....	2
1.3	Ätiopathogenese.....	3
1.3.1	Retrograde Menstruation.....	3
1.3.2	Zöliom-Metaplasie .....	4
1.3.3	Lymphatische und vaskuläre Metastasierung .....	5
1.4	Klassifikation.....	5
1.5	Endometriose-assoziierte Ovarialkarzinome .....	7
1.6	Krebsassoziierte Mutationen in Endometriose .....	9
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	11
2	Material und Methoden .....	12
2.1	Ethikvotum.....	12
2.2	Erstellung des Studienkollektivs .....	12
2.3	Vorbereitung der DNA-Extraktion .....	13
2.3.1	Herstellung von Schnittpräparaten .....	13
2.3.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung .....	14
2.3.3	Makrodissektion der Endometrioseherde.....	15
2.4	DNA Extraktion .....	16
2.5	Bestimmung der DNA Konzentration.....	16
2.6	Mutationsspezifische DNA Sequenzierung .....	17
2.6.1	Auswertung .....	19
2.7	ddPCR Validierung .....	19
2.7.1	Verwendete Primer und Assays .....	20
2.7.2	Präamplifikation .....	23

2.7.3	Droplet Generierung und Quantifizierung.....	23
2.7.4	Auswertung .....	24
2.8	Immunhistochemische Färbungen .....	24
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Studienkollektiv.....	26
3.2	Patientencharakteristika .....	27
3.3	Überblick.....	29
3.4	Panel Sequenzierung und ddPCR.....	30
3.4.1	Betroffene Gene .....	32
3.5	Immunhistochemie .....	32
3.6	Klonale Beziehungen.....	35
3.6.1	Fälle ohne klonale Beziehungen .....	35
3.6.2	Fälle mit einfachen klonalen Beziehungen.....	36
3.6.3	Fälle mit komplexen klonalen Beziehungen .....	36
3.7	Verteilung über Läsionstypen .....	38
4	Diskussion .....	39
4.1	Betroffene Endometriose Typen .....	39
4.2	Klonale Beziehungen.....	40
4.3	Mögliche Disseminationswege .....	41
4.4	Limitationen .....	47
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	47
5	Zusammenfassung .....	50
6	Literaturverzeichnis.....	52
7	Erklärung zum Eigenanteil.....	60
8	Veröffentlichungen.....	62
9	Danksagung.....	63

10 Anhang .....	66
-----------------	----

## Abkürzungsverzeichnis

ARID1A	AT-rich interaction domain 1A
CCOC	klarzelliges Ovarialkarzinom
ddPCR	digital droplet Polymerasekettenreaktion
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuklease
EAOC	Endometriose-assoziiertes Ovarialkarzinom
EFI	Endometriosis Fertility Index
EM	oberflächliche Endometriose
EnOC	endometrioides Ovarialkarzinom
EtOH	Ethanol
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GWAS	Genome-wide association study
HE	Hämatoxylin-Eosin
IHC	Immunohistochemie
Llg.	Ligamentum
M.	Musculus
Min	Minute
ml	Milliliter
mut	mutiert
NGS	Next generation sequencing
OMA	Endometriom

PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
ProK	Proteinkinase K
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
rASRM	revised American Society for Reproductive Medicine
RNase	Ribonuklease
Sacrout.	Sacruterinum
Sec	Sekunde
TIE	tief infiltrierende Endometriose
VAF	Variant allele frequency
Wt	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Überblick

Endometriose ist definiert als das Vorkommen von Epithel und Stroma endometrialer Herkunft außerhalb des Cavum uteri (Vercellini et al., 2014, Giudice and Kao, 2004). Es handelt sich um eine chronisch-inflammatorische, östrogen-abhängige Erkrankung (Vercellini et al., 2014), von der bis zu 10% der Frauen im gebärfähigen Alter betroffen sind (Eskenazi and Warner, 1997). Weltweit sind geschätzt 176 Millionen Frauen an Endometriose erkrankt (Adamson et al., 2010). Die Diagnose kann erhebliche negative Folgen für die Lebensqualität und Arbeitsfähigkeit der Betroffenen haben (Nnoaham et al., 2011).

Die klinische Präsentation von Endometriose ist sehr heterogen und oft unspezifisch (Zondervan et al., 2020). Die Hauptsymptome sind Schmerzen und Infertilität. Die Beschwerden der Betroffenen beinhalten unter anderem Dysmenorrhoe, Dyspareunie, Dyschezie, Dysurie, Hämaturie oder Hämatochezie und sind nicht immer zyklusabhängig. Viele Erkrankte leiden unter einem Chronic Pelvic Pain Syndrom, das definiert wird als länger als sechs Monate bestehender, persistierender, nicht zyklusabhängiger Schmerz im Bereich des Beckens (Speer et al., 2016). Bis zu 80% der Patientinnen mit diesem Syndrom leiden an Endometriose (As-Sanie et al., 2016).

Der Goldstandard zur Sicherung der Verdachtsdiagnose Endometriose ist die diagnostische Laparoskopie mit histologischer Sicherung der Diagnose (Burghaus et al., 2021). Aufgrund der oft unspezifischen Symptome und der Notwendigkeit einer invasiven Diagnosesicherung kommt es in vielen Fällen zu erheblichen Verzögerungen der Diagnosestellung (Agarwal et al., 2019). In Deutschland und Österreich dauert es rund 10 Jahre vom Einsetzen der

Symptome bis zur Diagnosestellung (Hudelist et al., 2012). Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass Endometriose häufig unterdiagnostiziert wird (Morassutto et al., 2016). Über 70% der Patientinnen erhalten zunächst mindestens eine falsche Diagnose (Hudelist et al., 2012).

Die Therapie von Endometriose besteht aus zwei Säulen, der medikamentösen und der operativen Therapie. Diese können auch miteinander kombiniert werden. Die Therapie sollte möglichst interdisziplinär und in einem zertifizierten Endometriosezentrum erfolgen (Ebert et al., 2013). In der medikamentösen Erstlinientherapie kommen Gestagene zum Einsatz. Darüber hinaus werden unter anderem kombinierte orale Kontrazeptiva, und GnRH-Analoga eingesetzt (Vercellini et al., 2014). In der operativen Therapie von Endometriose werden neben der chirurgischen Resektion auch ablativ Verfahren eingesetzt (Vercellini et al., 2014). Zur Behandlung endometriose-bedingter Schmerzen konnte weder für die medikamentöse, noch für die operative Therapie ein eindeutiger Vorteil nachgewiesen werden (Chaichian et al., 2017).

Auch nach kompletter chirurgischer Sanierung sind Rezidive häufig. Die Rezidivrate von Endometriose beträgt nach fünf Jahren 40-50% (Guo, 2009).

## 1.2 Endometriosetypen

Nach ihrer Lokalisation können drei Arten von Endometriose unterschieden werden:

- Endometriosis genitalis interna: Endometriosezellen im Myometrium, entspricht der Adenomyosis uteri
- Endometriosis genitalis externa: Endometrioseherde außerhalb des Uterus in den weiteren weiblichen Genitalien und im kleinen Becken, zum Beispiel Vagina, Douglas-Raum und Sakrouterinligamente

- Endometriosis extragenitalis: Endometrioseherde außerhalb des kleinen Beckens, beispielsweise an Blase oder Darm

Weiterhin unterscheidet man drei Typen von Endometrioseläsionen anhand ihres Wachstumsmusters (Dawson et al., 2018):

- Tief infiltrierende Endometriose (TIE)
- Oberflächliche / Peritoneale Endometriose (EM)
- Endometriozysten /Endometriome (OMA)

Tief infiltrierende Endometriose ist definiert als Endometrioseherde mit einer Invasionstiefe in das Peritoneum >5mm (Koninckx and Martin, 1994, Chapron et al., 2003).

## 1.3 Ätiopathogenese

Obwohl Endometriose ein so häufiges Krankheitsbild darstellt, das weitreichende gesellschaftliche und ökonomische Belastungen mit sich bringt (Chen et al., 2020, Nnoaham et al., 2011), sind die Hintergründe bis heute nur schlecht verstanden. Zu den diskutierten Theorien der Ätiologie und Pathogenese von Endometriose zählen retrograde Menstruation, Zölom-Metaplasie und lymphatische und vaskuläre Metastasierung (Zondervan et al., 2020). Bis heute kann keine dieser Theorien allein eine zufriedenstellende Erklärung für alle ätiopathogenetischen Aspekte von Endometriose bieten.

### 1.3.1 Retrograde Menstruation

Die Theorie der retrograden Menstruation wurde bereits 1927 durch Sampson aufgestellt (Sampson, 1927) und gilt heute als die Theorie mit dem größten Zuspruch (Zondervan et al., 2018). Demnach gelangen Fragmente des Endometriums durch die Tuben in die Bauchhöhle, wo sie dem Mesothel anhaften und in dieses eindringen (Sampson, 1927). Für diese Theorie spricht, dass eine frühe Menarche (Nnoaham et al., 2012), ein kurzer Zyklus (Missmer et

al., 2004) und Nulliparität (Peterson et al., 2013), also zusammenfassend häufige Menstruationen Risikofaktoren für Endometriose sind.

Endometriosläsionen im Bereich des Zwerchfells kommen häufiger an der rechten Zwerchfellkuppel vor (Vercellini et al., 2007). Dieses Phänomen kann durch eine Verteilung der endometrialen Zellen durch den im Uhrzeigersinn gerichteten Fluss der Peritonealflüssigkeit erklärt werden und unterstützt so ebenfalls die Theorie der retrograden Menstruation (Vercellini et al., 2007). Auch bei tiefinfiltrierenden Endometrioseherden konnte eine asymmetrische Verteilung entsprechend des Flusses der Peritonealflüssigkeit in der Bauchhöhle nachgewiesen werden (Chapron et al., 2006).

Bei rund 5% aller weiblichen Neugeborenen kommt es infolge des Entzugs plazentarer Steroidhormone zu einer neonatalen retrograden Menstruation (Brosens et al., 2013). Eine Entstehung von Endometriosläsionen nach dieser Blutung würde seltene Fälle von prämenarchaler Endometriose, sowie Fälle schwerer Endometriose bei Jugendlichen erklären (Gargett et al., 2014).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass retrograde Menstruation ein physiologischer Vorgang ist, von dem 90% der Frauen mit durchgängigen Tuben betroffen sind (Halme et al., 1984). Dieser Umstand macht deutlich, dass viele Faktoren einen Einfluss darauf haben, ob aus den regurgitierten Fragmenten Endometriose entsteht (Zondervan et al., 2018).

### **1.3.2 Zölom-Metaplasie**

Gemäß der Theorie der Zölom-Metaplasie kommt es zu einer metaplastischen Neuentstehung von Endometriumzellen (Ferguson et al., 1969) aus peritonealem Gewebe (Burney and Giudice, 2012). Neueren Erkenntnissen zufolge könnten bei diesen Prozessen multipotente mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (Du and Taylor, 2007), beziehungsweise aus dem Endometrium selbst stammend (Gargett and Masuda, 2010) eine entscheidende Rolle spielen.

Die Zöliom-Metaplasie könnte auch das Vorkommen von extraabdominellen Endometrioseläsionen, beispielsweise in der Lunge oder im Gehirn (Davis and Goldberg, 2017) erklären. Unterstützt wird diese Theorie auch dadurch, dass in sehr seltenen Fällen auch Männer an Endometriose erkranken (Taguchi et al., 2012).

### **1.3.3 Lymphatische und vaskuläre Metastasierung**

Laut dieser Hypothese werden endometriale Zellen durch das lymphatische und venöse System verschleppt (Zondervan et al., 2018). Diese Theorie kann ebenfalls das Vorkommen von Endometrioseläsionen außerhalb der Bauchhöhle erklären. Gestützt wird sie außerdem durch den Nachweis von endometrialen Zellen in pelvinen Wächterlymphknoten (Mechsner et al., 2008).

## **1.4 Klassifikation**

Die rASRM (1997) Klassifikation ist in der klinischen Anwendung am weitesten verbreitet. Hierbei werden für Läsionen im Bereich des Peritoneums und im Bereich der Ovarien anhand ihrer Größe Punkte vergeben. Für Adhäsionen an den Ovarien und Tuben werden analog Punkte vergeben. Zusätzlich werden noch Punkte für eine partielle oder komplette Obliteration des Douglas-Raums vergeben. Nach Addition aller vergebenen Punkte wird schließlich in vier Stadien eingeteilt:

- 1-5 Punkte : Stadium I (Minimal)
- 6-15 Punkte: Stadium II (Mild)
- 16-40 Punkte: Stadium III (Moderat)
- >40 Punkte: Stadium IV (Schwer)

Da tief infiltrierende Endometriose in der rASRM Klassifikation nicht repräsentiert wird, wurde die ENZIAN Klassifikation (Tuttles et al., 2005) mit dem Ziel einer sinnvollen Ergänzung der rASRM Klassifikation entwickelt (Haas et al., 2013).

Bei dieser Klassifikation wurden zunächst allerdings nur tiefinfiltrierende Endometriose, sowie extrapelvine Endometriosemanifestationen erfasst, die anhand ihrer anatomischen Lokalisation und Infiltrationstiefe eingeteilt wurden. So konnten die von tief infiltrierender Endometriose betroffenen Kompartimente erstmals relativ präzise wiedergespiegelt werden (Haas et al., 2013).

Um die systematische Beschreibung aller Typen von Endometriose in einer gemeinsamen Klassifikation zu etablieren, wurden die bisher bestehenden Komponenten in der #ENZIAN Klassifikation vereint (Keckstein et al., 2021) (Abbildung 1).

Im ersten Teil der Klassifikation werden im Wesentlichen die Informationen, die bisher durch die rASRM Klassifikation vermittelt werden konnten, wiedergegeben:

- P: Summe der Durchmesser aller oberflächlichen Endometrioseläsionen
- O: Summe der Durchmesser aller Endometrioseläsionen am jeweiligen Ovar (Endometriome)
- T: Tubo-ovarielle Situation, Durchgängigkeit der Tuben

Für die Klassifikation von tief infiltrierender Endometriose werden die retroperitonealen Strukturen in drei Kompartimente eingeteilt:

- A: Rectovaginales Septum und Vagina
- B: Ligamenta sacrouterina bis Beckenwand
- C: Rektum und Colon sigmoideum

Für jedes Kompartiment erfolgt nach Infiltrationstiefe der Endometrioseläsionen eine Einteilung in Schweregrade:

- Grad 1: <1cm Invasionstiefe

- Grad 2: 1-3cm Invasionstiefe
- Grad 3: >3cm Invasionstiefe

Zusätzlich können Organinfiltration und extrapelvine Läsionen mit dem Präfix F angegeben werden.

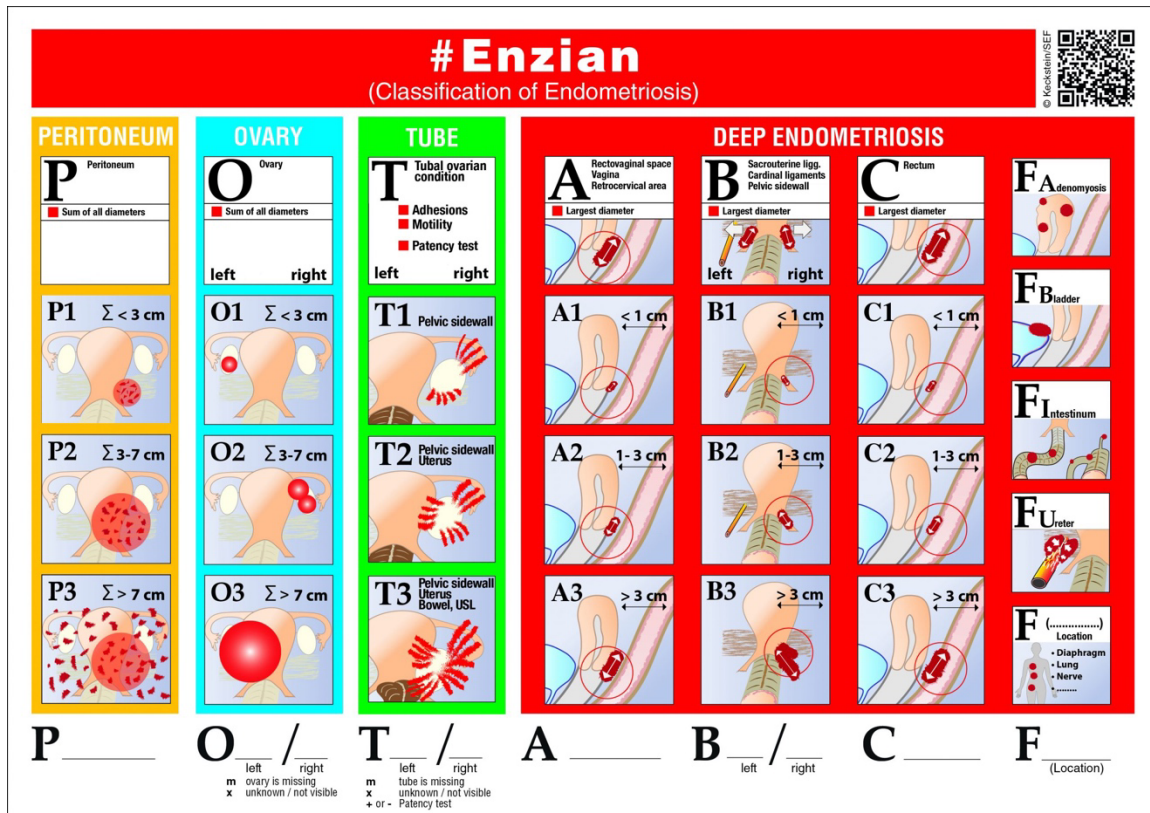


Abbildung 1 #ENZIAN Klassifikation für Endometriose, [https://endometriose-sef.de/dateien/ENZIAN\\_2013\\_web.pdf](https://endometriose-sef.de/dateien/ENZIAN_2013_web.pdf) [Zugriff 09.04.2025]

## 1.5 Endometriose-assoziierte Ovarialkarzinome

Obwohl die Entartungsrate von Endometriose insgesamt lediglich bei 1% liegt (Vercellini et al., 2014), konnte eine Assoziation zwischen Endometriose und Ovarialkarzinomen gezeigt werden (Brinton et al., 1997, Pearce et al., 2012, Merritt et al., 2013). Diese Assoziation besteht insbesondere mit endometrioiden Ovarialkarzinomen (EnOC) und klarzelligem Ovarialkarzinomen (CCOC), die auch als Endometriose-assoziierte Ovarialkarzinome (EAOC) bezeichnet werden

(Vercellini et al., 2012, Jimbo et al., 1997). Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken ist bei an Endometriose erkrankten Frauen 2-3fach höher als in der Allgemeinbevölkerung (Wei et al., 2011).

Endometriome konnten als Vorläuferläsionen von EOAC identifiziert werden (Anglesio et al., 2015, Anglesio and Yong, 2017). Eine Korrelation besteht insbesondere zu Endometriomen mit atypischen Endometriosearealen (LaGrenade and Silverberg, 1988, Fukunaga et al., 1997).

Mehrere Studien konnten klonale Beziehungen zwischen EOAC und Endometriose nachweisen (Anglesio et al., 2015, Wiegand et al., 2010). Wiegand et al. identifizierten identische AT-rich interaction domain 1A (ARID1A) Mutationen in EAOC und angrenzenden Endometriosearealen, nicht aber in anatomisch getrennten Endometrioseherden (Wiegand et al., 2010). ARID1A ist ein Tumorsuppressorgen, das wichtige Zellfunktionen reguliert (Wu et al., 2014). In einer Studie zu CCOC konnten identische Mutationen nicht nur in direkt angrenzenden, sondern teilweise auch in anatomisch getrennten Endometrioseläsionen beobachtet werden. Die erhobenen Daten sprechen für das Vorhandensein einer gemeinsamen Vorläuferläsion, die disseminiert ist (Anglesio et al., 2015). Die Autoren postulieren weiterhin, dass ARID1A und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA) Mutationen, die sowohl in Endometrioseläsionen, als auch im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnten, frühe Ereignisse in der Kanzerogenese darstellen (Anglesio et al., 2015). Auch Mutationen im Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) Gen konnten als frühe Ereignisse in der Entstehung von EAOC etabliert werden (Sato et al., 2000).

Darüber hinaus konnten in einer genome wide association Studie (GWAS) gemeinsame genetische Risikofaktoren für Endometriose und EAOC identifiziert werden (Lu et al., 2015).

## 1.6 Krebsassoziierte Mutationen in Endometriose

Trotz ihres insgesamt geringen Entartungspotentials teilt Endometriose viele Charakteristika mit malignen Erkrankungen. Unter anderem zählen hierzu, Neoangiogenese und eine Resistenz gegenüber Apoptose (Taylor et al., 2002, Delbandi et al., 2020).

Insbesondere tief infiltrierende Endometriose zeigt mit der Fähigkeit zur Invasion umliegender Gewebe eine weitere essentielle Eigenschaft von malignen Neoplasien (Hanahan and Weinberg, 2000).

Die Hintergründe dieser Eigenschaften von Endometriose sind jedoch bis heute nur schlecht verstanden.

Im Jahr 2017 konnten Anglesio et al. zeigen, dass krebsassoziierte Mutationen auch in tief infiltrierender Endometriose nachweisbar sind. Die Autoren konnten die sogenannten „Treibermutationen“ in knapp 26% identifizieren. Angesichts des niedrigen Entartungspotentials dieses Typs von Endometriose ein unerwartet hoher Prozentsatz.

In einer weiteren Arbeit konnte ein ähnliches Spektrum krebsassoziiertes Mutationen außerdem in einem vergleichbaren Anteil sogenannter iatrogenen Endometrioseläsionen nachgewiesen werden (Lac et al., 2019). Iatrogene Endometriose bezeichnet hier tief infiltrierende Endometrioseläsionen, die infolge operativer Eingriffe mit Eröffnung des Cavum uteri in den daraus resultierenden Narben nachweisbar sind (Lac et al., 2019, Kaloo et al., 2002).

Die Ergebnisse werfen die Frage auf, ob das Vorhandensein krebsassoziiertes Mutationen den ektopen endometrialen Zellen einen Überlebensvorteil bietet und so zumindest teilweise zu den oben beschriebenen Charakteristika tief infiltrierender Endometriose beiträgt (Anglesio et al., 2017, Lac et al., 2019).

Die reine Präsenz der sogenannten Treibermutationen scheint zumindest kein ausreichender Trigger für die maligne Entartung von Endometriose oder anderer Gewebe darzustellen (Anglesio et al., 2017, Lac et al., 2019). Dies wird unter anderem dadurch verdeutlicht, dass krebsassoziierte Mutationen bereits in einer

Vielzahl verschiedener benigner Gewebe beschrieben wurde (Martincorena and Campbell, 2015).

Während die Funktion der krebsassoziierten Mutationen in Endometriose somit unklar bleibt, können sie jedoch ein nützliches Instrument zur weiteren Untersuchung der Pathogenese von Endometriose darstellen.

## **1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Das Ziel der Doktorarbeit war die Überprüfung der folgenden zwei Hypothesen:

Hypothese 1: Somatische Mutationen in krebsassoziierten Genen können in allen Formen von Endometriose nachgewiesen werden.

Hypothese 2: In Patientinnen mit multiplen Endometrioseläsionen können ggf. vorhandene Mutationen in mehreren Gewebeproben nachgewiesen werden, auch wenn die jeweiligen Proben unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen entstammen und sich hinsichtlich des Infiltrationsmusters unterscheiden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Ethikvotum**

Vor Beginn der Durchführung dieser Studie wurde bei der Ethik-Kommission an der medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen ein Antrag auf ein Ethikvotum eingereicht. Es erging ein positiver Bescheid (652/2018BO2) der Ethik-Kommission.

### **2.2 Erstellung des Studienkollektivs**

Zunächst wurde das Studienkollektiv wie folgt definiert:

Patientinnen, die zwischen 2005 und 2017 an der Universitätsfrauenklinik Tübingen aufgrund von Endometriose mit Resektion von mindestens zwei anatomisch getrennten Endometrioseläsionen mit unterschiedlichem Infiltrationsmuster (tief infiltrierend, oberflächlich, Endometriom) operiert wurden.

Anschließend wurden folgende Einschlusskriterien festgelegt:

- Verfügbarkeit von Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Schnittpräparaten und Formalin-fixiert Paraffin-eingebetteten (FFPE) Blöcken sämtlicher Läsionen.
- Ausreichend große endometriale Zellkomponente zur DNA Extraktion (Zielvolumen 50 ng)

Im ersten Schritt erfolgte eine Sichtung aller Patientinnen, die zwischen 2005 und 2017 aufgrund einer tief infiltrierenden Endometriose operiert wurden, da bei diesem Endometriose Typ eine ausreichend große endometriale Zellkomponente zu erwarten ist und häufig weitere Endometrioseherde an getrennten Lokalisationen auftreten.

Mit den Patientinnen mit zwei oder mehr resezierten, anatomisch getrennten Endometrioseläsionen mit unterschiedlichem Infiltrationsmuster wurde dann eine Screeningliste erstellt.

Von den so identifizierten Fällen wurden die Verfügbarkeit von FFPE Blöcken und HE Schnitten überprüft und aus dem Archiv des pathologischen Instituts herausgesucht.

Abschließend erfolgte in einer mikroskopischen Begutachtung aller HE Schnitte eine orientierend Beurteilung des Anteils endometrialer Zellkomponenten in den jeweiligen Gewebeproben.

## **2.3 Vorbereitung der DNA-Extraktion**

### **2.3.1 Herstellung von Schnittpräparaten**

Ausgehend von der Größe der endometrialen Zellkomponente wurde gemäß der Zelldichte für jede Gewebeprobe die Menge der herzustellenden Schnittpräparate festgelegt.

Als Zielvolumen wurde die Extraktion von mindestens 50ng DNA pro Gewebeprobe angestrebt. Hierzu wurden zwischen 3 bis 14 8µm Schnitte der einzelnen Proben hergestellt.

Mittels eines Rotationsmikrotoms wurde die vorher festgelegte Menge 8µm dicker Schnittpräparate aus den FFPE Blöcken hergestellt.

Dazu wurden für jeden Block die folgenden Schritte durchgeführt:

1. Kühlen des Blocks auf Eis
2. Anschneiden des Blocks
3. Anfertigung der 8µm Schnitte
4. Überführung der Schnitte in ein 40°C warmes Streckbad mittels Pinzette
5. Aufziehen auf Objektträger
6. Trocknung bei 60° Celsius für eine Stunde

Anschließend können die Schnittpräparate bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

### 2.3.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Mit dem Ziel einer bestmöglichen Abgrenzung der Zielareale bei der Makrodissektion wurden die Schnitte einer Hämatoxylin-Eosin Färbung nach untenstehendem Protokoll (Tabelle 1) unterzogen. Zunächst wurden die fixierten Schnitte entparaffiniert. Im nächsten Schritt wurden sie mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Darauf folgte die eigentliche Färbung. Für das Bläuen wurde eine gebrauchssübliche Scott-Pufferlösung verwendet. Im Anschluss wurden die Schnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe zur erneuten Dehydrierung unterzogen. Die Entparaffinierung mittels Xylol erfolgte unter einer Abzugshaube.

**Tabelle 1** Protokoll Hämatoxylin-Eosin Färbung

	<b>Verwendete Substanz</b>	<b>Verweildauer</b>
<b>Entparaffinieren</b>	Xylol	2 mal 5 min
<b>Rehydrierung</b>	100% EtOH	2 mal 30 sec
	90% EtOH	2 mal 30 sec
	70% EtOH	2 mal 30 sec
	dH <sub>2</sub> O	30 sec
<b>Färbung</b>	10% Hämatoxylin	5 min
	dH <sub>2</sub> O	30 sec
	Bläuen	1 min
	10% Eosin	2 min
<b>Dehydrierung</b>	90% EtOH	2 min
	100% EtOH	1 min

### **2.3.3 Makrodissektion der Endometrioseherde**

Nach der HE Färbung erfolgte die händische Makrodissektion des Endometrioseherdes vom umliegenden Gewebe unter einem Stereomikroskop um im nächsten Schritt möglichst nur die DNA des Endometriosegewebes zu extrahieren und die Konzentration dieser zu erhöhen.

Hierzu wurde zunächst der Arbeitsplatz mit 70 prozentigem Ethanol gereinigt um das Risiko einer Kontamination zu minimieren. Anschließend wurde unter dem Mikroskop ein sauberes weißes Blatt Papier platziert. Mithilfe eines konventionellen HE Schnittes des FFPE Blocks als Referenz wurde das Endometrioseareal zunächst identifiziert. Mit einer Pipette wurde ein kleiner Tropfen DNase/RNase-freies Wasser auf den Objektträger aufgebracht. Mit derselben Pipette wurde der Tropfen im nächsten Schritt auf dem Endometrioseareal verteilt. Durch das Anfeuchten des Gewebes ist es möglich, dieses im nächsten Schritt zu einer Kugel zu formen. Anschließend wurde eine handelsübliche 20 Gauge Kanüle mit Schrägschliff verwendet um das Gewebe des Endometrioseherdes vom Objektträger „abzukratzen“.

Das entfernte Gewebe wurde mit der Kanüle zu einer Kugel geformt und durch vorsichtigen Druck mit der Spitze der Kanüle aufgenommen und in einen PCR Tube übertragen, in dem bereits 12µl QIAGEN Proteinase K Puffer enthalten waren.

Diese Schritte wurden für alle Schnitte eines Präparats wiederholt. Das gesamte Endometriosegewebe aller Schnitte eines FFPE Blocks wurde in einem PCR Tube gesammelt.

Jede Pipette und Kanüle wurde nur einmalig verwendet werden, um eine Kontamination zu verhindern.

## 2.4 DNA Extraktion

Für die DNA Extraktion wurden das PicoPure™ DNA Extraction Kit von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA verwendet.

Nach der Dissektion wurde die Reaktionsgefäße mit dem enthaltenen Gewebe sowie dem ProK Puffer kurzzeitig bei nicht festgelegter Frequenz zentrifugiert um sicherzustellen, dass alle Gewebestücke in der Pufferlösung schwimmen.

Anschließend wurden die Proben über Nacht, für mindestens 12 Stunden, bei 65° Celsius im Thermocycler platziert. Nach der Inkubation wurde den Proben jeweils 3µl ProK Puffer und 1 µl ProK Reaktionslösung der Konzentration 20mg/ml hinzugefügt. Um Pufferevaporation während der Inkubation auszugleichen wurden die Proben bei Bedarf mit DNase-/RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 16µl aufgefüllt. Daraufhin wurden die Proben erneut bei 65°C für 36-48 Stunden im Thermalcyclus inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Proteinkinase K durch Erhitzen der Proben auf 90°C über 10 Minuten inaktiviert. Im Anschluss wurde das Gesamtvolumen der Proben mit DNase-/RNase freiem Wasser auf 20-30µl aufgefüllt.

1µl der Proben wurde für die Bestimmung der DNA-Konzentration entnommen, die restlichen Proben wurden bei -20°Celsius eingelagert.

## 2.5 Bestimmung der DNA Konzentration

Für die Quantifizierung der extrahierten DNA wurde das Quant-iT™ High-Sensitivity DNA Assay Kit in Kombination mit dem Qubit 2.0 Fluorometer von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA verwendet.

Dafür wurden zunächst die im Kit enthaltene Reaktions- und Pufferlösung im vorgegebenen Verhältnis angemischt. Anschließend wurden jeweils 1µl der enthaltenen Proben, bzw. eine standardisierte Kalibrierungslösung hinzugefügt. Die fertig gemischten Proben wurden 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurde nun die Probe mit der Kalibrierungslösung, gefolgt von den extrahierten Endometrioseproben, ausgelesen und die jeweilige Konzentration dokumentiert.

## **2.6 Mutationsspezifische DNA Sequenzierung**

Für die mutationsspezifische Sequenzierung der extrahierten DNA mittels Next generation sequencing (NGS) wurde ein externes Labor beauftragt. Hierfür wurde das FIND IT™ Panel der Firma Canexia Health, Kanada in der Version 3.4 verwendet. Das Panel beinhaltet über 120 Hotspots und 17 Exons aus insgesamt 33 Genen (Tabelle 2), in denen häufig krebsassoziierte Mutationen nachgewiesen werden können. Es handelt sich um ein hypersensitives Assay, mit dem Mutationen in FFPE-Gewebe bereits bei Variant allele frequencies (VAFs) von <1% nachgewiesen werden können. Die Sequenzierung wurde mit dem Illumina System durchgeführt (Illumina Inc., USA).

**Tabelle 2** Analyierte Regionen im FIND IT™ Assay (Canexia Health, Kanada)

Gen	Position
AKT1	E17
ALK	T1151, L1152, C1156, F1174, L1196, L1198, G1202, D1203, S1206, R1275, G1269
AR	H875, F877, T878, S741, W742, V716
BRAF	G466, F468, G469, Y472, D594, G596, L597, V600, K601, Q201
CTNNB1	D32, S33, G34, S37, T41, S45
DDR2	I638, L239, S768
EGFR	Exon18, Exon19, Exon20, Exon21
ERBB2	Exon20, G309, S310, L755
ESR1	K303, S463, V534, P535, L536, Y537, D538
FGFR1	N546, K656
FGFR2	S252, P253, N549, K659
GNA11	Q209
GNAQ	Q209
GNAS	R201
HRAS	G12, G13, Q61
IDH1	R132
IDH2	R140, R172
JAK1	V658, S703
KIT	Exon9, Exon11, Exon13, T670, D816, D820, N822, Y823, A829
KRAS	G12, G13, A59, Q61, K117, A146
MAP2K1	Q56, K57, K59, D67, P387
MAP2K2	F57, Q60, K61, L119
MET	Exon13, Exon 14-50+25, Exon18, Y1253
NRAS	G12, G13, A59, Q61, K117, A146
PDGFRA	N659, R560-E571, D842, L839-Y849
PIK3CA	R88, E542, E545, Q546, D549, M1043, N1044, A1046, H1047, G1049
PTCH1	W844, G1093
PTEN	R130, R173, I122_M134, S170_Y188, Y225_F243, K254_K267
RET	C634, V804, M918
ROS1	L2026, G2032
SMO	D473, S533, W535
STK11	Q37, P281
TP53	Exon4, Exon5, Exon6, Exon7, Exon8, Exon9

DNA Bibliotheken wurden mit 45-75ng DNA aus den Endometrioseläsionen generiert. Anschließend wurden die DNA Proben mit Barcodes markiert. Für die

eigentliche Sequenzierung wurde dann das 300-cycle MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina Inc., USA) verwendet.

Um Artefakte zu vermeiden und die Sensitivität für Mutationen zu erhöhen wurden proprietäre Qualitätssicherungsmaßnahmen basierend auf bestimmten DNA Barcodes implementiert. Zunächst wurden qualitativ schlechte Ergebnisse aufgrund von der Sequenzlänge, der Komposition, der Barcodeinformation oder fehlerhafter Basenpaare in der Primer Region über einen bioinformatischen Algorithmus entfernt. Ebenso wurden Keimbahnmutationen entfernt. Qualitativ hochwertige Sequenzierungsergebnisse wurden anhand eines Referenzgenoms abgeglichen. So wurde letztendlich für jede detektierte Alteration ein probability score zwischen 0 und 1 vergeben.

### **2.6.1 Auswertung**

Um für die Validierung mittels digital droplet Polymerasekettenreaktion (ddPCR) ausgewählt zu werden, mussten Mutationen einen Probability Score von  $\geq 0,8$ , sowie eine VAF von  $\geq 0,8\%$  aufweisen. Der Grenzwert der VAF wurde in einer vorangegangenen Studie durch systematisches Screening auf bestimmte Mutationen etabliert (Lac et al., 2019) und richtet sich nach einem empirisch ermittelten Schwellenwert für den ddPCR Nachweis einer Mutation. Darüber hinaus wurden nur Mutationen validiert, die bereits im Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) (Forbes et al., 2017) als somatische Mutationen erfasst waren.

## **2.7 ddPCR Validierung**

Um die Wahrscheinlichkeit der Erfassung von falsch positiven Mutationen weiter zu reduzieren, wurden in der Panelsequenzierung detektierte Mutationen zusätzlich durch ddPCR validiert, sofern noch eine ausreichende Menge DNA zur Verfügung stand.

Wenn eine Mutation in der Panelsequenzierung in einer Probe festgestellt wurde, wurden zusätzlich zu dieser auch alle anderen zur Verfügung stehenden Läsionen dieses Falls einer ddPCR unterzogen, einschließlich der Proben, aus denen nicht genug DNA für eine Panel Sequenzierung extrahiert werden konnte.

### 2.7.1 Verwendete Primer und Assays

Für die ddPCR wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Primer und Assays verwendet. Sofern für eine Mutation keine vorgefertigten Primer beziehungsweise Assays im Handel zur Verfügung standen, wurden maßgeschneiderte Sequenzen in Auftrag gegeben und verwendet (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3** Verwendete ddPCR Primer und Assays

Reagenz	Hersteller
NRAS G13D ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
KRAS G12 Forward Primer: 5'- GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAA ACT-3'	Applied Biosystems, Inc., USA
KRAS G12 Reverse Primer: 5'- GCTGTATCGTCAAGGCACTCTT -3'	Applied Biosystems, Inc., USA
KRAS G12S (c.34G>A) Wildtype (WT): 5'-Yak Yellow- CGCC+A+C+CA+GCT-IABkFQ-3'	Integrated DNA Technologies, Inc., USA
KRAS G12S (c.34G>A) Mutant: 5'- FAMCGC+CA+C+T+AGC-IABkFQ-3'	Integrated DNA Technologies, Inc., USA
KRAS G12A (c.35G>C) WT: 5'-Yak Yellow-CGCC+A+C+CA+GCT- IABkFQ-3'	Integrated DNA Technologies, Inc., USA
KRAS G12A (c.35G>C) Mutant: 5'- FAMCGCC+A+G+CA+GCT-IABkFQ- 3'	Integrated DNA Technologies, Inc., USA
KRAS G12V (c.35G>T) WT: 5'-Yak Yellow-CGCC+A+C+CA+GCT- IABkFQ-3'	Integrated DNA Technologies, Inc., USA
KRAS G12V (c.35G>T) Mutant: 5'- FAM-CG+CC+A+A+CAGC+TC- IABkFQ-3'	Integrated DNA Technologies, Inc., USA

KRAS G12D (c.35G>A) WT: 5'-VICTTGGAGCTGGTGGCGTA-NFQ-3'	Applied Biosystems, Inc., USA
KRAS G12D (c.35G>A) Mutant: 5'-FAM- mixTTGGAGCTGATGGCGTA-NFQ-3'	Applied Biosystems, Inc., USA
KRAS G12C (C.34G>T) WT: 5'-VICTTGGAGCTGGTGGCGTA-NFQ-3'	Applied Biosystems, Inc., USA
KRAS G12C (C.34G>T) Mutant: 5'-FAM- mixTTGGAGCTTGTGGCGTA-NFQ-3'	Applied Biosystems, Inc., USA
EGFR T790M ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
ERBB2 S310F (c.929C>T) ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
CTNNB1 G34E ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
CTNNB1 H36Y Forward Primer: CACTGGCAGCAACAGTCTTA	Integrated DNA Technologies, Inc., USA
CTNNB1 H36Y Reverse Primer: TCTTCCTCAGGATTGCCTTAC	Integrated DNA Technologies, Inc., USA
CTNNB1 H36Y WT: 5'-Yak Yellow-AA+T+G+GATT+C+CA-IABkFQ-3'	Integrated DNA Technologies, Inc., USA
CTNNB1 H36Y Mutant: 5'-Yak Yellow-AGAA+T+A+GAT+T+C+CA-IABkFQ-3'	Integrated DNA Technologies, Inc., USA
CTNNB1 S37F ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
CTNNB1 T41I ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
PIK3CA R88Q (c.263G>A) ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
PIK3CA Q546R ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
PIK3CA E542K ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
PIK3CA E545K ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
PIK3CA G1049S ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
PIK3CA M1043I ddPCR Assay	Bio-Rad Laboratories, USA

Bei jeder PCR wurden jeweils drei Kontrollen verwendet:

- No-Template-Kontrolle: destilliertes Wasser
- Negativ-Kontrolle: Extrahierte DNA aus unspezifischem Gewebe

- Positiv-Kontrolle: gescherte DNA aus den in Tabelle 4 aufgelisteten Quellen

**Tabelle 4** Verwendete ddPCR Positiv-Kontrollen

<b>Assay</b>	<b>Positiv-Kontrolle</b>
KRAS G12S	1:1 Mischung aus A549 Zelllinie und Wildtyp(wt)-DNA
KRAS G12A	H2009 Zelllinie
KRAS G12V	1:1 Mischung aus OvCar5 Zelllinie und wt-DNA
KRAS G12D	HEY Zelllinie
KRS G12C	MIA PaCa-2 Zelllinie
NRAS G13D	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA
ERBB2 S310F	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA
EGFR T790M	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA
CTNNB1 G34E	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA
CTNNB1 H36Y	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA
CTNNB1 S37F	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA
CTNNB1 T41I	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA
PIK3CA R88Q	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA
PIK3CA Q546R	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA
PIK3CA E542K	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA
PIK3CA E545K	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA

PIK3CA G1049S	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA
PIK3CA M1043I	1:1 Mischung aus individuell designtem Oligonucleotid und wt-DNA

### 2.7.2 Präamplifikation

Nach der Panelsequenzierung stand oft nur noch eine begrenzte Menge DNA zur Verfügung, deshalb erfolgte eine Präamplifikation über 10 Zyklen im Thermalcyclus nach dem folgenden Protokoll (Tabelle 4).

**Tabelle 4** Protokoll Präamplifikation

	Temperatur	Dauer
<b>Polymerase Aktivierung</b>	95°C	10 min
<b>Präamplifikation</b>	94°C	10 Zyklen a 30 sec
<b>Primerhybridisierung und Elongation</b>	Optimale Temperatur je nach Assay (s. Tab. XX)	4 min

### 2.7.3 Droplet Generierung und Quantifizierung

Für die Generierung der Droplets wurde der QX200 Droplet Generator (BioRad Laboratories, USA) verwendet. Die Droplets wurden in einer Reaktionslösung mit einem Gesamtvolumen von 25µl bestehend aus ddPCR™ Supermix for Probes (no dUTP) (Bio-Rad Laboratories, USA), der präamplifizierten Probe und dem PCR Assay für die jeweilige Mutation in der vom Hersteller vorgegebenen Konzentration (Tabelle 5) hergestellt.

Die PCR Amplifikation und Analyse erfolgten nach folgendem Protokoll:

**Tabelle 5** Protokoll Amplifikation und Analyse

	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
<b>Polymerase-Aktivierung</b>	95°C	10 min
<b>Denaturierung</b>	94°C	40 Zyklen a 30 sec
<b>Primerhybridisierung und Elongation</b>	Optimale Temperatur je nach Assay (s. Tab. XX)	90 sec
<b>Denaturierung</b>	98°C	10 min

Anschließend wurde die Quantifizierung mit dem QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories, USA) durchgeführt.

### 2.7.4 Auswertung

Für jedes PCR Assay wurde ein individueller Schwellenwert definiert. Dieser errechnete sich aus dem durchschnittlichen Droplet Count von drei verschiedenen Negativ-Kontrollen, sowie dem Dreifachen der jeweiligen Standardabweichungen. Identifizierte Mutationen wurden nur als tatsächlich vorhanden erachtet, wenn die detektierte VAF den Schwellenwert des jeweiligen Assays überschritt.

## 2.8 Immunhistochemische Färbungen

Da ARID1A im verwendeten Assay zur Sequenzierung nicht enthalten ist und bei PTEN und p53 nur einige Abschnitte der Gene abgedeckt sind (vergleiche Tabelle 2), wurden hierfür zusätzlich immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Verwendung von immunhistochemischen Färbungen als Surrogatmarker für einen evtl. vorhandenen Funktionsverlust wurde in der Literatur bereits vielfach etabliert (Djordjevic et al., 2012, Köbel et al., 2016, Köbel et al., 2019).

- Die PTEN Färbungen wurden von Prof. Dr. Martin Köbel an der University of Calgary (Calgary, Kanada) mit dem Ventana Disc. overy Ultra Immuno stainer (Ventana Medical Systems, USA) durchgeführt. Hierfür wurde der monoklonale Kaninchen-Antikörper, 138G6 (Cell Signaling, USA) verwendet.
- Die ARID1A Färbungen wurden durch das Genetic Pathology Evaluation Center (Vancouver, Kanada) mit dem Dako Omnis Immunostainer (Agilent Technologies, USA) unter Verwendung des polyklonalen Kaninchen-Antikörper, HPA005456 (Sigma-Aldrich, USA) durchgeführt.
- Die TP53 Färbungen wurden ebenfalls durch das Genetic Pathology Evaluation Center (Vancouver, Kanada) mit dem Dako Omnis Immunostainer (Agilent Technologies, USA) unter Verwendung des monoklonalen Maus-Antikörper DO-7 (GA61661-2; Agilent Technologies, USA) durchgeführt.

Zu weiteren Details der einzelnen Färbeprotokolle wird auf die Herstellerangaben verwiesen.

### 3 Ergebnisse

Große Teile der hier vorgelegten Arbeit wurden von mir als Erstautorin bereits im Journal Fertility and Sterility unter dem Titel „Molecular analysis suggests oligoclonality and metastasis of endometriosis lesions across anatomically defined subtypes“ publiziert (Praetorius et al., 2022). Auf eine wiederholte Zitierung wird daher verzichtet.

#### 3.1 Studienkollektiv

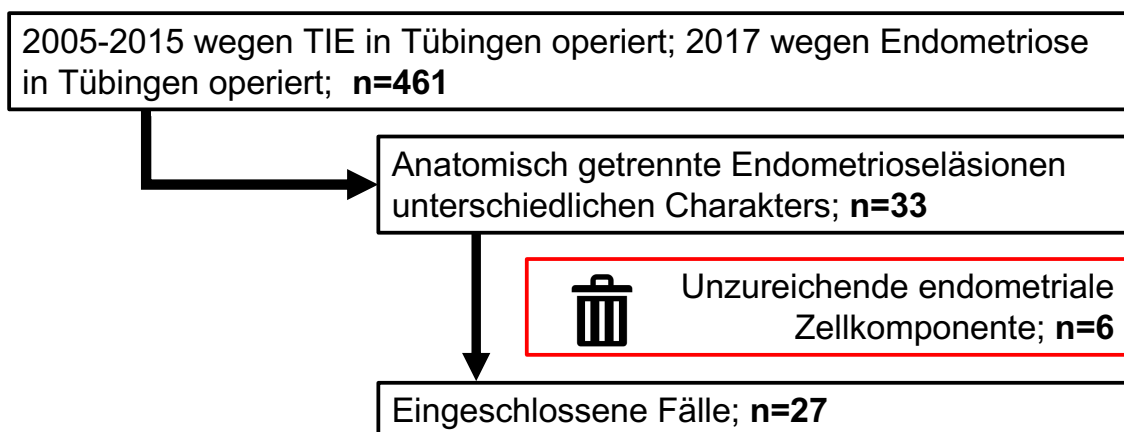
Nach Sichtung der Patientinnen, die zwischen 2005 und 2017 an der Universitätsfrauenklinik aufgrund einer tief infiltrierenden Endometriose operiert wurden, konnten zunächst 461 Fälle identifiziert werden.

Anhand der oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien waren abschließend 33 Patientinnen für einen Studieneinschluss geeignet.

Nach mikroskopischer Beurteilung mussten weitere 6 Fällen aufgrund mangelnder endometrialer Zellkomponente ausgeschlossen werden.

Damit standen schlussendlich 27 Patientinnen zur weiteren Analyse zur Verfügung.

Abbildung 2 zeigt einen Überblick über den Zusammenstellungsprozess.



**Abbildung 2** Schrittweise Zusammenstellung des Studienkollektivs mit absoluten Zahlen der ein- und ausgeschlossenen Fälle.

### **3.2 Patientencharakteristika**

Das Studienkollektiv bestand aus 27 Fällen mit einem Alter von 23 bis 45 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 34,9 Jahre.

Alle Stadien der rASRM Klassifikation waren im Kollektiv enthalten. In 60% der Fälle (16/27) lag eine Endometrioseerkrankung im rASRM Stadium IV vor.

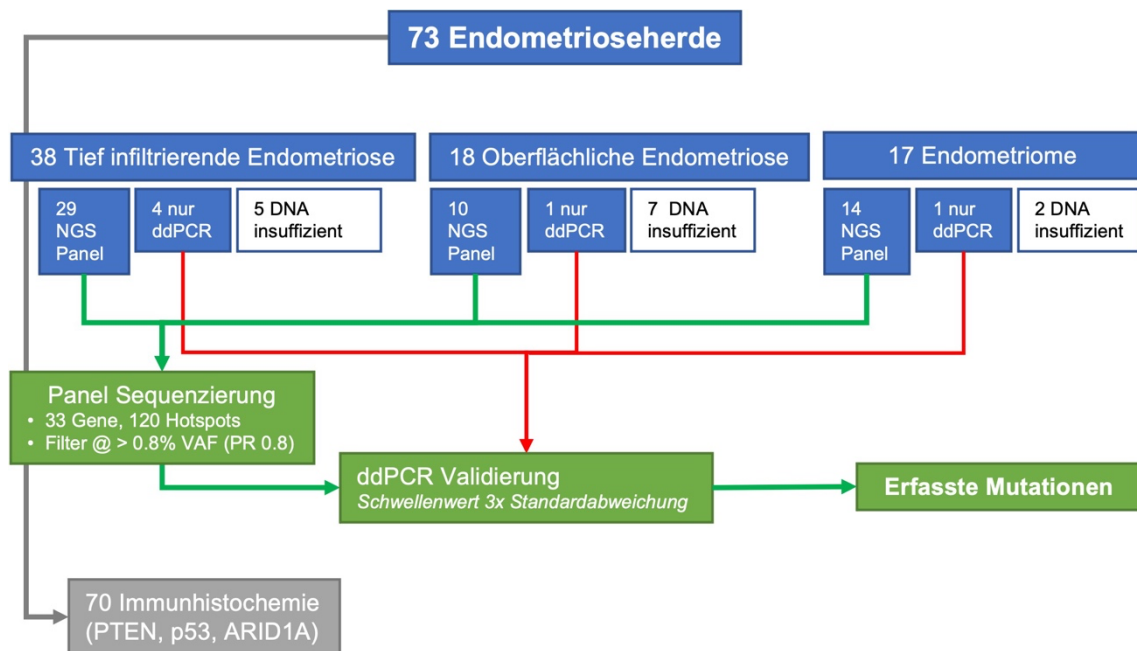
Abschließend standen insgesamt 73 einzelne Endometrioseherde zur Verfügung.

**Tabelle 6** Überblick über die Charakteristika des Studienkollektivs, (n)= nicht sequenzierte Herde, *kursiv*= rASRM Stadium retrospektiv vergeben

Fall	Alter	rASRM Stadium	Anzahl EM Herde	Anzahl TIE Herde	Anzahl OMA Herde
1	37	4		1	1
2	44	4		1	1
3	31	4	(1)	2	1
4	36	4	1	1	1
5	31	4	1	(1)	
6	33	3	1	1	
7	36	2	1	1	
8	39	4	(2)	1	1
9	40	4		1	1
10	44	2	(1)	1	
11	28	4		1 (1)	(1)
12	38	4		1	1
13	31	4	1	1	(1)
14	45	3		1	(1)
15	32	4		(2)	1
16	37	3		1	1
17	41	1	1	1	
18	23	3		1	1
19	31	1		1	1
20	36	4	1	1	
21	40	4		3 (1)	2
22	35	2	1	2	
23	31	4		1	1
24	25	3	(1)	3	
25	30	4	1	1	1
26	28	4	(1)	1	
27	39	3	1 (1)	1 (2)	

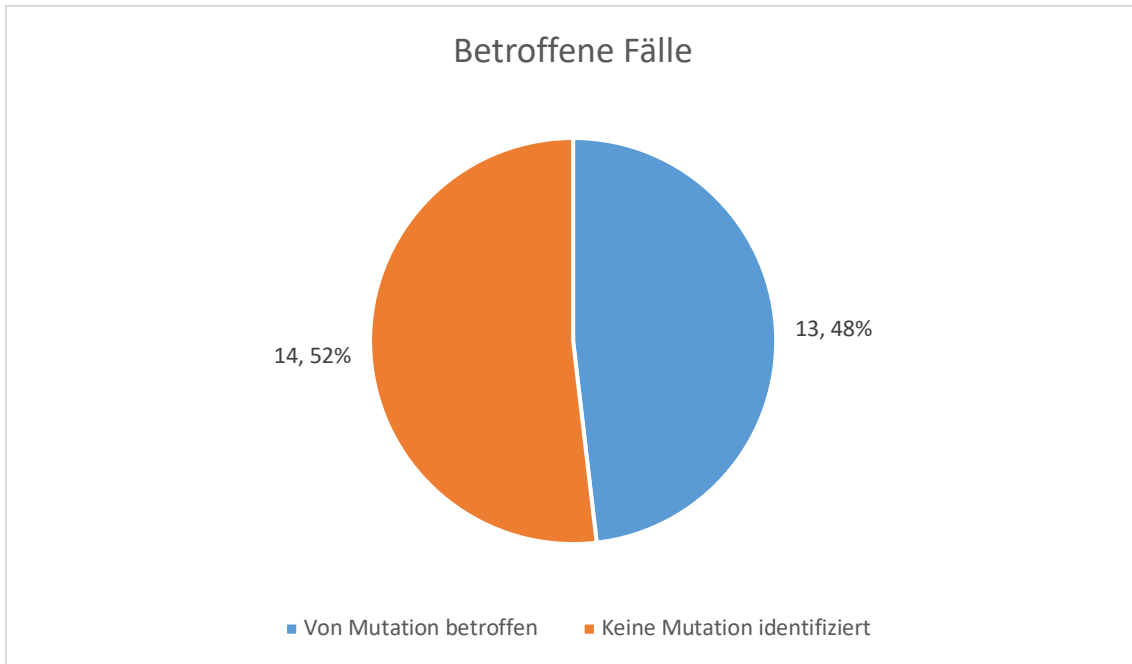
### 3.3 Überblick

Insgesamt wurden 73 einzelne Endometrioseherde untersucht. In Abhängigkeit der verfügbaren DNA-Mengen wurde wie initial im Versuchsaufbau festgelegt an 53 Herden die mutationsspezifische Sequenzierung mittels NGS Panel und wo möglich die orthogonale Validierung über ddPCR durchgeführt. An 6 zusätzlichen Herden erfolgte nur die Untersuchung mittels ddPCR. Immunhistochemische Färbungen wurden von 70 Herden erstellt. Abbildung 3 gibt einen Überblick über alle durchgeführten Analysen.



**Abbildung 3** Überblick über die durchgeführten Analysen

Durch die Kombination aller Methoden konnten in 13 von 27 Fällen (48%) Mutationen nachgewiesen werden.



**Abbildung 4** Von Mutationen betroffene Fälle, absolute Zahl und prozentualer Anteil

### 3.4 Panel Sequenzierung und ddPCR

In der Panel Sequenzierung wurde insgesamt 86 Mutationen als Kandidaten für eine orthogonale Validierung über ddPCR ermittelt.

Für 10 Mutationen stand nach Abschluss der Sequenzierung keine ausreichende Menge DNA mehr für die Validierung zur Verfügung, diese Mutationen wurden unter Anwendung der im Studienaufbau beschriebenen Kriterien für die Auswertung als richtig identifiziert erachtet.

In der Panel Sequenzierung wurde eine einzige Mutation im TP53 Gen detektiert. Da die p53 Immunhistochemie des betroffenen Endometrioseherdes eine unauffällige Expression zeigte wurde diese Alteration von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Eine ddPCR Analyse für das TP53 Gen war technisch nicht umsetzbar.

Von den verbliebenen 75 Mutationen konnten 56 (75%) auch in der ddPCR nachgewiesen und somit validiert werden.

19 Mutationen konnten in der ddPCR nicht reproduziert werden und wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Endometrioseläsionen, von denen primär nur eine geringe Menge DNA zur Verfügung stand, wurden auf Basis der Ergebnisse der Panel Sequenzierung zusätzlich mittels ddPCR gezielt auf das Vorliegen von Mutationen hin untersucht, die im betreffenden Fall in anderen Läsionen nachgewiesen werden konnten. So konnten weiter 24 Mutationen detektiert werden.

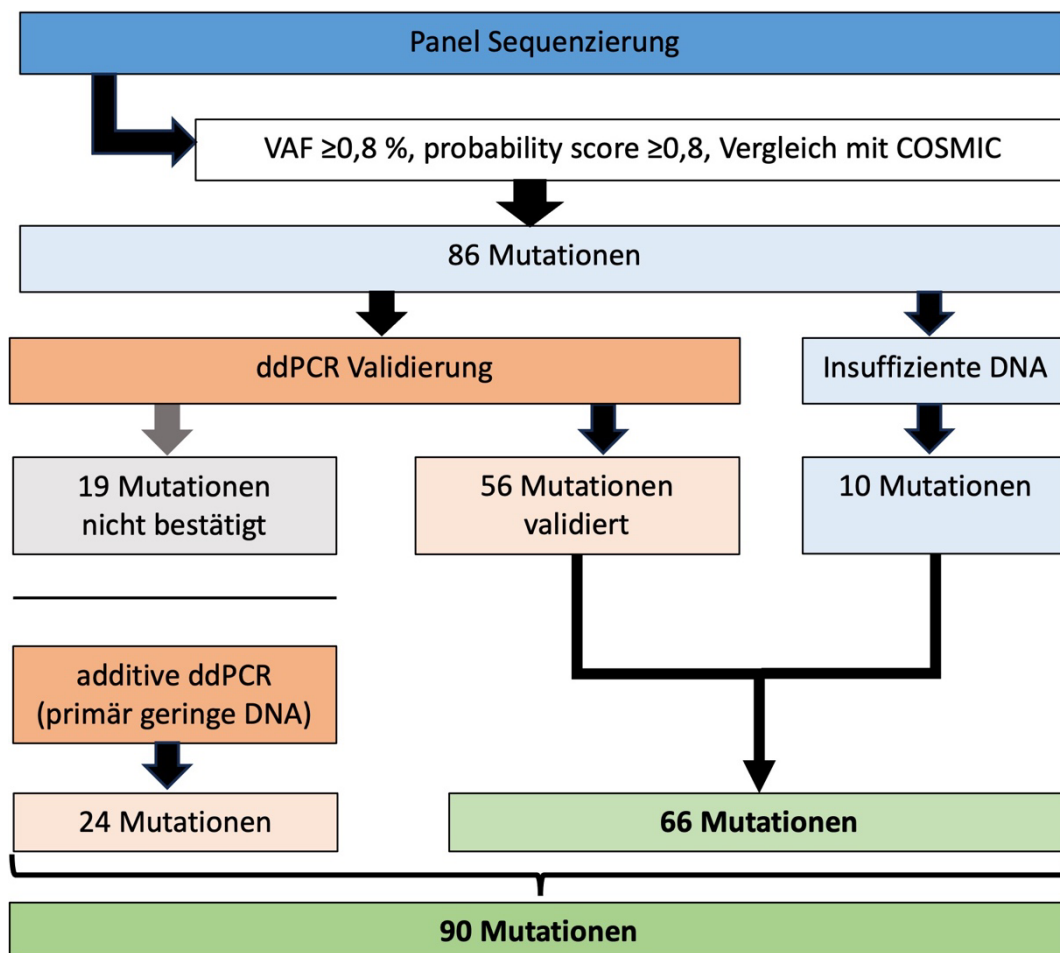


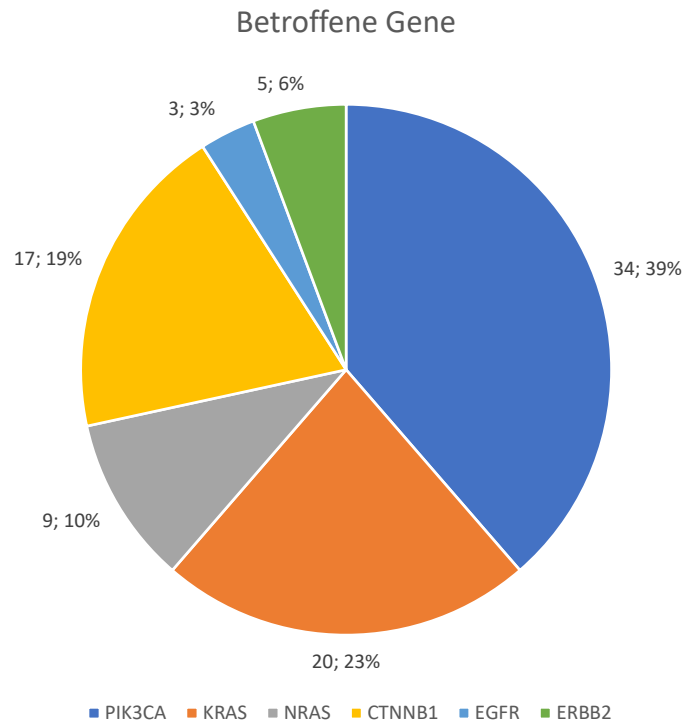
Abbildung 5 Durch NGS Panel Sequenzierung und ddPCR detektierte Mutationen

### 3.4.1 Betroffene Gene

Insgesamt wurden Mutationen in 6 verschiedenen Genen identifiziert.

Das PIK3CA Gen war mit 39% (34 Mutationen) am häufigsten betroffen.

Abbildung 6 gibt einen Überblick betroffenen Gene.



**Abbildung 6** Von Mutationen betroffene Gene, absolute Zahl und prozentualer Anteil

### 3.5 Immunhistochemie

Wie unter 2.8 beschrieben führten wir immunhistochemische Färbungen für PTEN, ARID1A und p53 durch.

Auswertbar waren:

- 66 PTEN Färbungen
- 66 ARID1A Färbungen
- 47 p53 Färbungen

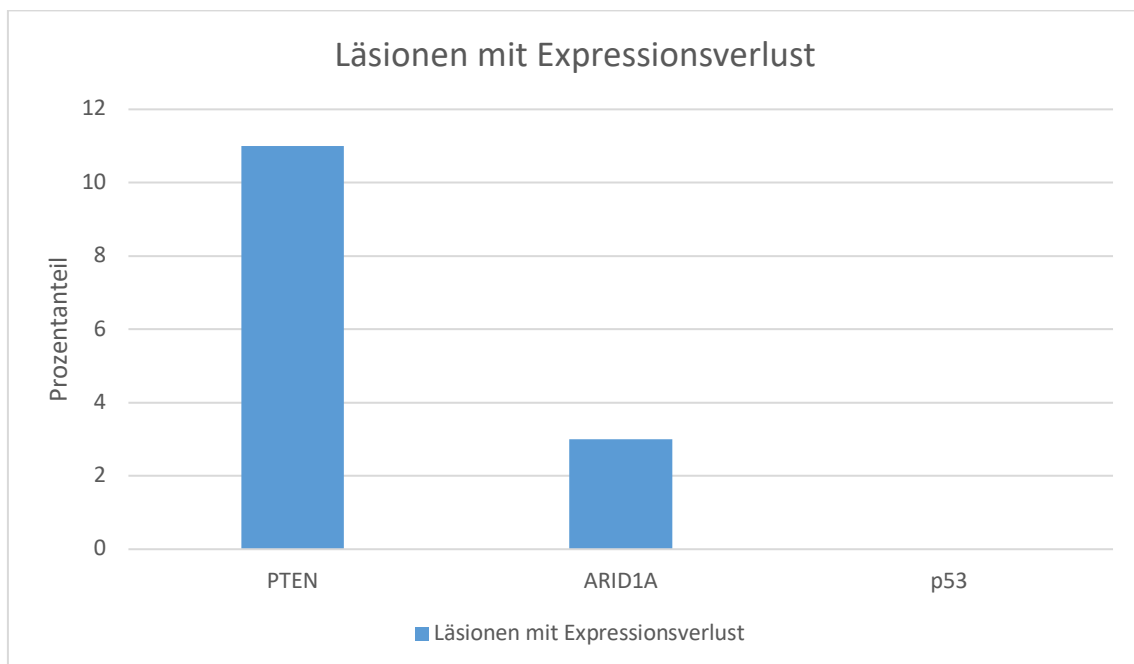
Heterogener Verlust der PTEN Expression konnte bei sieben Läsionen (11%) beobachtet werden, bei einer Läsion lag ein totaler Verlust der PTEN Expression vor (2%).

Die veränderte Expression betraf fünf Fälle. In zwei Fällen zeigten jeweils zwei unterschiedliche Läsionen einen heterogenen Verlust der PTEN Expression.

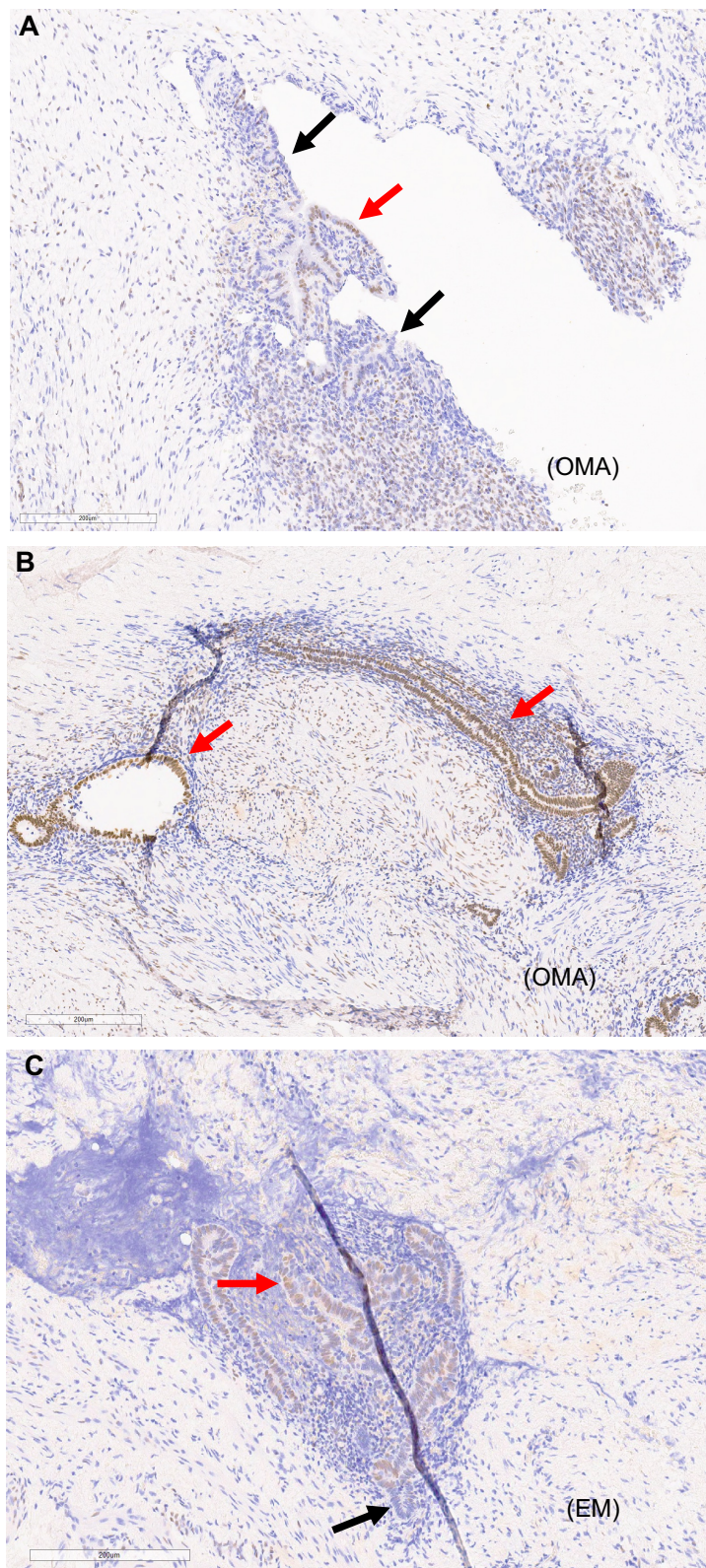
Für ARID1A konnte bei zwei Läsionen innerhalb eines Falls ein heterogener Expressionsverlust nachgewiesen werden (3%) (Abbildung 8).

Die p53 Expression war in keiner der untersuchten Läsionen verändert. Eine in Fall 22 in der Panel Sequenzierung detektierte p53 Mutation wurde daher, wie bei den Sequenzierungsdaten bereits beschrieben, als falsch positiv erachtet.

Tabelle A2 im Anhang zeigt die gesamten Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen.



**Abbildung 7** Prozentualer Anteil der Läsionen mit immunhistochemisch nachgewiesenem Expressionsverlust des jeweiligen Proteins



**Abbildung 8** (20-fache Vergrößerung) ARD1A Immunhistochemie Fall 3 mit heterogenem Verlust der ARD1A Expression (rote Pfeile) sowie teilweise erhaltener Expression (schwarze Pfeile), **A + B** Endometriom des linken Ovars, **C** oberflächliche Endometriose des Rektums

### 3.6 Klonale Beziehungen

Alle Daten aus Sequenzierung und Immunhistochemie zusammengenommen konnten in insgesamt 27 von 59 (48%) Läsionen und in 13 von 27 Fällen (48%) krebsassoziierte Mutationen nachgewiesen werden.

Für eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse können die betroffenen Fälle in drei Kategorien unterteilt werden.

#### 3.6.1 Fälle ohne klonale Beziehungen

In 3 Fällen wurde je eine Mutation in einer einzelnen Läsion nachgewiesen. Bei Fall 9 konnten insgesamt 3 Mutationen nachgewiesen werden, diese wurden jedoch ebenfalls jeweils nur in einem einzelnen Endometrioseherd identifiziert (siehe Abb. 5).

Fall 9				
Gen	Hotspot	TIE Appendix	OMA Re. Ovar	
PIK3CA	p.Gln546Arg		X	
KRAS	p.Gly12Ala	X		
KRAS	p.Gly12Cys	X		
KRAS	p.Gly12Val		X	

Fall 20			
Gen	Hotspot	EM Blase	TIE Li. Lig. su
KRAS	p.Gly12Asp		X
PTEN	IHC	Verlust	

Fall 22				
Gen	Hotspot	TIE Re. Lig. Su	EM Douglas	TIE Li. Lig. Su
KRAS	p.Gly12Ala		X	

Fall 24				
Gen	Hotspot	TIE M. posas re	TIE Li. Lig. su	TIE Septum rv
ERBB2	p.Thr790Met		X	
PTEN	IHC			Het. Verlust

**Abbildung 9** Überblick über Fälle ohne klonale Beziehungen

### 3.6.2 Fälle mit einfachen klonalen Beziehungen

In 3 Fällen konnte eine einzelne Mutation in mehrere Endometrioseläsionen identifiziert werden. Bei Fall 21 wurde eine identische KRAS Mutation in 4 getrennten Läsionen nachgewiesen.

Fall 6			
Gen	Hotspot	TIE Re. Lig. Su	EM Li. BeWa
PIK3CA	p.Met1043Ile	X	X

Fall 19			
Gen	Hotspot	TIE Sigma	EM Pararektal
KRAS	p.Gly12Ser	X	X
PTEN	IHC		Het. Verlust

Fall 21						
Gen	Hotspot	OMA Re. Ovar	TIE Septum rv.	OMA Li. Ovar	TIE Li. Lig. Su	TIE Blase
KRAS	p.Gly12Asp	X	X		X	X

**Abbildung 10** Überblick über Fälle mit einfachen klonalen Beziehungen, grün hinterlegt = identische Mutationen

### 3.6.3 Fälle mit komplexen klonalen Beziehungen

Zu dieser Kategorie werden insgesamt 6 Fälle gezählt. In allen Fällen konnten klonale Mutationen in mindestens zwei getrennten Endometrioseherden identifiziert werden. In Fall 4 ließen sich sogar 4 verschiedene klonale Mutationen in jeweils einem Herd jedes Endometriostyps (oberflächlich, tief infiltrierend, Endometriom) zeigen (vgl Abb 7).

In 5 von 6 Fällen dieser Kategorie wurden in mindestens einem Endometrioseherd mehrere verschiedene Mutationen im selben Gen identifiziert. Diese funktionell redundanten Mutationen betrafen in 4 Fällen das PIK3CA Gen (Fall 1-4, vgl. Abb 10). In 2 Fällen konnten multiple Mutationen innerhalb einer Läsion im CTNNB1 Gen nachgewiesen werden (Fall 1,2,4,13, vgl Abb 10). In den

Fällen 1,2 und 4 zeigten sich funktionell redundante Mutationen in beiden Genen (vgl Abb 6).

Mit insgesamt 8 betroffenen Genen besteht in dieser Kategorie auch die größte Bandbreite an Mutationen.

In allen 6 Fällen liegt ein rASRM Stadium IV vor.

Fall 1			
Gen	Hotspot	OMA Re.Ovar	TIE Rektum
PIK3CA	p.Glu542Lys	X	
PIK3CA	p.Gly1049Ser	X	X
PIK3CA	p.Arg88Gln	X	
PIK3CA	p.Met1043Ile	X	X
NRAS	p.Gly13Asp	X	X
CTNNB1	p.His36Tyr	X	
CTNNB1	p.Gly34Glu	X	X
CTNNB1	p.Thr41Ile	X	X
KRAS	p.Gly12Ser	X	
KRAS	p.Gly12Val		X

Fall 4				
Gen	Hotspot	OMA Li.Ovar	TIE Rektum	EM Douglas
PIK3CA	p.Glu545Lys		X	X
PIK3CA	p.Gly1049Ser		X	X
PIK3CA	p.Arg88Gln		X	X
PIK3CA	p.Met1043Ile	X	X	X
NRAS	p.Gly13Asp	X	X	X
CTNNB1	p.His36Tyr	X	X	X
CTNNB1	p.Gly34Glu		X	X
KRAS	p.Gly12Asp	X	X	X

Fall 2				
Gen	Hotspot	OMA Re.Ovar	TIE Rektum	
PIK3CA	p.Glu542Lys	X	X	
PIK3CA	p.Glu545Lys	X		
PIK3CA	p.Gly1049Ser	X		
PIK3CA	p.Arg88Gln	X		
PIK3CA	p.Met1043Ile	X		
NRAS	p.Gly13Asp	X	X	
CTNNB1	p.His36Tyr		X	
CTNNB1	p.Gly34Glu	X		
CTNNB1	p.Thr41Ile	X		
PTEN	IHC	Het. Verlust	Het. Verlust	

Fall 8				
Gen	Hotspot	OMA Li.Ovar	TIE Appendix	EM* Re. BeWa
PIK3CA	p.Glu545Lys	X		
NRAS	p.Gly13Asp	X	X	
CTNNB1	p.Ser37Phe	X	X	
KRAS	p.Gly12Val	X		
PTEN	IHC		Het. Verlust	Het. Verlust

\*Insuffiziente Zellularität für Sequenzierung

Fall 13			
Gen	Hotspot	TIE Blase	EM Re.BaWa
EGFR	p.Thr790Met	X	X
CTNNB1	p.His36Tyr		X
CTNNB1	p.Thr41Ile		X
ERBB2	p.Ser310Phe		X

Fall 3					
Gen	Hotspot	OMA Li.Ovar	TIE Vagina	TIE Douglas	EM Rektum
PIK3CA	p.Glu545Lys	X	X		Zu wenig DNA für NGS/ ddPCR
PIK3CA	p.Gly1049Ser	X	X		
PIK3CA	p.Arg88Gln	X	X		
PIK3CA	p.Met1043Ile	X	X	X	
KRAS	p.Gly12Asp	X	X	X	
ERBB2	p.Ser310Phe	X	X	X	
ARID1A	IHC	Het. Verlust			

**Abbildung 11** Überblick über Fälle mit komplexen klonalen Beziehungen, grün hinterlegt= identische Mutationen

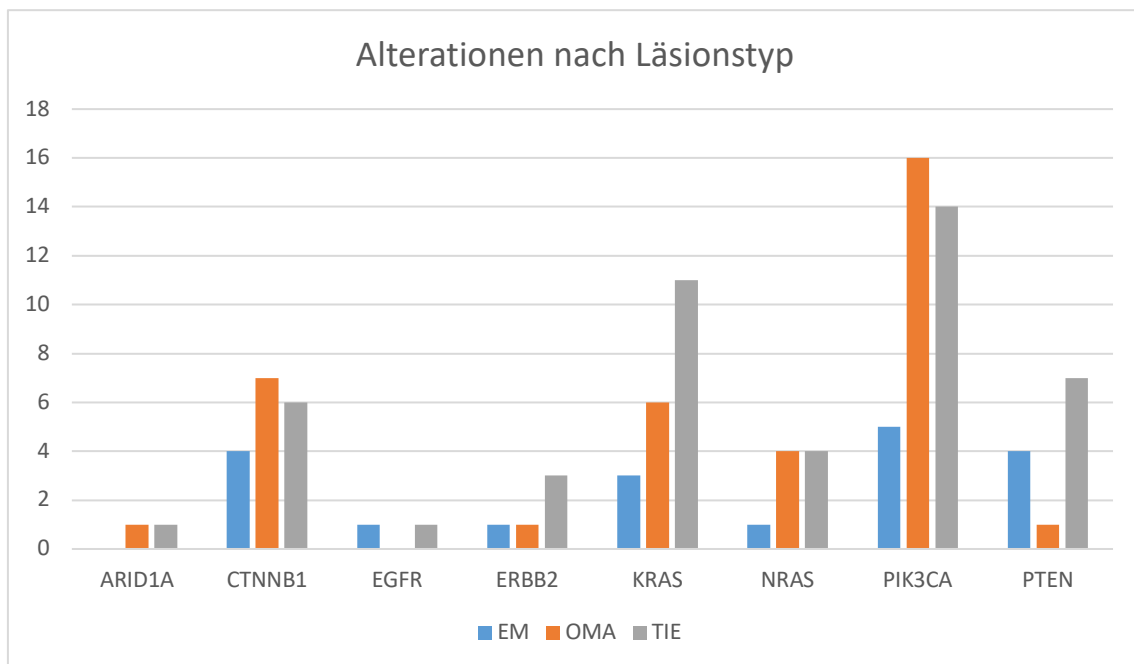
### 3.7 Verteilung über Läsionstypen

In Kombination der Ergebnisse von Sequenzierung und Immunhistochemie wurden in absoluten Zahlen die meisten Alterationen in tief infiltrierenden Endometrioseherden identifiziert.

Die höchste durchschnittliche Anzahl an Alterationen pro Läsion konnte jedoch in Endometriomen nachgewiesen werden. Pro Läsion wurden durchschnittlich 2,4 Alterationen nachgewiesen.

In tief infiltrierenden und oberflächlichen Endometrioseläsionen wurden durchschnittlich 1,4 Alterationen pro Läsion identifiziert.

Insgesamt konnten in 47% aller analysierten Endometriome und in 52% der tief infiltrierenden und oberflächlichen Endometrioseherde Mutationen nachgewiesen werden.



**Abbildung 12** Absolute Zahl nachgewiesener Alterationen in den jeweiligen Genen bzw. Proteinen aufgeteilt nach Läsionstyp

## 4 Diskussion

Trotz der hohen Prävalenz von Endometriose, die bis zu 10% der Frauen im reproduktiven Alter betrifft (Zondervan et al., 2020) und mit einer erheblichen Reduktion der Lebensqualität der Betroffenen einhergeht (Della Corte et al., 2020), sind viele Aspekte der Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung noch ungeklärt. Die Präsenz von krebsassoziierten Mutationen in Endometrioseherden konnte in den letzten Jahren in mehreren Arbeiten bestätigt werden (Anglesio et al., 2017, Lac et al., 2019, Suda et al., 2018). Während ihre Funktion noch unbekannt ist, diente die Analyse der genannten Mutationen in dieser Arbeit dazu, die Heterogenität von verschiedenen Endometrioseläsionen innerhalb einer Betroffenen Patientin zu beleuchten.

Über insgesamt 27 Fälle verteilt wurden 73 einzelne Endometrioseläsionen untersucht. In allen Fällen wurden zwei oder mehr Typen von Endometrioseläsionen (TIE, EM, OMA) aus anatomisch getrennten Lokalisationen mittels Panel-Sequenzierung, ddPCR und Immunhistochemie untersucht.

### 4.1 Betroffene Endometriosetypen

In 13 von 27 (48%) Fällen beziehungsweise 30 von 73 (50,8%) Endometrioseläsionen konnten Alterationen festgestellt werden. Mutationen wurden in Endometrioseherden aller Typen (TIE, EM, OMA) identifiziert. Somit bestätigt sich die oben genannte Hypothese 1, dass somatische Mutationen in krebsassoziierten Genen in allen Formen von Endometriose nachgewiesen werden können. Darüber hinaus kommen diese Mutationen im hier untersuchten Kollektiv auch in vergleichbarer Häufigkeit vor mit 47% in Endometriomen versus 52% in peritonealen Endometrioseformen (tief infiltrierend und oberflächlich). Dieses Ergebnis ist insbesondere im Hinblick darauf interessant, dass in der Literatur Endometriome zwar als mögliche Vorläuferläsion von endometrioseassoziierten Ovarialkarzinomen akzeptiert sind, eine maligne Entartung von

peritonealer Endometriose jedoch sehr selten ist (Dawson et al., 2018). Die hier präsentierten Daten unterstützen somit die Theorie, dass die Mutationslast allein kein ausschlaggebender Faktor für das Entartungspotential einer Endometrioseläsion zu sein scheint (Anglesio et al., 2017).

In Endometriomen konnten in dieser Arbeit häufig sogar multiple aktivierende PIK3CA Mutationen nachgewiesen werden. PIK3CA Mutationen können auch in vielen Fällen von Endometriose-assoziierten Karzinomen identifiziert werden und scheinen im Mausmodell, in Kombination mit einem ARID1A Funktionsverlust, notwendig für die Onkogenese von klarzelligem Ovarialkarzinomen zu sein (Chandler et al., 2015).

Abgesehen von der genetischen Signatur scheint die jeweilige Mikroumgebung ein wichtiger Faktor für die Entstehung, Ausbreitung und auch das Entartungspotential einer Endometrioseläsion zu sein (Lai et al., 2013). So könnte die ovarielle Mikroumgebung zum Beispiel vorteilhaftere Bedingungen für die Koexistenz und Ausbreitung multipler Klone und folglich ein höheres malignes Entartungspotential bieten (Saavalainen et al., 2018).

## 4.2 Klonale Beziehungen

In 4 von 13 Fällen (31%) ergaben sich keine Hinweise auf Beziehungen zwischen den Endometrioseherden, da Mutationen jeweils nur in einer einzelnen Gewebeprobe nachgewiesen werden konnten.

In den übrigen 9 Fällen (69%) konnten Mutationen in mehreren Endometrioseherden über verschiedene Endometriosetypen hinweg nachgewiesen werden. Die erhobenen Daten bestätigen folglich auch die in der Fragestellung definierte Hypothese 2, dass vorhandene Mutationen in mehreren Gewebeproben nachgewiesen werden können, auch wenn die jeweiligen Proben unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen entstammen und sich hinsichtlich des Infiltrationsmusters unterscheiden.

Der Nachweis von identischen Mutationen in unterschiedlichen Läsionstypen legt nahe, dass die Präsenz von krebsassoziierten Mutationen in einem Endometrioseherd zumindest allein nicht ausschlaggebend für das Infiltrationsmuster der jeweiligen Endometrioseläsion sein kann.

Darüber hinaus zeigten sich in 6 Fällen komplexe klonale Beziehungen zwischen den untersuchten Endometrioseläsionen mit Nachweis von multiplen, identischen Mutationen in mehreren Läsionen. Diese Fälle wiesen das größte Spektrum an betroffenen Genen auf.

In 5 von diesen komplexen Fällen wurden außerdem mehrere aktivierende Mutationen desselben Gens festgestellt. Diese Koexistenz entspricht funktionell einer Redundanz.

In allen 6 Fällen lag ein rASRM Stadium 4 vor. Die Komplexität der nachgewiesenen Mutationen scheint in unserem Kollektiv somit insgesamt durchaus mit einem schwereren Verlauf der Erkrankung zu korrelieren, auch wenn diese Arbeit keine Aussagen über kausale Zusammenhänge zwischen Mutationslast und -muster und dem Schweregrad der Endometrioseerkrankung zulässt.

### **4.3 Mögliche Disseminationswege**

Unsere Daten weisen darauf hin, dass die Endometrioseläsionen in den Fällen mit Nachweis von identischen Mutationen in multiplen Läsionen auf eine gemeinsame Zellvorläuferpopulation zurückgehen. In den Fällen mit komplexen klonalen Beziehungen könnten auch multiple Klone bzw. Zelllinien koexistieren. Insgesamt lassen sie die hier erhobenen Daten mit dem Konzept einer metastatischen Dissemination von Endometriosezellen im Körper einer Patientin vereinbaren. Über die Direktionalität dieser Dissemination kann keine Aussage getroffen werden. Im Folgenden sollen zur Veranschaulichung an zwei Fallbeispielen hypothetisch mögliche Disseminationswege genauer beleuchtet werden.

Abbildung 13 bezieht sich auf Fall 3 unserer Studie, in dem ein Endometriom des linken Ovars, tief infiltrierende Endometriose der Vagina und des Douglas-Raumes, sowie ein oberflächlicher Endometrioseherd aus dem Bereich des Rektums analysiert wurden. Von dem oberflächlichen Endometrioseherd stand leider nicht ausreichend DNA für eine Sequenzierung zur Verfügung, sodass nur Immunhistochemie durchgeführt wurde.

Abschnitt A führt tabellarisch die mit Sequenzierung und Immunhistochemie identifizierten Alterationen auf. Im Endometriom und der tief infiltrierenden Endometriose der Vagina konnten insgesamt 6 Mutationen in 3 Genen nachgewiesen werden. Drei dieser Mutationen wurden außerdem in der tief infiltrierenden Endometriose des Douglas detektiert. Das Endometriom und die oberflächliche Endometriose des Rektums teilen zusätzlich einen Expressionsverlust von ARID1A in der Immunhistochemie.

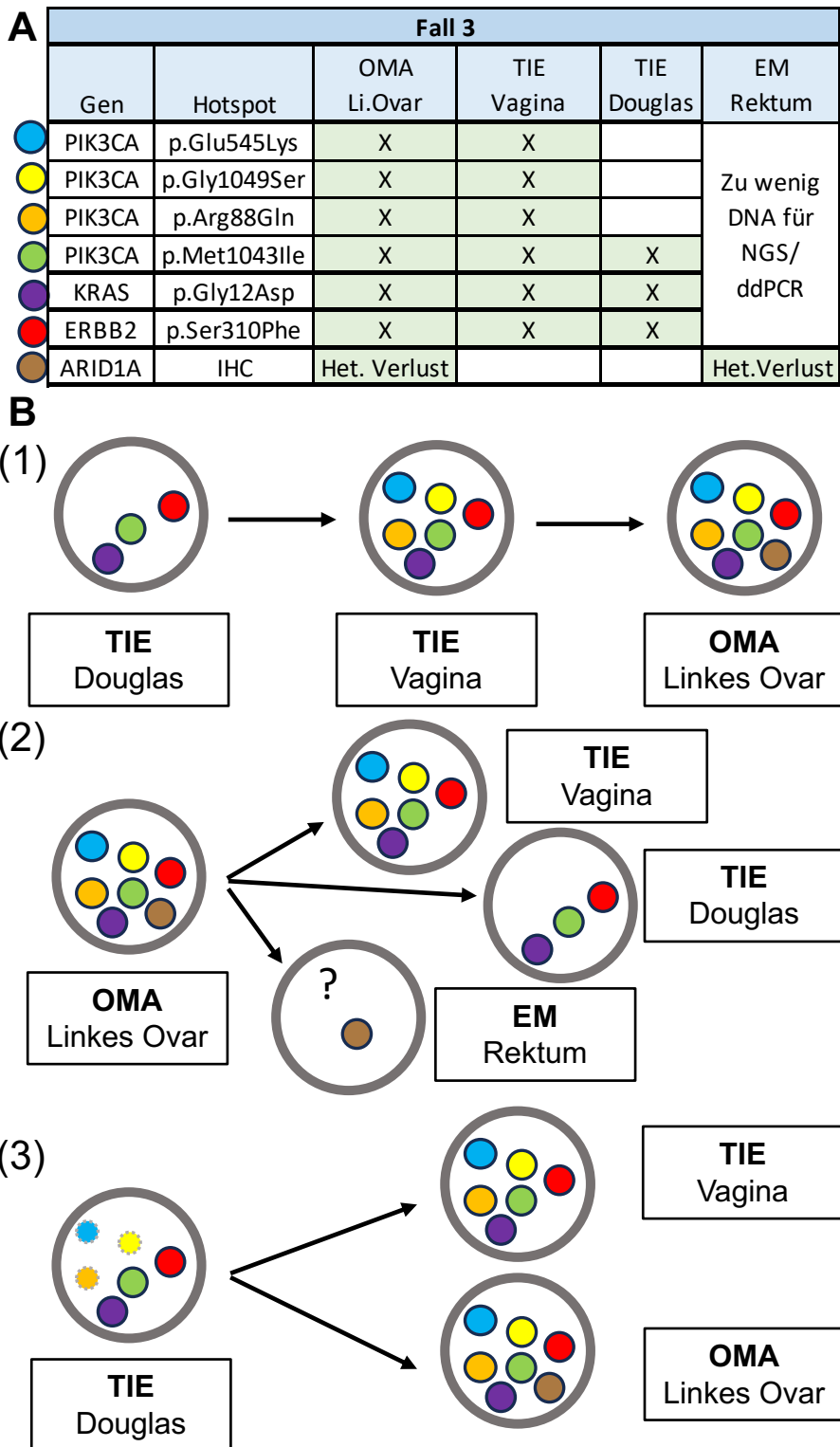
Im Abschnitt B sind 3 mögliche Disseminationswege dargestellt, die alle durch das identifizierte Mutationsmuster erklärt werden könnten.

Unter (1) ist eine lineare Dissemination dargestellt, bei der die Zelllinie ihren Ursprung im Douglas-Raum hat, nach der Ausbreitung in die Vagina zusätzliche PIK3CA Mutationen akquiriert und nach weiterer Dissemination zum linken Ovar kommt es zusätzlich zum teilweisen Expressionsverlust von ARID1A. Weiterhin kann spekuliert werden, dass eine subklonale Zellpopulation sich nach dem ARID1A Expressionsverlust dann weiter auf die Rektumoberfläche ausbreitete.

Im Beispiel (2) zeigt eine multidirektionale Ausbreitung vom Ovar ausgehend, bei der verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichen Mutationen in die Vagina, den Douglas, sowie an die Rektumoberfläche disseminiert sind.

In Theorie (3) kommt es zu einer parallelen Dissemination in die Vagina und an die Rektumoberfläche ausgehend vom Douglas. Die PIK3CA Alterationen p.Glu545Lys, p.Gly1049Ser und p.Arg88Gln wurden in der tief infiltrierenden

Endometriose im Douglas zwar detektiert, da die VAF unter dem definierten Schwellenwert lag aber nicht in die Auswertung mit einbezogen. Die Detektion könnte jedoch darauf hinweisen, dass in der Endometrioseläsion im Douglas bereits eine kleine Zellpopulation mit diesen Mutationen existiert, die sich an den anderen Lokalisationen weiter vermehrt und so oberhalb des Schwellenwertes nachweisbar wird.



**Abbildung 13** A) Tabellarische Darstellung der nachgewiesenen Mutationen nach Läsion in Fall 3, B) mögliche Disseminationswege der Endometrioseläsionen. Modifiziert aus (Praetorius et al., 2022).

Ein weiteres Fallbeispiel ist analog in Abbildung 14 dargestellt. In Fall 4 wurden ein Endometriom des linken Ovars, eine tief infiltrierende Endometriose des Rektums, sowie ein oberflächlicher Endometrioseherd aus dem Douglas untersucht.

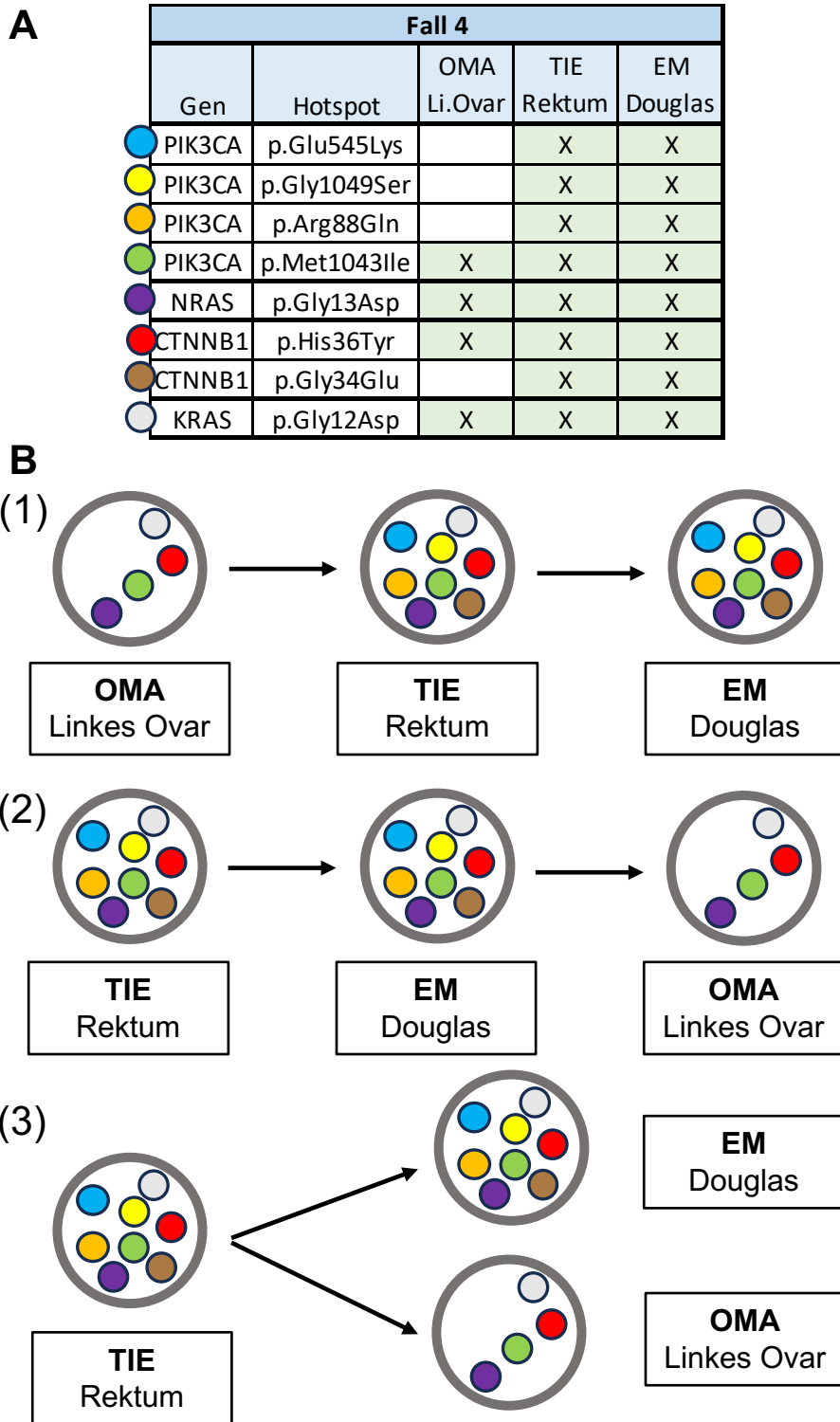
Wie unter A) aufgeführt teilen die tief infiltrierende Endometriose des Rektums und die oberflächliche Endometriose aus dem Douglas insgesamt 8 Mutationen in 4 Genen, darunter mehrere redundante im PIK3CA und CTNNB1 Gen. Das Endometriom teilt mit den beiden anderen Läsionen hingegen nur 4 Mutationen, allerdings mit demselben Spektrum an betroffenen Genen. Immunhistochemisch zeigten sich in diesem Fall keine veränderten Expressionen.

Im Abschnitt B sind wiederum 3 mögliche Disseminationswege basierend auf den identifizierten Mutationen abgebildet.

Hypothese (1) zeigt eine lineare Ausbreitung vom Endometriom zur tief infiltrierenden Endometriose des Rektums. Hier kommt es zu weiteren Mutationen und anschließend Dissemination in den Douglas. Analog hierzu wäre eine Dissemination vom Ovar in den Douglas und anschließend zum Rektum möglich.

Möglichkeit (2) wäre eine ebenfalls lineare Ausbreitung ausgehend jedoch vom Rektum oder Douglas, bei der im Verlauf lediglich eine Subpopulation von Endometriosezellen zum Ovar disseminiert und hier daher nicht alle Mutationen nachgewiesen werden.

Unter (3) ist das Szenario einer multidirektionalen Dissemination von der tief infiltrierenden Endometriose des Rektums in den Douglas, sowie von einer Subpopulation an das linke Ovar dargestellt.



**Abbildung 14** A) Tabellarische Darstellung der nachgewiesenen Mutationen nach Läsion in Fall 4, B) mögliche Disseminationswege der Endometrioseläsionen. Modifiziert aus (Praetorius et al., 2022).

Die hier aufgeführten möglichen Disseminationswege sind keineswegs allumfassend und es gibt weitere denkbare Optionen, die die identifizierten Mutationen erklären könnten. Die Darstellung der beiden Fallbeispiele zeigt jedoch, wie komplex die Beziehungen der einzelnen Endometrioseläsionen sind.

#### **4.4 Limitationen**

Die retrospektive Erhebung der klinischen Daten stellt eine grundlegende Schwäche des Studiendesigns dar. Insbesondere in den ersten Jahren des Erhebungszeitraums wurden die oben beschriebenen Klassifikationssysteme für Endometriose nicht standardisiert eingesetzt. So musste für ein Teil des Kollektivs das rASRM Stadium anhand der OP-Berichte und der intraoperativen Fotodokumentation im Nachhinein vergeben werden.

Während für die Sequenzierung hoch-sensitiv und spezifische Methoden verwendet wurden, sind weite Teile des Genoms nicht analysiert und so könnten mögliche weitere Zusammenhänge zwischen verschiedenen Zelllinien übersehen worden sein.

Da eine händische Dissektion der gesamten Endometrioseläsionen erfolgte, kann nicht zwischen Epithel- und Stromazellen unterschieden werden. In den immunhistochemischen Färbungen begrenzte sich der Expressionsverlust jedoch ausschließlich auf die Epithelzellen, wie bereits in mehreren anderen Arbeiten beschrieben werden konnte (Noe et al., 2018, Anglesio et al., 2017, Lac et al., 2019).

Abschließend reicht die in dieser Arbeit untersuchte Fallzahl nicht aus, um die Signifikanz der Beobachtungen zu beurteilen.

#### **4.5 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die hier präsentierten Daten zeigen, dass krebsassoziierte Mutationen in allen Typen von Endometriose nachgewiesen werden können und darüber hinaus,

dass die Präsenz von identischen Mutationen in anatomisch getrennten Endometrioseläsionen mit unterschiedlichem Infiltrationsmuster innerhalb einer Patientin nicht selten ist.

Durch die Kombination aus einem hoch-sensitiven NGS Panel, bioinformatischer Qualitätssicherungsmaßnahmen und orthogonaler Validierung mittels ddPCR kann insgesamt von einer geringen Falsch-Positiv-Rate der identifizierten Mutationen ausgegangen werden. Bei tiefergehender Sequenzierung der extrahierten DNA und weiterer Anreicherung der endometrialen Zellkomponente, zum Beispiel mittels Laser-Capture Mikrodissektion wäre mit Nachweis von weiteren klonalen Zusammenhängen zwischen Endometrioseläsionen zu rechnen.

Die Ergebnisse der Arbeit unterstützen das Konstrukt einer metastatischen Genese und Dissemination von Endometrioseläsionen im Körper einer Patientin die einer gemeinsamen Zellvorläuferpopulation entstammen. Eine Vielzahl von möglichen Disseminationswegen, sowohl lineare als auch multidirektionale, könnten die identifizierten klonalen Beziehungen der untersuchten Fälle erklären und deutet darauf hin, dass auch mehrere Subpopulationen von Endometriosezellen parallel koexistieren könnten.

Über die Direktionalität der klonalen Beziehungen zwischen den einzelnen Endometrioseläsionen kann diese Arbeit keine Aussage treffen.

Weiterführende Forschung könnte durch Durchführung einer Strichkürettage im Rahmen einer operativen Endometriosesanierung zusätzlich die Sequenzierung von eutopem Endometrium betroffener Frauen ermöglichen. Ein möglicher Nachweis von klonalen Mutationen sowohl in eutopem, intrauterinem Endometrium als auch in ektopen Endometrioseläsionen würde die ätiologischen Theorien von retrograder Menstruation sowie lymphogener beziehungsweise vaskulärer Metastasierung unterstützen.

Unsere Daten weisen darauf hin, dass die Mutationslast allein kein entscheidender Faktor für das Infiltrationsmuster eines einzelnen Endometrioseherdes und damit einen wichtigen Aspekt der Schwere einer Endometrioseerkrankung sein kann. Zukünftige Forschung sollte daher unter anderem auch die Mikroumgebung einer Endometrioseläsionen, immunologische Faktoren und epigenetische Aspekte berücksichtigen um mehr Klarheit in das weiterhin sehr heterogene klinische und organische Erkrankungsmuster von Endometriosepatientinnen sowie die Ätiopathogenese der Erkrankung zu bringen.

## 5 Zusammenfassung

Endometriose ist eine häufige, chronisch-entzündliche, östrogenabhängige Erkrankung, die etwa 10 % der Frauen im gebärfähigen Alter betrifft. Trotz ihrer weiten Verbreitung und der signifikanten Beeinträchtigung der Lebensqualität vieler Patientinnen sind viele Aspekte ihrer Pathogenese ungeklärt. Bemerkenswert ist, dass Endometriose tumorähnliche Eigenschaften wie Invasion, Apoptoseresistenz und Neoangiogenese aufweist. Frühere Studien konnten bereits krebsassoziierte Mutationen in Endometrioseläsionen nachweisen was Fragen nach deren Bedeutung für Krankheitsverlauf und -entstehung aufwirft.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob krebsassoziierte somatische Mutationen in verschiedenen Typen von Endometrioseläsionen (tief infiltrierend, oberflächlich, Endometriome) nachweisbar sind (Hypothese 1) und ob identische Mutationen in mehreren anatomisch getrennten Läsionen derselben Patientin vorkommen (Hypothese 2).

Aus dem Zeitraum 2005–2017 wurden 27 geeignete Patientinnen mit mindestens zwei anatomisch getrennten Endometrioseläsionen identifiziert. Insgesamt wurden 73 Läsionen untersucht. Die Analyse umfasste: DNA-Extraktion und -Sequenzierung mittels Next-Generation Sequencing, orthogonale Validierung durch digital droplet PCR und immunhistochemische Färbungen.

In 13 von 27 Fällen (48 %) konnten Mutationen in krebsassoziierten Genen nachgewiesen werden. Es wurden Mutationen in allen drei Endometriosetypen gefunden, mit vergleichbarer Häufigkeit (47 % in OMA, 52 % in TIE/EM). Besonders häufig betroffen war das PIK3CA-Gen (39 % der Mutationen).

In 9 Fällen wurden identische Mutationen in mehreren anatomisch getrennten Läsionen gefunden, was klonale Beziehungen nahelegt. Davon zeigten 6 Fälle

komplexe klonale Muster mit mehreren, teilweise redundanten Mutationen innerhalb eines Gens.

Die Ergebnisse bestätigen beide Hypothesen. Die Mutationen sind nicht auf einen bestimmten Endometriostyp beschränkt, sondern kommen in verschiedenen Läsionen derselben Patientin vor. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten stützen die Theorie, dass eine gemeinsame Zellvorläuferpopulation existiert, die sich über auch metastatische Dissemination im Körper verteilt.

Die alleinige Mutationslast einer Endometrioseläsion scheint jedoch nicht ausschlaggebend für das Infiltrationsmuster oder das Entartungsrisiko zu sein. Vielmehr könnten Mikroumgebung, immunologische und epigenetische Faktoren eine zentrale Rolle spielen.

Die Arbeit liefert wichtige Hinweise zur molekularen Heterogenität von Endometrioseläsionen und legt nahe, dass identische genetische Alterationen unabhängig vom anatomischen Ort und Läsionstyp auftreten können. Die Ergebnisse stützen die Vorstellung einer Dissemination von Endometriosezellen ähnlich einer Metastasierung und eröffnen neue Forschungsansätze zur Ätiopathogenese von Endometriose.

## 6 Literaturverzeichnis

1997. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*, 67, 817-21.

ADAMSON, G. D., KENNEDY, S. & HUMMELSHOJ, L. 2010. Creating Solutions in Endometriosis: Global Collaboration through the World Endometriosis Research Foundation. *Journal of Endometriosis*, 2, 3-6.

AGARWAL, S. K., CHAPRON, C., GIUDICE, L. C., LAUFER, M. R., LEYLAND, N., MISSMER, S. A., SINGH, S. S. & TAYLOR, H. S. 2019. Clinical diagnosis of endometriosis: a call to action. *Am J Obstet Gynecol*, 220, 354.e1-354.e12.

ANGLESIO, M. S., BASHASHATI, A., WANG, Y. K., SENZ, J., HA, G., YANG, W., ANIBA, M. R., PRENTICE, L. M., FARAHANI, H., LI CHANG, H., KARNEZIS, A. N., MARRA, M. A., YONG, P. J., HIRST, M., GILKS, B., SHAH, S. P. & HUNTSMAN, D. G. 2015. Multifocal endometriotic lesions associated with cancer are clonal and carry a high mutation burden. *J Pathol*, 236, 201-9.

ANGLESIO, M. S., PAPADOPOULOS, N., AYHAN, A., NAZERAN, T. M., NOE, M., HORLINGS, H. M., LUM, A., JONES, S., SENZ, J., SECKIN, T., HO, J., WU, R. C., LAC, V., OGAWA, H., TESSIER-CLOUTIER, B., ALHASSAN, R., WANG, A., WANG, Y., COHEN, J. D., WONG, F., HASANOVIC, A., ORR, N., ZHANG, M., POPOLI, M., MCMAHON, W., WOOD, L. D., MATTOX, A., ALLAIRE, C., SEGARS, J., WILLIAMS, C., TOMASETTI, C., BOYD, N., KINZLER, K. W., GILKS, C. B., DIAZ, L., WANG, T. L., VOGELSTEIN, B., YONG, P. J., HUNTSMAN, D. G. & SHIH, I. M. 2017. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *N Engl J Med*, 376, 1835-1848.

ANGLESIO, M. S. & YONG, P. J. 2017. Endometriosis-associated Ovarian Cancers. *Clin Obstet Gynecol*, 60, 711-727.

AS-SANIE, S., KIM, J., SCHMIDT-WILCKE, T., SUNDGREN, P. C., CLAUW, D. J., NAPADOW, V. & HARRIS, R. E. 2016. Functional Connectivity is Associated With Altered Brain Chemistry in Women With Endometriosis-Associated Chronic Pelvic Pain. *J Pain*, 17, 1-13.

BRINTON, L. A., GRIDLEY, G., PERSSON, I., BARON, J. & BERGQVIST, A. 1997. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 176, 572-9.

BROSENS, I., PUTTEMANS, P. & BENAGIANO, G. 2013. Endometriosis: a life cycle approach? *Am J Obstet Gynecol*, 209, 307-16.

BURGHAS, S., SCHÄFER, S. D., BECKMANN, M. W., BRANDES, I., BRÜNAHL, C., CHVATAL, R., DRAHOŇOVSKÝ, J., DUDEK, W., EBERT, A. D., FAHLBUSCH, C., FEHM, T., FEHR, P. M., HACK, C. C., HÄUSER, W., HANCKE, K., HEINECKE, V., HORN, L. C., HOUBOIS, C., KLAPP, C., KRAMER,

H., KRENTEL, H., LANGREHR, J., MATUSCHEWSKI, H., MAYER, I., MECHSNER, S., MÜLLER, A., MÜLLER, A., MÜLLER, M., OPPELT, P., PAPHHEMELIS, T., RENNER, S. P., SCHMIDT, D., SCHÜRING, A., SCHWEPPE, K. W., SEEGER, B., SIEDENTOPF, F., SIRBU, H., SOEFFGE, D., WEIDNER, K., ZRAIK, I. & ULRICH, U. A. 2021. Diagnosis and Treatment of Endometriosis. Guideline of the DGGG, SGGG and OEGGG (S2k Level, AWMF Registry Number 015/045, August 2020). *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 81, 422-446.

BURNEY, R. O. & GIUDICE, L. C. 2012. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril*, 98, 511-9.

CHAICHIAN, S., KABIR, A., MEHDIZADEHKASHI, A., RAHMANI, K., MOGHIMI, M. & MOAZZAMI, B. 2017. Comparing the Efficacy of Surgery and Medical Therapy for Pain Management in Endometriosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pain Physician*, 20, 185-195.

CHANDLER, R. L., DAMRAUER, J. S., RAAB, J. R., SCHISLER, J. C., WILKERSON, M. D., DIDION, J. P., STARMER, J., SERBER, D., YEE, D., XIONG, J., DARR, D. B., PARDO-MANUEL DE VILLENA, F., KIM, W. Y. & MAGNUSON, T. 2015. Coexistent ARID1A-PIK3CA mutations promote ovarian clear-cell tumorigenesis through pro-tumorigenic inflammatory cytokine signalling. *Nat Commun*, 6, 6118.

CHAPRON, C., CHOPIN, N., BORGHESE, B., FOULOT, H., DOUSSET, B., VACHER-LAVENU, M. C., VIEIRA, M., HASAN, W. & BRICOU, A. 2006. Deeply infiltrating endometriosis: pathogenetic implications of the anatomical distribution. *Hum Reprod*, 21, 1839-45.

CHAPRON, C., FAUCONNIER, A., DUBUISSON, J. B., BARAKAT, H., VIEIRA, M. & BRÉART, G. 2003. Deep infiltrating endometriosis: relation between severity of dysmenorrhoea and extent of disease. *Human Reproduction*, 18, 760-766.

CHEN, I., THAVORN, K., YONG, P. J., CHOUDHRY, A. J. & ALLAIRE, C. 2020. Hospital-Associated Cost of Endometriosis in Canada: A Population-Based Study. *J Minim Invasive Gynecol*, 27, 1178-1187.

DAVIS, A. C. & GOLDBERG, J. M. 2017. Extrapelvic Endometriosis. *Semin Reprod Med*, 35, 98-101.

DAWSON, A., FERNANDEZ, M. L., ANGLÉSIO, M., YONG, P. J. & CAREY, M. S. 2018. Endometriosis and endometriosis-associated cancers: new insights into the molecular mechanisms of ovarian cancer development. *Ecancermedicalscience*, 12, 803.

DELBANDI, A. A., MAHMOUDI, M., SHERVIN, A., HEIDARI, S., KOLAHDOUZ-MOHAMMADI, R. & ZARNANI, A. H. 2020. Evaluation of apoptosis and angiogenesis in ectopic and eutopic stromal cells of patients with endometriosis compared to non-endometriotic controls. *BMC Womens Health*, 20, 3.

DELLA CORTE, L., DI FILIPPO, C., GABRIELLI, O., REPPUCCIA, S., LA ROSA, V. L., RAGUSA, R., FICHERA, M., COMMODARI, E., BIFULCO, G. & GIAMPAOLINO, P. 2020. The Burden of Endometriosis on Women's Lifespan: A Narrative Overview on Quality of Life and Psychosocial Wellbeing. *Int J Environ Res Public Health*, 17.

DU, H. & TAYLOR, H. S. 2007. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells*, 25, 2082-6.

EBERT, A. D., ULRICH, U., KECKSTEIN, J., MÜLLER, M., SCHINDLER, A. E., SILLEM, M., TINNEBERG, H. R., DE WILDE, R. L. & SCHWEPPE, K. W. 2013. Implementation of certified endometriosis centers: 5-year experience in German-speaking Europe. *Gynecol Obstet Invest*, 76, 4-9.

ESKENAZI, B. & WARNER, M. L. 1997. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 24, 235-58.

FERGUSON, B. R., BENNINGTON, J. L. & HABER, S. L. 1969. Histochemistry of mucosubstances and histology of mixed müllerian pelvic lymph node glandular inclusions. Evidence for histogenesis by müllerian metaplasia of coelomic epithelium. *Obstet Gynecol*, 33, 617-25.

FORBES, S. A., BEARE, D., BOUTSELAKIS, H., BAMFORD, S., BINDAL, N., TATE, J., COLE, C. G., WARD, S., DAWSON, E., PONTING, L., STEFANCSIK, R., HARSHA, B., KOK, C. Y., JIA, M., JUBB, H., SONDKA, Z., THOMPSON, S., DE, T. & CAMPBELL, P. J. 2017. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res*, 45, D777-D783.

FUKUNAGA, M., NOMURA, K., ISHIKAWA, E. & USHIGOME, S. 1997. Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumours. *Histopathology*, 30, 249-55.

GARGETT, C. E. & MASUDA, H. 2010. Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod*, 16, 818-34.

GARGETT, C. E., SCHWAB, K. E., BROSENS, J. J., PUTTEMANS, P., BENAGIANO, G. & BROSENS, I. 2014. Potential role of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of early-onset endometriosis. *Mol Hum Reprod*, 20, 591-8.

GIUDICE, L. C. & KAO, L. C. 2004. Endometriosis. *Lancet*, 364, 1789-99.

GUO, S. W. 2009. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update*, 15, 441-61.

HAAS, D., SHEBL, O., SHAMIYEH, A. & OPPELT, P. 2013. The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 92, 3-7.

HALME, J., HAMMOND, M. G., HULKA, J. F., RAJ, S. G. & TALBERT, L. M. 1984. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol*, 64, 151-4.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.

HUDELIST, G., FRITZER, N., THOMAS, A., NIEHUES, C., OPPELT, P., HAAS, D., TAMMAA, A. & SALZER, H. 2012. Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany: causes and possible consequences. *Hum Reprod*, 27, 3412-6.

JIMBO, H., YOSHIKAWA, H., ONDA, T., YASUGI, T., SAKAMOTO, A. & TAKETANI, Y. 1997. Prevalence of ovarian endometriosis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, 59, 245-50.

KALOO, P., REID, G. & WONG, F. 2002. Caesarean section scar endometriosis: two cases of recurrent disease and a literature review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 42, 218-20.

KECKSTEIN, J., SARIDOGAN, E., ULRICH, U. A., SILLEM, M., OPPELT, P., SCHWEPPE, K. W., KRENTEL, H., JANSCHKE, E., EXACOUSTOS, C., MALZONI, M., MUELLER, M., ROMAN, H., CONDOUS, G., FORMAN, A., JANSEN, F. W., BOKOR, A., SIMEDREA, V. & HUDELIST, G. 2021. The #Enzian classification: A comprehensive non-invasive and surgical description system for endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 100, 1165-1175.

KONINCKX, P. R. & MARTIN, D. 1994. Treatment of deeply infiltrating endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 6, 231-41.

LAC, V., VERHOEF, L., AGUIRRE-HERNANDEZ, R., NAZERAN, T. M., TESSIER-CLOUTIER, B., PRAETORIUS, T., ORR, N. L., NOGA, H., LUM, A., KHATTRA, J., PRENTICE, L. M., CO, D., KOBEL, M., MIJATOVIC, V., LEE, A. F., PASTERNAK, J., BLEEKER, M. C., KRAMER, B., BRUCKER, S. Y., KOMMOSS, F., KOMMOSS, S., HORLINGS, H. M., YONG, P. J., HUNTSMAN, D. G. & ANGLÉSIO, M. S. 2019. Iatrogenic endometriosis harbors somatic cancer-driver mutations. *Hum Reprod*, 34, 69-78.

LAGRENADE, A. & SILVERBERG, S. G. 1988. Ovarian tumors associated with atypical endometriosis. *Hum Pathol*, 19, 1080-4.

LAI, C.-R., HSU, C.-Y., CHEN, Y.-J., YEN, M.-S., CHAO, K.-C. & LI, A. F.-Y. 2013. Ovarian cancers arising from endometriosis: A microenvironmental biomarker study including ER, HNF1 $\beta$ , p53, PTEN, BAF250a, and COX-2. *Journal of the Chinese Medical Association*, 76, 629-634.

LU, Y., CUELLAR-PARTIDA, G., PAINTER, J. N., NYHOLT, D. R., MORRIS, A. P., FASCHING, P. A., HEIN, A., BURGHHAUS, S., BECKMANN, M. W., LAMBRECHTS, D., VAN NIEUWENHUYSEN, E., VERGOTE, I.,

VANDERSTICHELE, A., DOHERTY, J. A., ROSSING, M. A., WICKLUND, K. G., CHANG-CLAUDE, J., EILBER, U., RUDOLPH, A., WANG-GOHRKE, S., GOODMAN, M. T., BOGDANOVA, N., DÖRK, T., DÜRST, M., HILLEMANN, P., RUNNEBAUM, I. B., ANTONENKOVA, N., BUTZOW, R., LEMINEN, A., NEVANLINNA, H., PELTTARI, L. M., EDWARDS, R. P., KELLEY, J. L., MODUGNO, F., MOYSICH, K. B., NESS, R. B., CANNIOTO, R., HØGDALL, E., JENSEN, A., GILES, G. G., BRUINSMA, F., KJAER, S. K., HILDEBRANDT, M. A., LIANG, D., LU, K. H., WU, X., BISOGNA, M., DAO, F., LEVINE, D. A., CRAMER, D. W., TERRY, K. L., TWOROGER, S. S., MISSMER, S., BJORGE, L., SALVESEN, H. B., KOPPERUD, R. K., BISCHOF, K., ABEN, K. K., KIEMENEY, L. A., MASSUGER, L. F., BROOKS-WILSON, A., OLSON, S. H., MCGUIRE, V., ROTHSTEIN, J. H., SIEH, W., WHITTEMORE, A. S., COOK, L. S., LE, N. D., GILKS, C. B., GRONWALD, J., JAKUBOWSKA, A., LUBIŃSKI, J., GAWEŁKO, J., SONG, H., TYRER, J. P., WENTZENSEN, N., BRINTON, L., TRABERT, B., LISSOWSKA, J., MCLAUGHLIN, J. R., NAROD, S. A., PHELAN, C., ANTON-CULVER, H., ZIOGAS, A., ECCLES, D., GAYTHER, S. A., GENTRY-MAHARAJ, A., MENON, U., RAMUS, S. J., WU, A. H., DANSONKAMIESZKOWSKA, A., KUPRYJANCZYK, J., TIMOREK, A., SZAFRON, L., CUNNINGHAM, J. M., FRIDLEY, B. L., WINHAM, S. J., BANDERA, E. V., POOLE, E. M., MORGAN, T. K., et al. 2015. Shared genetics underlying epidemiological association between endometriosis and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*, 24, 5955-64.

MARTINCORENA, I. & CAMPBELL, P. J. 2015. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, 349, 1483-9.

MECHSNER, S., WEICHBRODT, M., RIEDLINGER, W. F., BARTLEY, J., KAUFMANN, A. M., SCHNEIDER, A. & KÖHLER, C. 2008. Estrogen and progesterone receptor positive endometriotic lesions and disseminated cells in pelvic sentinel lymph nodes of patients with deep infiltrating rectovaginal endometriosis: a pilot study. *Hum Reprod*, 23, 2202-9.

MERRITT, M. A., DE PARI, M., VITONIS, A. F., TITUS, L. J., CRAMER, D. W. & TERRY, K. L. 2013. Reproductive characteristics in relation to ovarian cancer risk by histologic pathways. *Hum Reprod*, 28, 1406-17.

MISSMER, S. A., HANKINSON, S. E., SPIEGELMAN, D., BARBIERI, R. L., MALSPEIS, S., WILLETT, W. C. & HUNTER, D. J. 2004. Reproductive history and endometriosis among premenopausal women. *Obstet Gynecol*, 104, 965-74.

MORASSUTTO, C., MONASTA, L., RICCI, G., BARBONE, F. & RONFANI, L. 2016. Incidence and Estimated Prevalence of Endometriosis and Adenomyosis in Northeast Italy: A Data Linkage Study. *PLoS One*, 11, e0154227.

NNOAHAM, K. E., HUMMELSHOJ, L., WEBSTER, P., D'HOOGHE, T., DE CICCONE, F., DE CICCONE, C., JENKINSON, C., KENNEDY, S. H. & ZONDERVAN, K. T. 2011. Impact of endometriosis on quality of life and

work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril*, 96, 366-373.e8.

NNOAHAM, K. E., WEBSTER, P., KUMBANG, J., KENNEDY, S. H. & ZONDERVAN, K. T. 2012. Is early age at menarche a risk factor for endometriosis? A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Fertil Steril*, 98, 702-712.e6.

NOE, M., AYHAN, A., WANG, T. L. & SHIH, I. M. 2018. Independent development of endometrial epithelium and stroma within the same endometriosis. *J Pathol*, 245, 265-269.

PEARCE, C. L., TEMPLEMAN, C., ROSSING, M. A., LEE, A., NEAR, A. M., WEBB, P. M., NAGLE, C. M., DOHERTY, J. A., CUSHING-HAUGEN, K. L., WICKLUND, K. G., CHANG-CLAUDE, J., HEIN, R., LURIE, G., WILKENS, L. R., CARNEY, M. E., GOODMAN, M. T., MOYSICH, K., KJAER, S. K., HOGDALL, E., JENSEN, A., GOODE, E. L., FRIDLEY, B. L., LARSON, M. C., SCHILDKRAUT, J. M., PALMIERI, R. T., CRAMER, D. W., TERRY, K. L., VITONIS, A. F., TITUS, L. J., ZIOGAS, A., BREWSTER, W., ANTON-CULVER, H., GENTRY-MAHARAJ, A., RAMUS, S. J., ANDERSON, A. R., BRUEGGMANN, D., FASCHING, P. A., GAYTHER, S. A., HUNTSMAN, D. G., MENON, U., NESS, R. B., PIKE, M. C., RISCH, H., WU, A. H. & BERCHUCK, A. 2012. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol*, 13, 385-94.

PETERSON, C. M., JOHNSTONE, E. B., HAMMOUD, A. O., STANFORD, J. B., VARNER, M. W., KENNEDY, A., CHEN, Z., SUN, L., FUJIMOTO, V. Y., HEDIGER, M. L. & BUCK LOUIS, G. M. 2013. Risk factors associated with endometriosis: importance of study population for characterizing disease in the ENDO Study. *Am J Obstet Gynecol*, 208, 451.e1-11.

PRAETORIUS, T. H., LEONOVA, A., LAC, V., SENZ, J., TESSIER-CLOUTIER, B., NAZERAN, T. M., KÖBEL, M., GRUBE, M., KRAEMER, B., YONG, P. J., KOMMOSS, S. & ANGLÉSIO, M. S. 2022. Molecular analysis suggests oligoclonality and metastasis of endometriosis lesions across anatomically defined subtypes. *Fertil Steril*, 118, 524-534.

SAAVALAINEN, L., LASSUS, H., BUT, A., TIITINEN, A., HÄRKKI, P., GISSLER, M., PUKKALA, E. & HEIKINHEIMO, O. 2018. Risk of Gynecologic Cancer According to the Type of Endometriosis. *Obstetrics & Gynecology*, 131, 1095-1102.

SAMPSON, J. A. 1927. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol*, 3, 93-110.43.

SATO, N., TSUNODA, H., NISHIDA, M., MORISHITA, Y., TAKIMOTO, Y., KUBO, T. & NOGUCHI, M. 2000. Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the

tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer Res*, 60, 7052-6.

SPEER, L. M., MUSHKBAR, S. & ERBELE, T. 2016. Chronic Pelvic Pain in Women. *Am Fam Physician*, 93, 380-7.

SUDA, K., NAKAOKA, H., YOSHIHARA, K., ISHIGURO, T., TAMURA, R., MORI, Y., YAMAWAKI, K., ADACHI, S., TAKAHASHI, T., KASE, H., TANAKA, K., YAMAMOTO, T., MOTOYAMA, T., INOUE, I. & ENOMOTO, T. 2018. Clonal Expansion and Diversification of Cancer-Associated Mutations in Endometriosis and Normal Endometrium. *Cell Rep*, 24, 1777-1789.

TAGUCHI, S., ENOMOTO, Y. & HOMMA, Y. 2012. Bladder endometriosis developed after long-term estrogen therapy for prostate cancer. *Int J Urol*, 19, 964-5.

TAYLOR, R. N., LEBOVIC, D. I. & MUELLER, M. D. 2002. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, 955, 89-100; discussion 118, 396-406.

TUTTLES, F., KECKSTEIN, J., ULRICH, U., POSSOVER, M., SCHWEPPE, K. W., WUSTLICH, M., BUCHWEITZ, O., GREB, R., KANDOLF, O., MANGOLD, R., MASETTI, W., NEIS, K., RAUTER, G., REEKA, N., RICHTER, O., SCHINDLER, A. E., SILLEM, M., TERRUHN, V. & TINNEBERG, H. R. 2005. [ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]. *Zentralbl Gynakol*, 127, 275-81.

VERCELLINI, P., ABBIATI, A., VIGANÒ, P., SOMIGLIANA, E. D., DAGUATI, R., MERONI, F. & CROSIGNANI, P. G. 2007. Asymmetry in distribution of diaphragmatic endometriotic lesions: evidence in favour of the menstrual reflux theory. *Hum Reprod*, 22, 2359-67.

VERCELLINI, P., SOMIGLIANA, E., BUGGIO, L., BOLIS, G. & FEDELE, L. 2012. Endometriosis and ovarian cancer. *Lancet Oncol*, 13, e188-9.

VERCELLINI, P., VIGANO, P., SOMIGLIANA, E. & FEDELE, L. 2014. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*, 10, 261-75.

WEI, J. J., WILLIAM, J. & BULUN, S. 2011. Endometriosis and ovarian cancer: a review of clinical, pathologic, and molecular aspects. *Int J Gynecol Pathol*, 30, 553-68.

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., GIULIANI, 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.

WU, R. C., WANG, T. L. & SHIH IE, M. 2014. The emerging roles of ARID1A in tumor suppression. *Cancer Biol Ther*, 15, 655-64.

ZONDERVAN, K. T., BECKER, C. M., KOGA, K., MISSMER, S. A., TAYLOR, R. N. & VIGANO, P. 2018. Endometriosis. *Nat Rev Dis Primers*, 4, 9.

ZONDERVAN, K. T., BECKER, C. M. & MISSMER, S. A. 2020. Endometriosis. *N Engl J Med*, 382, 1244-1256.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Department für Frauengesundheit am Universitätsklinikum Tübingen durch Prof. Dr. med. Stefan Kommoss betreut.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med Stefan Kommoss und Prof. Michael Anglesio (University of British Columbia, Vancouver, Kanada).

Maren Castan, Marcel Grube und ich identifizierten zunächst Patientinnen die im genannten Beobachtungszeitraum aufgrund einer tief infiltrierenden Endometriose operiert wurden. Im Anschluss daran erstellte ich ein Kollektiv von Patientinnen mit zwei oder mehr Arten von getrennten Endometrioseläsionen und suchte sämtliche HE Schnitte und FFPE Blöcke aus dem Archiv des pathologischen Instituts heraus.

Für den experimentellen Teil dieser Arbeit absolvierte ich als Visiting International Research Student der University of British Columbia (Vancouver, Kanada) einen 10 monatigen Auslandsaufenthalt und führte im British Columbia Cancer Research Center (Vancouver, Kanada) in der Arbeitsgruppe von Prof. Anglesio die Versuche durch.

Die Quantifizierung der Zellularität erfolgte durch mich unter Anleitung von Vivian Lac, Tayyebah Nazeran und Basile Tessier-Cloutier.

Die Herstellung der Schnittpräparate, HE-Färbung, Dissektion der Endometrioseherde, DNA Extraktion, ddPCR-Validierung und Auswertung der Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder Vivian Lac und Janine Senz) von mir eigenständig durchgeführt.

Die mutationsspezifische Sequenzierung und Anwendung des bioinformatischen Algorithmus wurden durch Canexia Health, Vancouver, Kanada (vormals Contextual Genomics) durchgeführt.

Die immunhistochemischen Färbungen für TP53 wurden von Herrn Prof. Dr. Martin Köbel an der University of Calgary (Calgary, Kanada) durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen für ARID1A und PTEN erfolgten durch das

Genetic Pathology Evaluation Center (Vancouver, Kanada). Ausgewertet wurden sämtliche Immunhistochemien durch Basile Tessier-Cloutier, Tayyebah Nazeran und Michael Anglesio.

Große Teile der hier vorgelegten Arbeit wurden von mir als Erstautorin bereits im Journal Fertility and Sterility unter dem Titel „Molecular analysis suggests oligoclonality and metastasis of endometriosis lesions across anatomically defined subtypes“ publiziert (Praetorius et al., 2022). Die Planung, Konzeption und Erstellung des Manuskriptes erfolgte durch mich unter Anleitung von Prof. Dr. med. Stefan Kommoss und Prof. Michael Anglesio.

Ich versichere, die hier als Dissertationsschrift vorgelegte Arbeit selbständig (nach Anleitung durch Prof. Dr. med. Stefan Kommoss) verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Schwäbisch Hall, den 24.07.2025

## 8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit und vorläufige Daten wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

**Praetorius TH**, Leonova A, Lac V, Senz J, Tessier-Cloutier B, Nazeran TM, Köbel M, Grube M, Kraemer B, Yong PJ, Kommoss S, Anglesio MS. Molecular analysis suggests oligoclonality and metastasis of endometriosis lesions across anatomically defined subtypes. *Fertil Steril.* 2022 Sep;118(3):524-534.

### **Kongressbeiträge**

- Posterbeitrag DGGG Kongress 2022, München:  
Metastasis in endometriosis: Targeted sequencing suggests non-malignancy associated endometriosis is capable of wide dissemination.
- Posterbeitrag DGGG Kongress 2020, München:  
Is endometriosis metastasizing? Shared somatic alterations suggest common origins across endometriotic lesions.
- Posterbeitrag DGGG Kongress 2018, Berlin:  
Hypersensitive Cancer hotspot sequencing panel in patients with two or more subtypes of endometriosis
- Posterbeitrag Hochschullehrertagung 2022, Linz, Österreich:  
Kann Endometriose disseminieren?  
Identische Mutationen weisen auf einen gemeinsamen Ursprung von Endometrioseherden hin.
- Vortrag 4th European Conference on Endometriosis 2018, Wien, Österreich:  
Hypersensitive cancer hotspot sequencing panel in patients with two or more subtypes of endometriosis

## 9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Kommos für die Möglichkeit zur Promotion, die hervorragende Betreuung und die stete Hilfsbereitschaft in jedem Stadium der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken. Deine ansteckende Begeisterung für die Gynäkologie haben mich immer darin bestärkt, diesem Feld treu zu bleiben. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit über die letzten Jahre und deine andauernde berufliche Förderung und Freundschaft!

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Michael Anglesio sowie dem gesamten Team des British Columbia Cancer Research Centre in Vancouver, Kanada. Vielen Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der Umsetzung dieses Projekts und die fruchtbare internationale Zusammenarbeit.

Insbesondere bei Vivian Lac und Janine Senz möchte ich mich für die Anleitung und Unterstützung bei der experimentellen Tätigkeit bedanken.

Außerdem danke ich den ärztlichen Direktoren des Departments für Frauenheilkunde, Herrn Prof. Dr. med. h.c. mult. Diethelm Wallwiener und Frau Prof. Dr. med. Sara Y. Brucker, für die Ermöglichung und die Unterstützung dieser Arbeit.

Auch bei meinen Freunden, die immer für mich da waren, möchte ich mich herzlich bedanken. Ich bin sehr froh, dass Einige mich auch weiterhin als Kollegen begleiten.

Mein größter Dank gilt meinem Partner Marcel, der mir nicht nur mit fachlichem Rat zu jedem Zeitpunkt zur Seite stand, sondern mich besonders durch alle emotionalen Höhen und Tiefen dieses Projekts getragen hat.

Zuletzt möchte ich meiner Mutter meinen Dank aussprechen. Vielen Dank für deine bedingungslose Unterstützung, deine Ermutigung und dein festes Vertrauen in mich, die mich bereits mein Leben lang begleiten.





## 10Anhang

Tabelle A1 Ergebnisse von Panelsequenzierung und ddPCR

Fall	Typ	Lokalisation	Codon	Gen	Panel VAF (%)	ddPCR VAF(%)	Schwellenwert
1	TIE	Rektum	p.His36Tyr	CTNNB1	1,583	0,4	0,42
1	TIE	Rektum	p.Thr41Ile	CTNNB1	1,505	0,83	0,55
1	TIE	Rektum	p.Gly34Glu	CTNNB1	1,812	0,928	0,59
1	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly34Glu	CTNNB1		0,664	0,59
1	OMA	Rechtes Ovar	p.His36Tyr	CTNNB1	1,863	1,25	0,42
1	OMA	Rechtes Ovar	p.Thr41Ile	CTNNB1		1,23	0,55
1	TIE	Rektum	p.Gly12Ser	KRAS	1,193	0,26	0,53
1	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly12Val	KRAS		0,008	0,07
1	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly12Ser	KRAS	0,583	0,74	0,53
1	TIE	Rektum	p.Gly12Val	KRAS	1,457	0,36	0,07
1	TIE	Rektum	p.Gly13Asp	NRAS	1,616	1,51	0,39
1	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly13Asp	NRAS		1,41	0,39
1	TIE	Rektum	p.Glu542Lys	PIK3CA	1,514	0,36	0,60
1	TIE	Rektum	p.Arg88Gln	PIK3CA	0,993	0,62	0,71
1	TIE	Rektum	p.Gly1049Ser	PIK3CA	1,6	0,89	0,71
1	OMA	Rechtes Ovar	p.Glu542Lys	PIK3CA	0,845	0,95	0,60
1	OMA	Rechtes Ovar	p.Arg88Gln	PIK3CA		0,75	0,71
1	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly1049Ser	PIK3CA	0,902	1,11	0,71
1	TIE	Rektum	p.Met1043Ile	PIK3CA	1,676	1,24	0,25
1	OMA	Rechtes Ovar	p.Met1043Ile	PIK3CA		1,2	0,25
2	OMA	Rechtes Ovar	p.His36Tyr	CTNNB1	1,457	0,38	0,42
2	TIE	Rektum	p.His36Tyr	CTNNB1	0,863		
2	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly34Glu	CTNNB1	0,838	0,821	0,59
2	OMA	Rechtes Ovar	p.Thr41Ile	CTNNB1	1,034	0,85	0,55
2	TIE	Rektum	p.Gly13Asp	NRAS	1,127		
2	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly13Asp	NRAS	1,002	1,25	0,39
2	TIE	Rektum	p.Glu542Lys	PIK3CA	1,441		
2	TIE	Rektum	p.Glu545Lys	PIK3CA	0,704		
2	OMA	Rechtes Ovar	p.Glu545Lys	PIK3CA	1,004	1,02	0,58
2	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly1049Ser	PIK3CA	1,482	1,18	0,71
2	OMA	Rechtes Ovar	p.Glu542Lys	PIK3CA	0,924	1,15	0,60
2	OMA	Rechtes Ovar	p.Arg88Gln	PIK3CA	0,817	1,3	0,71
2	OMA	Rechtes Ovar	p.Met1043Ile	PIK3CA	1,915	1,54	0,25

## Anhang

3	TIE	Douglas	p.Ser310Phe	ERBB2	0,804	0,54	0,47
3	TIE	Vagina	p.Ser310Phe	ERBB2	0,704	0,9	0,47
3	OMA	Linkes Ovar	p.Ser310Phe	ERBB2		1,18	0,47
3	TIE	Vagina	p.Gly12Asp	KRAS	0,615	0,9	0,67
3	OMA	Linkes Ovar	p.Gly12Asp	KRAS	0,898	1,03	0,67
3	TIE	Douglas	p.Gly12Asp	KRAS		1,15	0,67
3	TIE	Douglas	p.Glu545Lys	PIK3CA	0,429	0,17	0,58
3	TIE	Douglas	p.Gly1049Ser	PIK3CA	0,866	0,56	0,71
3	TIE	Douglas	p.Arg88Gln	PIK3CA		0,58	0,71
3	OMA	Linkes Ovar	p.Arg88Gln	PIK3CA	0,801	0,83	0,71
3	TIE	Vagina	p.Arg88Gln	PIK3CA	0,75	0,9	0,71
3	TIE	Vagina	p.Glu545Lys	PIK3CA	0,718	0,91	0,58
3	OMA	Linkes Ovar	p.Glu545Lys	PIK3CA	0,806	0,98	0,58
3	OMA	Linkes Ovar	p.Met1043Ile	PIK3CA	1,164	0,84	0,25
3	TIE	Vagina	p.Gly1049Ser	PIK3CA	0,818	1,4	0,71
3	TIE	Vagina	p.Met1043Ile	PIK3CA	0,819	1,03	0,25
3	OMA	Linkes Ovar	p.Gly1049Ser	PIK3CA		1,17	0,71
3	TIE	Douglas	p.Met1043Ile	PIK3CA	1,022	1,24	0,25
4	OMA	Linkes Ovar	p.Gly34Glu	CTNNB1	0,897	0,227	0,59
4	EM	Douglas	p.Gly34Glu	CTNNB1	0,913		
4	EM	Douglas	p.His36Tyr	CTNNB1	0,812		
4	OMA	Linkes Ovar	p.His36Tyr	CTNNB1	0,669	0,55	0,42
4	TIE	Rektum	p.Gly34Glu	CTNNB1		1,14	0,59
4	TIE	Rektum	p.His36Tyr	CTNNB1		1,19	0,42
4	EM	Douglas	p.Gly12Asp	KRAS	1,18	0,84	0,67
4	OMA	Linkes Ovar	p.Gly12Asp	KRAS		0,94	0,67
4	TIE	Rektum	p.Gly12Asp	KRAS		1,89	0,67
4	EM	Douglas	p.Gly13Asp	NRAS	0,972		
4	OMA	Linkes Ovar	p.Gly13Asp	NRAS	0,752	0,76	0,39
4	TIE	Rektum	p.Gly13Asp	NRAS		0,76	0,39
4	OMA	Linkes Ovar	p.Gly1049Ser	PIK3CA	1,288	0,37	0,71
4	OMA	Linkes Ovar	p.Glu545Lys	PIK3CA	0,841	0,45	0,58
4	OMA	Linkes Ovar	p.Glu542Lys	PIK3CA	1,163	0,58	0,6
4	EM	Douglas	p.Gly1049Ser	PIK3CA	0,933		
4	EM	Douglas	p.Met1043Ile	PIK3CA	1,056		
4	EM	Douglas	p.Glu545Lys	PIK3CA	0,993	0,784	0,58
4	EM	Douglas	p.Glu542Lys	PIK3CA	1,075	1,36	0,6
4	TIE	Rektum	p.Glu545Lys	PIK3CA		1,06	0,58
4	EM	Douglas	p.Glu542Lys	PIK3CA	1,075	1,61	0,6
4	OMA	Linkes Ovar	p.Met1043Ile	PIK3CA	1,093	1,35	0,25

## Anhang

4	EM	Douglas	p.Glu545Lys	PIK3CA	0,993	1,75	0,58
4	TIE	Rektum	p.Gly1049Ser	PIK3CA		1,47	0,71
4	TIE	Rektum	p.Glu542Lys	PIK3CA		1,46	0,6
4	TIE	Rektum	p.Met1043Ile	PIK3CA		1,67	0,25
6	TIE	Rechtes Lig. Sacrout.	p.Met1043Ile	PIK3CA	0,953	0,62	0,25
6	EM	Linke Beckenwand	p.Met1043Ile	PIK3CA	0,583	0,64	0,25
7	EM	Linke Beckenwand	p.Glu542Lys	PIK3CA	0,398	0,218	0,6
7	TIE	Narbe	p.Glu542Lys	PIK3CA	0,813	0,3	0,6
8	OMA	Linkes Ovar	p.Ser37Phe	CTNNB1	1,264	0,51	0,46
8	TIE	Appendix	p.Ser37Phe	CTNNB1		0,57	0,46
8	TIE	Appendix	p.Gly12Val	KRAS		0,029	0,07
8	OMA	Linkes Ovar	p.Gly12Val	KRAS	2,338	1,51	0,07
8	OMA	Linkes Ovar	p.Gly13Asp	NRAS	1,318	0,7	0,39
8	TIE	Appendix	p.Gly13Asp	NRAS		0,65	0,39
9	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly12Cys	KRAS		0,022	0,14
9	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly12Ala	KRAS		0,0019	0,04
9	TIE	Appendix	p.Gly12Val	KRAS		0,04	0,07
9	TIE	Appendix	p.Gly12Cys	KRAS	2,69	1,54	0,14
9	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly12Val	KRAS	1,998	2,58	0,07
9	TIE	Appendix	p.Gly12Ala	KRAS	4,34	4,4	0,04
9	TIE	Appendix	p.Glu545Lys	PIK3CA	0,814	0,17	0,58
9	OMA	Rechtes Ovar	p.Glu545Lys	PIK3CA	0,401	0,54	0,58
9	TIE	Appendix	p.Gln546Arg	PIK3CA		0,093	0,21
9	OMA	Rechtes Ovar	p.Gln546Arg	PIK3CA	2,899	2,75	0,21
13	TIE	Blase	p.Thr41Ile	CTNNB1	0,803	0,41	0,55
13	TIE	Blase	p.His36Tyr	CTNNB1	1,14	0,4	0,42
13	EM	Rechte Bauchwand	p.His36Tyr	CTNNB1		0,58	0,42
13	EM	Rechte Bauchwand	p.Thr41Ile	CTNNB1		0,85	0,55
13	TIE	Blase	p.Thr790Met	EGFR	1,278	0,31	0,24
13	EM	Rechte Bauchwand	p.Thr790Met	EGFR		3,6	0,24
13	TIE	Blase	p.Ser310Phe	ERBB2	1,763	0,38	0,47
13	EM	Rechte Bauchwand	p.Ser310Phe	ERBB2		0,55	0,47
13	TIE	Blase	p.Gly12Ser	KRAS	0,867	0,075	0,53
13	EM	Rechte Bauchwand	p.Gly12Ser	KRAS		0,25	0,53
19	TIE	Sigma	p.Gly12Ser	KRAS	8,177	0,94	0,67
19	EM	Pararektal	p.Gly12Ser	KRAS	0,577	7,39	0,67
20	EM	Blase	p.Gly12Asp	KRAS		0,45	0,67
20	TIE	Linkes Lig. Sacrout.	p.Gly12Asp	KRAS	1,275	2,25	0,67
21	OMA	Linkes Ovar	p.Gly12Asp	KRAS		0,46	0,67

Anhang

21	OMA	Rechtes Ovar	p.Gly12Asp	KRAS	1,252	1,55	0,67
21	TIE	Blase	p.Gly12Asp	KRAS	2,303	2,37	0,67
21	TIE	Septum rektovaginale	p.Gly12Asp	KRAS	5,967	6,92	0,67
21	TIE	Linkes Lig. Sacrout.	p.Gly12Asp	KRAS		2,4	0,67
22	TIE	Rechtes Lig. Sacrout.	p.Thr793Met	ERBB2	0,889		
22	TIE	Rechtes Lig. Sacrout.	p.Gly12Ala	KRAS		0	0,04
22	TIE	Linkes Lig. Sacrout.	p.Gly12Ala	KRAS		0	0,04
22	EM	Douglas	p.Gly12Ala	KRAS	1,737	1,36	0,04
22	EM	Douglas	p.Arg196*	TP53	0,934		
24	TIE	M. Psoas rechts	p.Thr790Met	EGFR		0,056	0,24
24	TIE	Septum rektovaginale	p.Thr790Met	EGFR		0,12	0,24
24	TIE	Linkes Lig. Sacrout.	p.Thr790Met	EGFR	2,456	0,52	0,24

**Tabelle A2** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Fall	Typ	Lokalisation	PTEN	ARID1A	TP53
1	OMA	rechtes Ovar	ungültig	ungültig	nicht durchgeführt
	TIE	Rektum	Intakt	intakt	nicht durchgeführt
2	OMA	rechtes Ovar	heterogener Verlust	intakt	nicht durchgeführt
	TIE	Rektum	heterogener Verlust	intakt	nicht durchgeführt
3	OMA	linkes Ovar	intakt	heterogener Verlust	intakt
	EM	Rektum	intakt	heterogener Verlust	intakt
	TIE	Douglas	intakt	intakt	ungültig
	TIE	Vagina	intakt	intakt	ungültig
4	TIE	Rektum	intakt	intakt	nicht durchgeführt
	OMA	linkes Ovar	ungültig	ungültig	nicht durchgeführt
	TIE	Douglas	intakt	intakt	intakt
5	EM	rechtes Ovar	intakt	intakt	intakt
	TIE	Rektum	intakt	intakt	intakt
6	TIE	Linke Beckenwand	intakt	intakt	intakt
	TIE	Rechtes Lig. sacrot.	intakt	intakt	intakt
7	EM	Linke Beckenwand	intakt	intakt	intakt
	TIE	Narbe	intakt	intakt	intakt
8	OMA	linkes Ovar	intakt	intakt	intakt
	EM	Rechte Beckenwand	heterogener Verlust	intakt	ungültig
	EM	Rechtes Lig. sacrot.	intakt	intakt	intakt
	TIE	Appendix	heterogener Verlust	intakt	intakt
9	TIE	Appendix	intakt	intakt	nicht durchgeführt
	OMA	rechtes Ovar	intakt	intakt	nicht durchgeführt
10	EM	Colon	intakt	intakt	intakt
	TIE	Blase	intakt	intakt	intakt
11	OMA	linkes Ovar	ungültig	intakt	nicht durchgeführt
	TIE	Sigmoid	intakt	intakt	intakt
	TIE	Sigmoid	intakt	intakt	intakt
12	TIE	Blase	intakt	intakt	intakt
	OMA	linkes Ovar	intakt	intakt	intakt
13	TIE	Blase	intakt	intakt	intakt
	OMA	linkes Ovar	intakt	intakt	intakt
	EM	Rechte Bauchwand	intakt	intakt	intakt
14	OMA	linkes Ovar	intakt	intakt	intakt

Anhang

	TIE	Sigmoid	intakt	intakt	intakt
15	OMA	linkes Ovar	intakt	intakt	nicht durchgeführt
	TIE	Vagina	intakt	intakt	intakt
	TIE	Rektum	intakt	intakt	nicht durchgeführt
16	TIE	Septum rektovaginale	intakt	intakt	nicht durchgeführt
	OMA	rechtes Ovar	intakt	intakt	nicht durchgeführt
17	EM	Linkes Lig. Sacroul.	intakt	intakt	intakt
	TIE	Narbe	intakt	intakt	intakt
18	TIE	Appendix	intakt	intakt	intakt
	OMA	rechtes Ovar	intakt	intakt	intakt
19	EM	Pararektal	heterogener Verlust	intakt	intakt
	TIE	Sigma	intakt	intakt	intakt
20	EM	Blase	Verlust	ungültig	intakt
	TIE	Linkes Lig. sacroul.	intakt	intakt	intakt
21	OMA	rechtes Ovar	intakt	intakt	nicht durchgeführt
	TIE	Septum rektovaginale	intakt	intakt	nicht durchgeführt
	OMA	linkes Ovar	intakt	intakt	nicht durchgeführt
	TIE	Rechtes Lig. sacroul.	intakt	intakt	intakt
	TIE	Linkes Lig. sacroul.	intakt	intakt	nicht durchgeführt
	TIE	Blase	intakt	intakt	intakt
22	TIE	Rechtes Lig. sacroul.	intakt	intakt	intakt
	EM	Douglas	intakt	intakt	intakt
	TIE	Linkes Lig. sacroul.	intakt	intakt	intakt
23	TIE	Umbilicus	intakt	intakt	intakt
	OMA	rechtes Ovar	ungültig	ungültig	nicht durchgeführt
24	TIE	Rechter M. psoas	intakt	intakt	intakt
	TIE	Septum rektovaginale	heterogener Verlust	intakt	intakt
	TIE	Linkes Lig. sacroul.	intakt	intakt	intakt
	EM	Blase	intakt	intakt	intakt
25	OMA	linkes Ovar	intakt	intakt	intakt
	TIE	Rechte Beckenwand	intakt	intakt	nicht durchgeführt
	EM	Linke Beckenwand	heterogener Verlust	intakt	ungültig
26	TIE	Linke Beckenwand	intakt	intakt	intakt
	EM	Douglas	intakt	intakt	intakt
27	EM	Blase	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
	EM	Pararektal links	intakt	intakt	intakt
	TIE	Rechte Fossa ovarica	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt

\_\_\_\_\_Anhang\_\_\_\_\_

	TIE	Rechtes Lig. sacrot.	intakt	intakt	intakt
	TIE	Pararektal rechts	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt