

Masterarbeit

Genom-weite Assoziationen muzinöser Beckenkarzinome

eine Pilotstudie

Genome-wide Associations in Mucinous Pelvic Carcinomas

A Pilot Study

eingereicht von

Dr. med. univ. Wolfgang Martin Johannes Schöll

Zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science in Medizinischer Genetik

(MSc)

An der

Medizinischen Universität Graz

Ausgeführt am

Institut für Humangenetik und am Institut für Pathologie sowie an der Univ.
Frauenklinik Graz

Unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. Jochen Bernd Geigl

Graz, April 2018

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 15.04.2018

Dr. Wolfgang Schöll eh

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Jochen Geigl für die geduldige Betreuung der Masterarbeit und die rasche, verlässliche Reaktion bei Fragen und der Korrektur.

Meine Dankbarkeit gebührt darüber hinaus Dr. Stephan Jahn für die Hilfe in allen Belangen der Pathologie und Dr. Karl Kashofer für die Transkriptomanalysen.

Peter Ulz verdient meinen Dank für die bioinformatische Analyse und die Unterstützung in der Dateninterpretation.

Prof. Dr. Uwe Lang schafft durch seine offene Art eine Atmosphäre, in der wissenschaftliche Initiative fachübergreifend gedeihen kann – dafür sei ihm vielmals gedankt!

Ein aus klinischen Fragestellungen entstandenes Interesse für Medizinische Genetik führte nicht nur zur Absolvierung des gleichlautenden Universitätslehrgangs, sondern auch zur Wissensvertiefung der in der Masterthesis bearbeiteten Thematik. Der formale Abschluss war neben der beruflichen Herausforderung in Klinik und Ordination, trotz einer disziplinierenden Ethikkommission und neben allen Aufgaben in einer Familie ein ehrgeiziges Ziel.

Ich wäre heute nicht in diesen Lebensumständen, hätte ich nicht Unterstützung und Verständnis meiner Familie gehabt. Meine Söhne Paul und Theodor haben mit ihrer herzlichen Dynamik das Leben bereichert, meine Frau Carmen hat mit ihrem Optimismus dem Leben Halt gegeben – dafür der allergrößte Dank! Dauerhafter Danke gilt meinen Eltern, die mich seit Jahrzehnten bedingungslos unterstützen.

Zusammenfassung

Einleitung: Muzinöse Karzinome im Becken werden in den Ovarien, den Tuben, dem Peritoneum, der Zervix uteri, dem Colon, dem Rektum und der Appendix gefunden. Diese Tumoren teilen makroskopische, mikroskopische und immunhistochemische Eigenschaften und sind häufig nicht durch Gewebscharakteristika, sondern oftmals nur durch den Ort ihrer Entstehung oder gar nicht zu unterscheiden. In dieser Arbeit soll versucht werden zu klären, ob neben den makroskopischen, histologischen und immunhistochemischen Gemeinsamkeiten auch genetische Übereinstimmungen bestehen.

Material und Methodik: Einerseits wurde eine Literaturübersicht mit Volltextdatenbanksuche mittels Ovid Technology und PubMed durchgeführt. Andererseits erfolgte in einer Pilotstudie die Untersuchung des gesamten Transkriptoms eines muzinösen Ovarialkarzinomes (MOC) mittels Microarray Technik und Hochdurchsatz-Sequenzierung. Diese Daten sind *in silico* nicht abrufbar. Das Transkriptom des MOCs wurde mit aus öffentlich zugänglichen Daten des „Cancer Genom Atlas“ (TCGA) von anderen muzinösen Karzinomen, hauptsächlich kolorektalen Karzinomen (CRC) verglichen. Die dafür verwendete bioinformatische Berechnung erfolgte mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA).

Ergebnisse: Aus Literaturdaten ergibt sich, dass das immunhistochemische Muster von CK7, CK20, CDX2, SATB2 sowie der Muzin-Protein Familie keine verlässliche Unterscheidung der muzinösen Karzinome erlauben. Alle muzinösen Karzinome im Becken teilen häufige Mutationsfrequenzen der Gene *KRAS*, *SMAD4* und *NTRK1*. Die Gene *BRAF*, *PIK3CA*, *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS1*, *hPMS2* sind bei muzinösen Karzinomen eher selten mutiert. Die chromosomale Region 19q13.1-13.4, besonders 19q13.2 beinhaltet MOC und CRC spezifische SNPs. Quantitative Trait Loci (QTL) Assoziationen für MOCs und CRCs lassen sich für *PAX8* auf 2q13 und für *HOXD9* auf 2q31.1 finden. Die Resultate der Microarray-Analyse des Transkriptoms im Vergleich zu *in silico* Daten zeigen einerseits Microarray-Plattform bedingte Unterschiede. Muzinöse Ovarialkarzinome unterscheiden sich in ihrem Transkriptom distinkt von serösen Ovarialkarzinomen und liegen zwischen serösen Ovarialkarzinomen und CRCs.

Schlussfolgerung: Das MOC ist nicht nur makroskopisch, mikroskopisch und immunhistochemisch anderen muzinösen Karzinomen im Becken sehr ähnlich, sondern scheint auch genetisch denselben Ursprung zu haben – der Beweis dafür steht aber weiterhin aus.

Abstract

Introduction: This study hypothesizes that mucinous carcinomas in the pelvis not only share gross, microscopic, and immunohistochemical, but also genetic characteristics.

Material and Methods: A review of the literature was performed based on online bibliographic databases and academic journals provided by Ovid Technologies and PubMed. In addition, a whole transcriptome analysis of mucinous ovarian cancers (MOC) had to be done in a pilot study due to the lack of these data in open source genome databases such as e.g. the Cancer Genome Atlas (TCGA). Frozen specimen of locally archived mucinous ovarian carcinomas were used to extract RNA. Whole mRNA was transcribed to DNA by rt-PCR and analyzed by RNASeq Method based on Transcriptome Sequencing by means of Ion Torrent Next-Generation Sequencing and on microarray techniques by means of Affymetrix U133 plus 2 platform, respectively. The transcriptome data of MOCs were compared to open source in silico data of other mucinous carcinomas in the pelvis such as colorectal cancers (CRC) and serous ovarian cancers, respectively. Bioinformatic analysis was performed using Principal Component Analysis (PCA).

Results: The review of the literature does not support the existence of an immunohistochemical pattern based on CK7, CK20, CDX2, SATB2 and the Mucin-Protein family to unequivocally distinguish mucinous carcinomas of the pelvis. MOCs and CRCs are characterized by frequent mutations of the *KRAS*, *SMAD4* und *NTRK1* Genes, whereas *BRAF*, *PIK3CA*, *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS1*, *hPMS2* rarely are mutated in mucinous carcinomas of the pelvis. The chromosomal regions 19q13.1-13.4, in particular 19q13.2 are harboring SNPs specific for both, CRCs and MOCs. Expression quantitative trait locus (eQTL) associations for MOCs and CRCs were identified for *PAX8* at 2q31 and for *HOXD9* at 2q13. PCA of transcriptome data analyzed by means of Affymetrix U133 plus 2 platform in comparison to in silico data most likely are influenced by different platforms rather than by biological signals. Nevertheless, by analyzing the 2nd and 3rd principal component, MOCs distinctly differ from serous ovarian cancer and are located closer to CRCs.

Conclusion: Mucinous carcinomas in the pelvis do not only present distinct common macroscopic, histologic and immunohistochemical features but also share a variety of genetic associations. At that time there is strong but not compelling evidence to prove the common genetic origin.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
Einleitung und Literaturübersicht	2
Karzinome im Becken mit muzinöser Histologie	2
Ovarialkarzinom, Tubenkarzinom und Peritonealkarzinom	2
Hereditäre Ovarialkarzinome	4
Muzinöse Ovarialkarzinome	5
Kolorektales Karzinom	7
Karzinogenese	7
Klassische Adenom-Karzinom-Sequenz	8
Serratierter Karzinogeneseweg	9
Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer Syndrom (HNPCC)	11
Karzinom der Appendix vermiformis	14
Zervixkarzinom	17
Muzinöses Adenokarzinom vom gastrischen/intestinalen Typ und muzinöses Adenokarzinom vom zervikalen Typ	17
Histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Assoziationen muzinöser Karzinome im Becken	19
Lichtmikroskopie	19
Immunhistochemie	20
Tumorgenetik	21
<i>KRAS</i> und <i>BRAF</i> Mutationen	21
<i>SMAD4</i> und <i>NTRK1</i> Mutationen	23
<i>PIK3CA</i>	23
Mikrosatelliten Instabilität MSI	23
Genexpressions- und Transkriptionsprofile	24
Genomweite Assoziationsstudien	25
Pilotstudie	26
Methodik	26
Sequenzierung	28
Sequenzierung mittels Synthese	28
Ion Torrent Sequenzierung	29
Read Alignment und Bioinformatik	30
Array CGH, Microarray	30
Ergebnisse	31
Zusammenfassung und Diskussion	40
Literatur	42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genetische Alteration und Entwicklung des kolorektalen Karzinoms	9
Abbildung 2: Therapiestruktur beim kolorektalen Karzinom	13
Abbildung 3: Therapiestruktur beim kolorektalen Karzinom im Stadium IV	14
Abbildung 4: Analyse der ersten Hauptkomponente: Abhängigkeit von Microarray Plattformen	35
Abbildung 5: Weitere Hauptkomponentenanalyse ohne ersichtliche Diskrimination	36
Abbildung 6: Erweiterung der Analyse um gesundes Ovarialgewebe und gesundes Kolongewebe	37
Abbildung 7: Muzinöses Ovarialkarzinom im Vergleich zu anderen Geweben	38
Abbildung 8: Muzinöse und nicht-muzinöse Adenokarzinomen des Kolons im Vergleich	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Plattformen, Art der Gewebstypen, Probenanzahl, Herkunft	32
Tabelle 2: Affymetrix Product Family Data Sheet	33

Abkürzungen

APC	Adenomatous polyposis coli
BRAF	„proto-oncogene B-Raf“ oder „v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1“
BRCA	Breast cancer antigen
CDKN2A	cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
CDX2	caudal type homeobox 2
CIMP	CpG island methylator phenotype
CK	Zytokeratin
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique)
hMLH1	human mutL homolog 1
MAP	mitogen-activated protein
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MRN	Protein Komplex der Proteine Mre11, Rad50 und Nbs1
MSI-H	Micro satellite instability high
MSI-L	Micro satellite instability low
P16	Protein 16
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma
RAS	rat sarcoma viral oncogene homolog; K-RAS: Kirsten RAS
RB	Retinoblastoma
RNA-Seq	auf Next-Generation Sequencing basierende Bestimmung der Nukleotidabfolge der RNA
SATB2	special AT-rich sequence-binding protein 2
SNP	single nucleotid polymorphisme
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TP53	Tumor Protein 53
VHL	Von Hippel Lindau

Einleitung und Literaturübersicht

Karzinome im Becken mit muzinöser Histologie

Muzinöse Karzinome im Becken werden in den Ovarien, den Tuben, dem Peritoneum, der Zervix uteri, dem Colon ascendens, transversum und descendens, dem Colon sigmoideum, dem Rektum und der Appendix gefunden. Diese Tumoren teilen makroskopische, mikroskopische und immunhistochemische Eigenschaften und sind häufig nicht durch Gewebscharakteristika, sondern oftmals nur durch den Ort ihrer Entstehung oder gar nicht zu unterscheiden. Trotz dieser eindrucksvollen Übereinstimmungen werden unterschiedliche Behandlungsstrategien angewandt, die von verschiedenen medizinischen Fachrichtungen ausgeführt ein breites Spektrum von chirurgischen, medikamentösen oder radioonkologischen Therapien beinhalten. Im Vergleich derselben Tumorstadien der o. a. Organe werden differierende Überlebensraten berichtet. So werden zum Beispiel die Fünf-Jahres-Überlebensraten von muzinösen Ovarialkarzinomen (MOC) im Vergleich zu stadienäquivalenten muzinösen kolorektalen Karzinomen (CRC) in großen Untersuchungsserien mit 21% (1) bzw. 54% (2) angegeben.

In dieser Arbeit soll versucht werden zu klären, ob neben den o. a. makroskopischen, histologischen und immunhistochemischen Gemeinsamkeiten auch genetische Übereinstimmungen bestehen.

Die o. a. Karzinome im Becken können eine muzinöse Differenzierung zeigen und sollen im Folgenden kurz beschrieben werden. Auf besonders seltene Lokalisationen wie im Dünndarm, in der Prostata, im Anus und Analkanal, im Corpus uteri, in der Vagina, im Urogenitalsystem bzw. auf muzinöse Karzinome im Oberbauch wird in dieser Darstellung nicht eingegangen.

Ovarialkarzinom, Tubenkarzinom und Peritonealkarzinom

Die epithelialen malignen Tumore von Ovar, Tube und Peritoneum werden wegen ihrer anatomischen, histologischen, diagnostischen und therapeutischen Ähnlichkeit zusammengefasst. Alle für das Ovarialkarzinom angeführten Fakten haben in gleicher Weise für das Peritoneal- und Tubenkarzinom Gültigkeit.

Das Ovarialkarzinom zeigt in Mitteleuropa eine sinkende Inzidenz und wird mit einer altersstandardisierten Inzidenz von etwa 10:100.000 beobachtet. Mit etwa 4 % aller Karzinome der Frauen und etwa 6 % aller Krebssterbefälle ist der Eierstockkrebs damit nach dem Brustkrebs die

häufigste tödliche gynäkologische Krebserkrankung. (3) (4) Das Therapiekonzept zielt auf eine optimale chirurgische Tumorreduktion ohne peritonealen Tumorrest ab. Die systematische Lymphonodektomie verliert zunehmend an Bedeutung. (5) Patientinnen mit FIGO Stadien > Ia profitieren üblicherweise von systemischer, meist intravenöser – selten intraperitonealer – Platin-basierter Chemotherapie. In Abhängigkeit von histologischen oder biologischen Faktoren werden zielgerichtete Therapiekonzepte wie z.B. Angiogenesehemmer oder Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitoren eingesetzt.

Maligne Tumoren des Ovars werden nach histologischen Kriterien differenziert. Es werden epitheliale Karzinome von Keimzelltumoren und Keimstrang-Stroma-Tumoren unterschieden. Die epithelialen Tumoren haben einen Anteil von etwa 90% und werden weiter in seröse, muzinöse, klarzellige, endometroidzellige, undifferenzierte Karzinome, maligne Brenkertumore und Karzinosarkome unterteilt. Eine neue Gruppe stellt die Entität der seromuzinösen Karzinome dar, die bei den Zervixkarzinomen weiter besprochen werden. (6)

Die serösen Tumoren als häufigste Entität werden in low-grade (LGSC) und high-grade (HGSC) seröse Karzinome eingeteilt. Diese Tumoren sind nicht nur morphologisch, sondern auch in ihrem klinischen Verhalten unterschiedlich. LGSCs brauchen für ihre Entstehung üblicherweise eine *BRAF*- oder *KRAS*-Mutation, HGSCs entwickeln sich in der Regel über eine *TP53*-Mutation. Eine weitere Differenzierung eines LGSC in ein HGSC ist eine seltene Eventualität. (7)

Aufgrund morphologischer und molekulargenetischer Analysen in Verbindung mit typischen klinischen Verläufen wird eine (andere) duale Einteilung der epithelialen Ovarialkarzinome vorgenommen. Typ I-Tumoren (etwa 25% aller Ovarialkarzinome) beschränken sich überwiegend auf das Organ, entstehen aus definierten Vorstufen (low-grade seröse Karzinome, endometrioiden Karzinome, seromuzinöse Karzinome, muzinöse Karzinome, klarzellige Karzinome sowie maligne Brenkertumoren). Typ II-Karzinomen (etwa 75% aller Ovarialkarzinome) sind hoch-maligne Tumore. Sie verhalten sich aggressiv, wachsen schnell und werden meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert (high-grade seröse Karzinome, alle gemischten Karzinome mit Ausnahme des seromuzinösen Typs und alle Karzinosarkome). Der Typ II ist für circa 90 % der Mortalität bei Ovarialkarzinomen verantwortlich. (8)

(3)

Hereditäre Ovarialkarzinome

Die breitere Verfügbarkeit von Next-Generation Sequencing (NGS) erlaubt es, nach molekularen oder genomischen Veränderungen bei Ovarialkarzinomen zu suchen und Patientinnen zu charakterisieren, die von einer individualisierten, gezielten Therapie profitieren können. Epitheliale Ovarialkarzinome mit Defizienz der homologen Rekombinationsreparaturmechanismen („deficient homologous recombination repair“, HRD) zeigen besondere Sensitivität gegenüber Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitoren. (9) (10) (11) Die Mehrzahl der HRD Tumoren zeigt Keimzellmutationen in *BRCA1* und *BRCA2*, obwohl es auch Keimzellmutationen in anderen Genen gibt, die in den HR Signaltransduktionspfad eingebunden sind. Darüber hinaus gibt es auch somatische HRD Mutationen. Insgesamt weisen etwa 50 Prozent der high grade serösen Ovarialkarzinome eine HR-Defizienz auf, wie Daten aus dem Cancer Genome Atlas (TCGA) belegen. (12)

HR ist ein wichtiger Mechanismus, um DNA Doppelstrangbrüche während der S und G2 Phase des Zellzyklus zu reparieren. Die DNA Reparatur im Zuge der HR ist fehlerfrei, weil das in der G2 Phase vorliegende (in der S-Phase zuvor verdoppelte) Schwesterchromatid oder das intakte homologe Chromosom zur Wiederherstellung des defekten DNA-Stranges herangezogen wird. (13) Die translatierten Proteine der Gene *BRCA1* und *BRCA2* sowie des MRN Komplexes (*NBS1/RAD50/MRE11*), die Gene *CtIP*, *MRE11*, *RAD51*, *ATM*, *H2AX*, *PALB2*, *RPA*, *RAD52* und Proteine des Fanconi Anämie Signalpfades greifen in diesen Reparaturmodus ein. (14) (15) Diese Gene werden terminologisch auch als HRD Gene bezeichnet. (16) Wenn, wie bei der Keimbahnmutation vorliegend, von 2 homologen HRD-Genen eines bereits mutiert ist, führt eine zweite Mutation („second hit“) zum Funktionsverlust des zweiten (homologen) Alleles. Dieser Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) führt zum Funktionsverlust („Loss of Function“) des korrespondierenden Proteins und damit zur HR-Defizienz. Anstelle der HR treten andere Mechanismen der Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen oder Inter-Strang-Vernetzungen wie die „Nicht homologe End-zu-End-Verknüpfung (nonhomologous end-joining, NHEJ). Diese Form der Reparatur ist im Gegensatz zur HR nicht fehlerfrei, kann auf sich alleine gestellt zusätzliche Mutationen nicht eliminieren und führt über chromosomale Instabilität zur malignen Transformation von Zellen.

Die häufigsten und bekanntesten Mutationen der HRD Gene sind jene in *BRCA1* und *BRCA2*, die, wenn sie in der Keimbahn vorliegen, den hereditären Ovarialkarzinomen zugrunde liegen. Bei Frauen führt diese familiäre Konstellation außerdem zu gehäuft auftretenden Mammakarzinomen und anderen Malignomen.

Neben somatischen Mutationen der HRD Gene ist auch das Thema der epigenetischen Veränderungen der HRD Gene von Interesse. *BRCA1* und *BRCA2* Silencing kann auch durch deren Promotor-

Methylierung verursacht werden. Die klinischen Auswirkungen der epigenetischen Einflüsse auf HRD Gene sind unklar, was sich in widersprüchlicher Evidenz zeigt. Einerseits wird von schlechteren Überlebensraten bei Patientinnen mit *BRCA1* Promotor Methylierung im Vergleich zu *BRCA1* Keimbahnmutationen und *BRCA1* wild-Typ ohne Promoter-Hypermethylierung berichtet, (17) andererseits zeigen TCGA Daten keinen prognostischen Unterschied bei diesen epigenetischen Konstellationen. (12)

Muzinöse Ovarialkarzinome

Muzinöse Ovarialkarzinome (MOC) sind nicht einfach zu charakterisieren. Primäre Ovarialkarzinome haben mit einem Anteil von etwa 3-5 % aller Ovarialkarzinome eine geringere Inzidenz als früher angenommen. (18) Historisch wurden MOCs in 15% aller Ovarialkarzinome diagnostiziert. Der Grund für die vermeintliche Überdiagnose in der Vergangenheit ist einerseits in der Schwierigkeit der verlässlichen Unterscheidung von metastatischen Tumoren vom Gastrointestinaltrakt, andererseits in pathologischer Konsensusfindung zur besseren Unterscheidungen von nicht invasiven muzinösen Tumoren zu suchen. (19) Auch das „Nicht-Auffinden“ eines nicht ovariellen muzinösen Karzinoms bei Befall der Ovarien kann zur Diagnose eines MOCs mit ovarieller de novo Entstehung berechtigen. Die eher niedrige Inzidenz der MOCs gestaltet die Suche nach Ätiologie und Pathogenese herausfordernd. Aus makroskopischer Perspektive zeigen sich MOCs als unilaterale, schleimgefüllte Masse an einer Adnexe. Bei Befall beider Adnexen ist ein metastatischer Befall wahrscheinlich, wenngleich der unilaterale Befall eine Metastasierung von Magen, Colon, Appendix oder Pankreas nicht ausschließt. Mikroskopisch werden MOCs als Tumoren mit einem auffallend großen, intraepithelialen Schleimgehalt beschrieben. Dabei soll der Anteil des intrazellulären Muzins ≥ 50 % des Zytoplasmas in mehr als 90% der Tumorzellen betragen. Das Epithel der MOCs wächst zum einen in einem expansilen Muster mit kribriform, Rücken an Rücken liegenden Drüsen mit sehr geringem Stromaanteil und kaum nachweisbarer Stromainvasion (expansile type), zum anderen in einem infiltrativen Muster mit Drüseninvasion und desmoplastischer Stromareaktion (infiltrative type). (20)

Das histologische Erscheinungsbild ist vom Gewebstyp entweder intestinal oder gastral. Dabei ist für die Zuordnung zum gastralen bzw. intestinalen Gewebstyp der Nachweis von Becherzellen nicht erforderlich. Auch der endozervikale Typ des MOCs wird als eine mögliche Variante beschrieben. (21) (19) (22) (3) (7) Dieser Tumortyp wird seit 2014 als seromuzinöses Karzinom bezeichnet.

Häufig finden sich in MOCs auch Epithelanteile von muzinösen Zystadenomen und muzinösen Borderlinetumoren, sodass zumindest ein kontinuierlicher Übergang der prämaligen in die malignen Formen suspiert werden kann.

Auf genetischer Ebene haben MOCs im Allgemeinen keinen Bezug zu *BRCA1* und *BRCA2* Keimbahnmutationen, sondern beschränken sich überwiegend auf somatische *KRAS* Mutationen, die in benignen, Borderline -oder malignen Komponenten desselben Tumors vorhanden sein können. (23) (21) (24) Dieser Umstand könnte ein früher gemeinsamer somatischer Schritt in einer multifaktoriell begründeten Progression zur malignen Transformation sein.

BRAF Mutationen von MOCs werden widersprüchlich publiziert. Entgegen der Vermutung von häufig vorliegenden *BRAF* Mutationen bei MOCs (3) (25) sind in größeren Fallserien von 50 Patientinnen mit MOC keine *BRAF* Mutationen bei muzinösen Tumoren detektiert worden. Diese Beobachtung zeigte sich auch bei MOCs ohne *KRAS* Mutation. Die RAS-RAF-MEK-ERK-MAP Kinase Signal Transduktion wurde ohne *KRAS* Mutation nicht alternativ durch eine *BRAF* Mutation aktiviert, wie dies häufig bei CRCs (kolorektale Karzinome) beobachtet wird. (23)

Im gesunden Ovar sind keine schleimbildenden Zellen zu finden, sodass Unklarheit besteht, welcher Zelltyp letztendlich zur muzinösen Zelle transformiert. Eine Vermutung legt nahe, dass sich MOCs aus endozervikalen Metaplasien von kleinherdig vorliegenden Zellen Müller-Gangscher Herkunft des Keimepithels oder von Inklusionszysten entwickeln. (24) (26) (27) Dieser endozervikale Gewebstyp ist aber seltener als die intestinal differenzierten Typen mit voll invasiven Karzinomen beobachtet. Leider stellt sich die Ursache der Entstehung von MOCs noch komplizierter dar: Expressionsanalysen von MOCs haben (bei zwar kleiner Fallzahl) den Verdacht nahegelegt, dass diese Tumoren eine enge Verwandtschaft zu Epithelzellen des Colons bzw. zu CRCs haben und ihre Pathogenese demzufolge sehr ähnlich ist. (24) (28) (29)

Eine Besonderheit stellen Borderline Tumore (BOT) des Ovars dar. Borderline Tumore zeigen atypische Epithelproliferationen, sind aber nicht invasiv wachsende Neoplasien. Die Unterscheidung der sechs histologischen Subtypen erfolgt in Analogie zu den invasiven Karzinomen. Der seröse (50-55 %) und muzinöse (40-45 %) Subtyp machen die Hauptanteile der BOTs aus. BOTs werden synonym auch als atypische proliferative Tumoren (APT) bezeichnet.

Die Diskriminierung zwischen BOTs und einem Zystadenom des Ovars erfolgt seit der letzten WHO-Klassifikation für die (serösen oder muzinösen) Tumoren anhand atypischer Epithelproliferation von mehr als 10% des Gesamtepithels. (7) (30)

Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist weltweit der dritthäufigste Tumor. (31) Kolon- und Rektumkarzinom haben viele Gemeinsamkeiten in Entstehung und Histologie. Unterschiede bestehen in der präoperativen, der operativen und der adjuvanten Therapie. In dieser Darstellung werden das Kolon- und das Rektumkarzinom zusammengefasst. Bei Frauen ist das CRC sogar der zweithäufigste maligne Tumor in Mitteleuropa. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 70-75 Jahren. Personen mit genetischer Belastung können schon Jahrzehnte früher erkranken. Die altersstandardisierte Inzidenz an Neuerkrankungen im deutschsprachigen Mitteleuropa liegt bei etwa 60:100.000. (32) (33)

Histologisch findet man beim kolorektalen Karzinom in über 95% der Fälle ein Adenokarzinom. Weniger häufig sind Siegelringzellkarzinome, muzinöse Adenokarzinome, adenosquamöse Karzinome und andere Tumortypen wie Plattenepithelkarzinome, Lymphome, Sarkome oder neuroendokrine Tumore. Muzinöse Karzinome werden in 11 bis 17 Prozent aller CRCs diagnostiziert. (34) (35) Die Differenzierung wird in einer vierstufigen Graduierung angegeben (G1 – G4). Das Tumorstadium orientiert sich an der TNM-Klassifikation.

Die Prognose von Patienten mit Kolonkarzinom ist abhängig vom Tumorstadium bei der Diagnose und anderen histologischen und biologischen Faktoren. Die Therapie ist den Stadien angepasst. Bei lokal begrenzten Tumoren ohne Fernmetastasierung ist die operative Therapie die erste Wahl. Im Stadium III und in Subgruppen des Stadiums II kann eine adjuvante Chemotherapie das Rezidivrisiko senken. Im Stadium IV werden sehr unterschiedliche Substanzen aus dem Bereich der Zytostatika, der monoklonalen Antikörper und der „targeted therapies“ (gezielten Therapieoptionen) eingesetzt.

Karzinogenese

Das CRC hat eine biologisch heterogene Ätiologie in umweltbedingten und genetischen Faktoren. Neben der Mehrzahl der sporadischen Tumoren, die auf somatischen Spontanmutationen beruhen, sind ein Drittel der Fälle durch hereditäre Keimbahnmutationen bedingt.

Klassische Adenom-Karzinom-Sequenz

Für die sporadisch auftretenden Karzinome wurde die Karzinogenese über die klassische „Adenom-Karzinomsequenz“ beschrieben. Der klassische Mechanismus der Abfolge über Entstehung aus einem Adenom und Entwicklung zu einem Karzinom hat molekularbiologisch häufig eine primäre Mutation (Gatekeeping Mutation) des *APC* Genes zur Grundlage. (36) (37) (38) Gatekeeping Gene werden als solche bezeichnet, wenn deren Mutation Tumorgenese induziert (s. Abbildung 1). Andere Beispiele für Gatekeeping Gene sind z.B. *RB1*, dessen Mutationen Retinoblastome induziert oder *VHL*, das bei Mutation Nierenzellkarzinome zur Folge haben kann. Sogenannte „Driver Genes“ führen danach durch Mutationen in ihrer Basensequenz und in weiterer Folge durch die Überexpression dieser Mutation zu einem selektiven Wachstumsvorteil von solcherart mutierten Zellen. Beim CRC sind dies z.B. *RAS*, *PIK3CA* und *TP53*, die konsekutiv mutieren können und dann zur klonalen (malignen) Expansion führen. Im Gegensatz dazu sind „Passenger Mutations“ solche, die begleitend zu „Driver Gene Mutations“ erfolgen und beobachtet werden, ohne dass dies zu einem klonalen Wachstumsvorteil der betroffenen Zellen führt. Trotz der nomenklatorisch logischen und scheinbar einfachen Unterscheidung zwischen „Driver Gene Mutations“ und „Passenger Mutations“ ist es in der Praxis nicht so einfach zu beurteilen, welche Mutationen nun die „Driver“ und welche die „Passenger“ sind. Ein „Driver Gene“ führt durch „Driver Gene Mutations“ zum Wachstumsvorteil. „Driver Genes“ können aber zusätzlich auch „Passenger Mutations“ enthalten, insbesondere wenn es sich um größere Gene wie z.B. das *APC*-Gen handelt. Nur solche Mutationen, die das codierte Protein in den 1600 N-terminalen Aminosäuren truncieren, sind „Driver Mutations“. Missense Mutationen im ganzen Gen oder Proteinbeschneidungen in den 1200 C-terminalen Aminosäuren haben lediglich die Bedeutung von „Passenger Mutations“. (37)

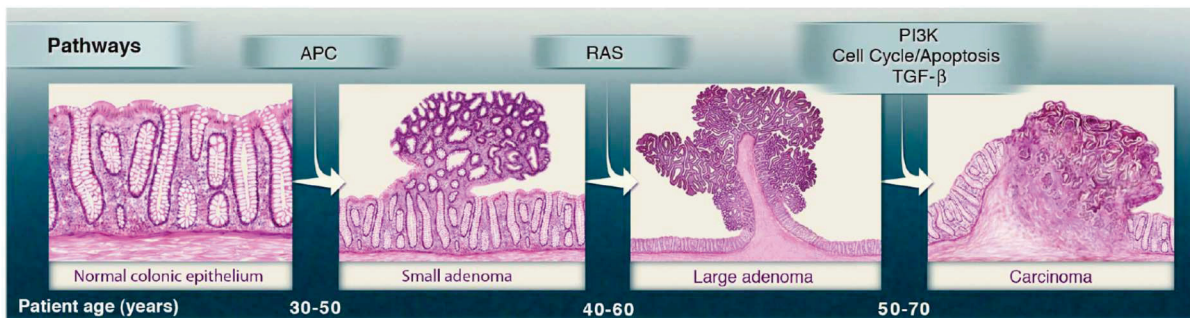


Abbildung 1: Genetische Alteration und Entwicklung des kolorektalen Karzinoms. Die wesentlichen Mutationen in Signalpfaden der Karzinogenese sind an den Übergangsstadien angeführt. Üblicherweise ein „Gate Keeping Gen“ und eines von mehreren „Driver Genen“ können mutiert werden. Das ungefähre Patientenalter gibt Hinweis auf die Zeitintervalle der Mutationen.

aus Vogelstein Cancer Genom Landscapes; 29 MARCH 2013 VOL 339 SCIENCE; mit Genehmigung der Reproduktion/with permission

Serratiertes Karzinogeneseweg

Neben dem o. a. klassischen Weg der Karzinogenese beim CRC besteht ein Pfad der Karzinomentstehung aus serratierten Adenomen („serratiertes Karzinogeneseweg“), die erst seit 2010 beschrieben sind. (39)

Sessile serratierte Adenome sind endoskopisch schwer zu entdeckende, nicht polypoide, flache Läsionen, die üblicherweise im rechten Kolon (proximal des Colon sigmoideum) lokalisiert sind und bei ihrer Diagnose meist etwa 5 mm im Durchmesser halten. Auf histomorphologische Details soll hier nicht eingegangen werden. Andere serratierte Läsionen sind hyperplastische Polypen und traditionell serratierte Adenome, die eher im linken Teil des Kolons anzutreffen sind und makroskopisch durch polypoides Wachstumsmuster ausgezeichnet sind.

Der serratierte Karzinogeneseweg kennt zwei Pfade. Für sessil serratierte Adenome ist die primäre Schlüsselmutation („Gate Keeping Mutation“) eine Veränderung im *BRAF* Gen mit Behinderung der physiologischen Apoptose, besonders die *V600E* Mutation. Als „Driver Mutationen“ könnten

darauffolgende Promotor (CpG) Insel-Methylierungen (CIMP) und Inaktivierung der *CDKN2A*, *hMLH1* und *MGMT* Gene gewertet werden. Dies führt neben einem Funktionsverlust des p16 Tumorsuppressor-Proteins zu einer hochgradigen Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H). Sessile serratiert Adenome sind die häufigste Vorläuferläsion für sporadische (nicht hereditäre, vgl. Lynch-Syndrom) hochgradig-mikrosatelliteninstabile CRCs.

Traditionell serratierte Adenome entwickeln sich über den 2. Pfad des serratierten Karzinogeneseweges und führen zu niedriggradig-mikrosatelliteninstabilen oder mikrosatellitenstabilen Tumoren. Dabei ist die entscheidende Schlüsselmutation viel häufiger eine *KRAS* Mutation als eine *BRAF* Mutation. Eine CIMP findet bei beiden Wegen statt, die hoch – oder niedriggradig sein kann (CIMP-H, CIMP-L). (40) (41)

In bis zu 30% treten CRCs „familiär gehäuft“ auf, ohne dass jedoch krankheitsverursachende genetische Konstellationen identifiziert werden können. Für diese Fälle wird der Begriff des „Familiären kolorektalen Karzinoms“ herangezogen. Erstgradig Verwandte (Kinder, Eltern) von Betroffenen mit einem CRC haben ein bis zu 3-fach erhöhtes Risiko selbst zu erkranken. Eine 4-fache Risikoerhöhung besteht, wenn das CRC bei dem Indexpatienten vor dem 60. Lebensjahr entstanden und/oder wenn das CRC mehr als eine erstgradig-verwandte Person betrifft. (42) (43) (44)

Weniger als 5% aller CRCs sind auf monogen hereditäre Mutationen zurückzuführen. Im Verdachtsfall sollte eine Keimbahnmutationssuche erfolgen. Alle Risikopersonen dieser Gruppe haben ein zusätzliches Risiko extraintestinaler Neoplasien. Der meist autosomal dominante Erbgang bedingt, dass erstgradig Verwandte von Betroffenen ein geschlechtsunabhängig 50%-iges Risiko haben, diese Disposition ebenso geerbt zu haben.

Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer Syndrom (HNPCC)

Das Lynch-Syndrom wird durch signifikante Keimbahnmutationen der Gene verursacht, die für die Proteine hMLH1 (humanes MutL Homolog 1) und MSH2 (MutS protein homolog 2) codieren. Diese Proteine sind die eukaryotischen Homologien zu den prokaryotischen Proteinen MutS und MutL und sind essentiell für die Entdeckung des „Mismatches“ (Basenfehlpaarungen) in synthetisierten Tochter-DNA Strängen und die Einleitung des notwendigerweise darauffolgenden Reparaturpfades („Mismatch Repair bzw. Mismatch Repair Defizienz) mit DNA Polymerase und DNA Ligase. Die zugrundeliegenden Gene werden deshalb auch den Tumor Suppressor Genen zugeordnet. MSH6, PMS1 und PMS2 sind weitere beim Lynch-Syndrom häufig durch einen Funktionsverlust betroffenen „Mismatch Repair“ Proteine. Mismatches treten besonders leicht an Stellen repetitiver kurzer DNA-Fragmente auf, die als „Mikrosatelliten“ bezeichnet werden. In Reparatur-defizienten Lynch-Syndrom assoziierten-Tumoren zeigt sich deshalb an vielen Stellen des Genoms ein vom Wildtyp der normalen Zellen abweichendes Mikrosatellitenmuster, was nomenklatorisch als „Mikrosatelliteninstabilität“ bezeichnet wird. Mikrosatelliteninstabile (meist hereditäre) Tumoren haben interessanterweise eine bessere klinische Prognose als die (meist nicht hereditären) mikrosatellitenstabilen Karzinome. (45) (46) (47)

Die Diagnose eines Lynch-Syndroms erfolgt entweder immunhistochemisch durch Expressionsverlust der Proteine MLH1, MSH2, PMS2 und MSH6 und/oder durch z.B. fluoreszierende Multiplex-PCR mit Markern wie BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250. (48)

Beachtenswert ist, dass etwa 15 % der sporadischen CRCs im Tumor MSI-H Veränderungen durch somatische Methylierungen des *hMLH1*-Promotors mit einer „Loss of Function“ Mutation und einen Ausfall des MLH1 Proteins zeigen. In diesen Fällen wird die Promotor-Methylierung von einer möglicherweise kausalen, zweiten somatischen p Val600Glu Mutation im *BRAF*-Gen begleitet. (49) (50) (51) (52) Lynch-Syndrom assoziierte CRCs weisen die BRAF-V600E Mutation nicht auf. Die Suche nach dieser Mutation kann helfen, „Germline MMR-Defizienz“ CRCs von sporadischen CRCs mit MMR Defizienz zu unterscheiden, ohne eine Keimbahnmutationsuntersuchung durchzuführen.

Lynch-Syndrom assoziierte CRCs zeigen häufiger eine muzinöse Differenzierung als sporadische Karzinome. Umgekehrt sind bis zu einem Drittel aller muzinösen CRCs MSI-H Tumoren. (48) (47)

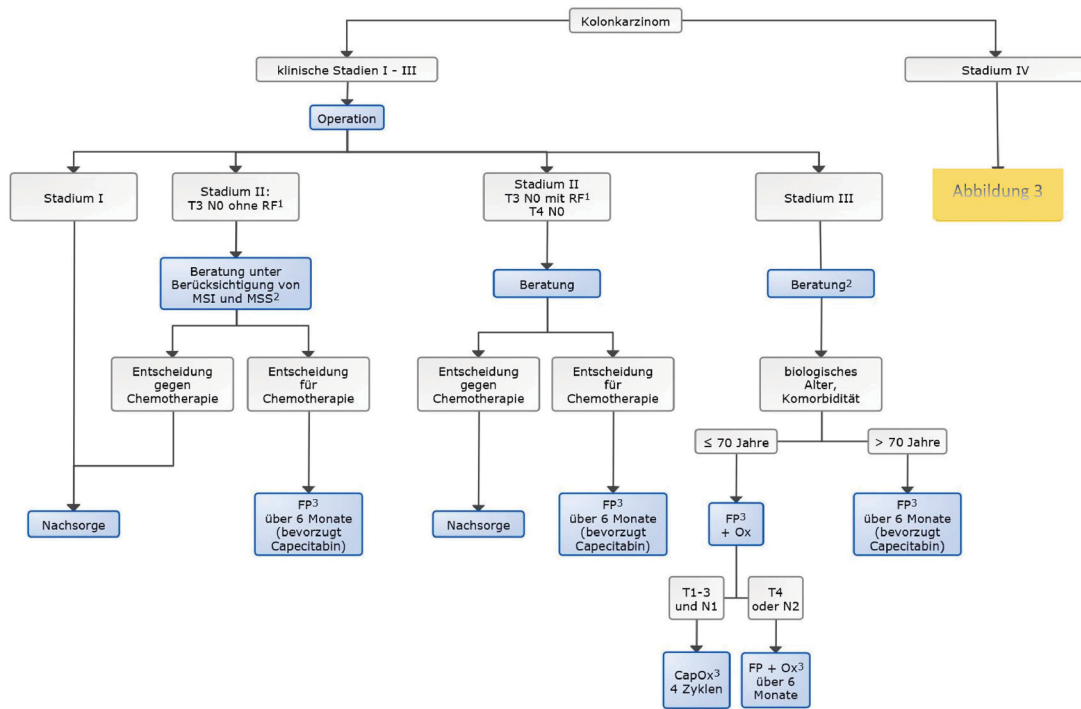
Entsprechend der hereditären Kausalität entstehen Lynch-Syndrom assoziierte Tumoren in früherem Lebensalter als sporadische Karzinome und sind überwiegend im rechten, also proximalen Teil des Kolons lokalisiert.

Nach dem CRC ist das Endometriumkarzinom der zweithäufigste maligne Tumor bei Lynch-Syndrom. Das Lebenszeitrisiko für Anlageträgerinnen für ein Endometriumkarzinom beträgt, abhängig von der

Mutation, bis zu 60% bei einem medianen Erkrankungsalter um etwa 50 Jahre. Ovarialkarzinome treten bei ungefähr 15% aller MMR-Defizienz-Keimbahnmutierten auf, meist als synchrone und nicht metastatische Tumoren. (46)

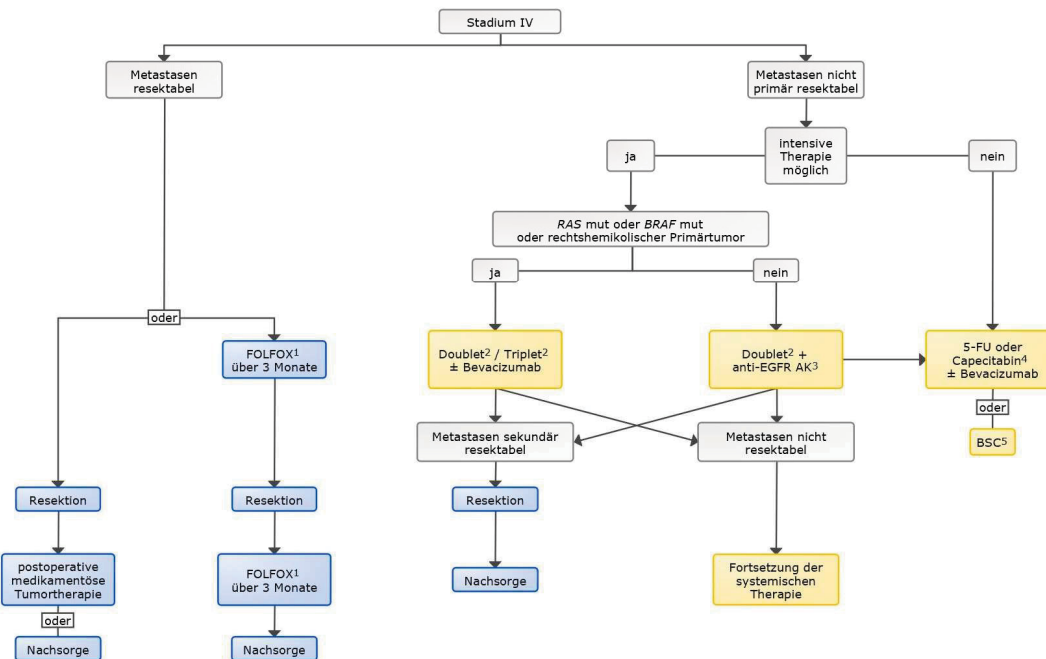
Auf andere hereditäre CRCs wie die MUTYH-assoziierte Polyposis (MAP), die typische familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und die attenuierte FAP (AFAP) soll hier nicht weiter eingegangen werden.

Betreff der aktuell gültigen Therapiekonzepte beim CRC wird auf die konklusiven Abbildungen 2 und 3 verwiesen. (33)



Legende: ¹ RF – Risikofaktoren, siehe Kapitel ² Beratung über möglichen Nutzen, ggf. unter Berücksichtigung des MSI Status: Patienten mit MSS (Mikrosatelliten-Stabilität) haben eine ungünstigere Prognose und profitieren eher von einer adjuvanten Chemotherapie; Patienten mit MSI (Mikrosatelliten-Instabilität) haben eine günstigere Prognose und haben nur einen marginalen Benefit von einer adjuvanten Chemotherapie
³ Cap – Capecitabin, FP – Fluoropyrimidin: infusionales 5-FU/Folinsäure oder Capecitabin; Ox - Oxaliplatin

Abbildung 2: Therapiestruktur beim CRC, aus onkopedia.com (modifiziert), entsprechend Nutzungs- und Urheberrechtsbedingungen



Legende: ¹ Doublet – Kombination von Fluoropyrimidin plus entweder Oxaliplatin oder Irinotecan

² Triplet – Kombination von Fluoropyrimidin plus Oxaliplatin und Irinotecan ³ anti-EGFR AK – Antikörper gegen den EGF Rezeptor

⁴ auch bei Patienten mit RAS WT und BRAF WT besteht die Option einer Monotherapie, wird aber wegen der geringeren Wirksamkeit nicht als Erstlinientherapie empfohlen;

⁵ BSC – Best Supportive Care

Abbildung 3: Therapiestruktur beim CRC im Stadium IV, aus onkopedia.com (modifiziert), entsprechend Nutzungs- und Urheberrechtsbedingungen

Karzinom der Appendix vermiformis

Maligne Tumoren der Appendix vermiformis sind mit 1 % aller gastrointestinalen Tumoren selten. (53) In den meisten Fällen werden sie anlässlich einer Appendektomie wegen einer vermuteten Appendizitis zufällig diagnostiziert, seltener wegen klinischer Symptomatik bei neuroendokrinen differenzierten Tumoren präoperativ suspiert. Muzinöse Adenokarzinome sind neben den neuroendokrinen aktiven Karzinoiden die häufigsten histologischen Typen. (54) In dieser Arbeit soll v.a. auf die epithelialen (muzinösen) Subtypen eingegangen werden.

Die Datenlage zu epithelialen und besonders zu muzinösen Tumoren ist widersprüchlich. (55) (56) Es werden das muzinöse Adenom, das niedriggradige muzinöse Appendixneoplasma (low-grade appendiceal mucinous neoplasm, LAMN) und das muzinöse Adenokarzinom angeführt. (39) (57) Die Zuordnung zu „maligne“ bzw. „benigne“ erfolgt nicht nur nach den üblichen histologischen Kriterien sondern terminologisch auch nach dem klinischen Verhalten. Ein histologisch gutartiges muzinöses Adenom kann nach seiner Ruptur als disseminierter muzinöser peritonealer Tumor auftreten und wird als Pseudomyxoma peritonei (PMP) bezeichnet. Dieses Krankheitsbild unterscheidet sich defacto nicht vom jenem, das von ovariellen muzinösen Tumoren ausgelöst wird.

Der Begriff der Mucozele (appendiceal mucocele) subsummiert benigne oder maligne Tumoren, die eine ausgeweitete, schleimgefüllte Appendix zeigen. Die Schleimhauthyperplasie, Retentionszysten, das muzinöse Adenom, das LAMN und das muzinöse Adenokarzinom können derart in Erscheinung treten. Das Pseudomyxoma peritonei stellt darüber hinaus ein Krankheitsbild dar, das durch disseminierte, intraperitoneale Schleimbildung und muzinöse Implantate im gesamten Peritoneum charakterisiert ist. Auslösend für ein PMP sind die o.a. muzinösen Neoplasien der Appendix, aber auch korrespondierende Tumoren im Kolon und Rektum, des Pankreas, des Magens, der Gallenblase, des Ovars oder der Tube können der Ursprung sein. Durch die kontinuierliche Produktion von gelatinösem Muzin entsteht letztendlich eine fatale Darmobstruktion. Das PMP wird häufiger bei Frauen beobachtet, möglicherweise durch den höheren Anteil ovarieller Tumoren, die ebenso zu diesem Krankheitsbild führen können. (58)

Die Therapieoptionen sind vielfältig und verwirrend und wegen der geringen Prävalenz der Erkrankung nicht durch randomisiert kontrollierte klinische Studien gestützt. Neben aggressiver chirurgischer Zytoreduktion werden systemische und/oder intraperitoneale Chemotherapie (allenfalls auch erwärmt – „hypertherme intraperitoneale Chemotherapie“ HIPEC) sowie Strahlentherapie und intraperitoneale Radioisotopengabe angeführt. (58) (59) Gerade bei muzinösen Tumoren der Appendix ist die Frage nach genetischen Konstellationen interessant, aber kaum beantwortet. Eine tumorbiologische Charakterisierung könnte helfen, die Therapieoptionen zielgerichteter einzusetzen.

Gesamt Genom Allelotyping (Whole-genome allelotyping) hat deutliche Muster von Heterozygotieverlust (loss of heterozygosity LOH) von Tumorsuppressorgenen von muzinösen Ovarialkarzinomen und muzinösen Adenokarzinomen der Appendix gezeigt und die Ähnlichkeit dieser Tumoren bestätigt. Besonders auf den Chromosomenarmen 9p, 6p, 6q, 17p und 21q wurden LOH Raten von über 40 % identifiziert, wobei die LOH Raten bei den muzinösen Ovarialkarzinomen höher beschrieben sind. Die Untersuchungen erfolgten mittels DNA-Arrays bzw. *SNP-array-based loss-of-*

heterozygosity bioinformatischen Berechnungen. Bei MOCs waren die LOH Raten besonders an den Loci D1S413 am Chromosom 1q31.2-31.3 ($P = 0.0018$), D6S1574 am Chromosom 6p21.1 ($P = 0.0321$) und D9S285 am Chromosom 9p22.1 ($P = 0.0054$) im Vergleich zu muzinösen Appendixkarzinomen erhöht. Muzinöse Appendixkarzinome hatten höhere LOH Raten am Locus D6S462 an der chromosomalen Region 6q21 ($P = 0.0183$) und am Locus DXS1226 an der chromosomalen Region Xp11.4 ($P = 0.0366$) als MOCs. Die geringe Fallzahl (28 Ovarialtumoren und nur 5 Appendixtumoren) schränkt die Interpretation der Ergebnisse dieser Studie aber ein. (60) (61)

Auf die genetischen Homologien von muzinösen Ovarialtumoren und muzinösen Tumoren der Appendix vermiformis wird auch durch andere Studien hingewiesen. PMPs, die ihren Ursprung in muzinösen Ovarialtumoren hatten, waren immunhistochemisch CK20 und CDX2 positiv und CK7 negativ – Eigenschaften, die bisher muzinösen Tumoren der Appendix zugeschrieben wurden (s.u.) Durch Sequenzierung des gesamten Exomes von muzinösen Ovarialtumoren und muzinösen Tumoren der Appendix vermiformis (Whole Exom Sequencing) wurde gezeigt, dass in beiden Tumorformen 28 nicht stille Mutationen vorliegen, davon 27 „Missense“ Mutationen und eine „Nonsense“ Mutation. Acht dieser Mutationen sind Driver Gene Mutationen, die in der COSMIC Datenbank gelistet sind und die Gene *GNAS*, *KRAS*, *RASA3*, *ENAM*, *ZBTB38*, *ADAMTS8*, *HTR5A* und *BAI1* betreffen. Mutationen, die den RAS Signalpfad blockieren, wie in *RASA3* und *ADAMTS8* sowie die *GNAS* und die *KRAS* Mutation selbst geben einen starken Hinweis, dass Störungen des RAS Signalpfades die Ursache von muzinösen Tumoren des Ovars und der Appendix sein können und dass beide Tumorarten Mutationseigenschaften teilen. (62)

BRAF Mutationen werden bei muzinösen Tumoren der Appendix (LAMN und muzinöses Adenokarzinom) genauso wie bei MOCs nicht beobachtet. Es wird jedoch postuliert, dass Mutationen in *GNAS*, *KRAS* und auch *TP53* von den meisten muzinösen Tumoren der Appendix geteilt werden, unabhängig davon, ob es sich um ein LAMN oder ein muzinöses Adenokarzinom handelt. Deshalb wird auch konkludiert, dass sich LAMNs in muzinöse Adenokarzinome weiterentwickeln können. Auch daraus lassen sich genetische Beziehungen von muzinösen Tumoren der Appendix und solchen des Ovars ableiten. (63)

Zervixkarzinom

Die überwiegende Mehrheit der Zervixkarzinome sind epitheliale Tumoren, wobei das Plattenepithelkarzinom in der Prävalenz vor den Adenokarzinomen (usual type of endocervical adenocarcinoma) liegt. (7) Die kausale Karzinogenese der epithelialen Zervixkarzinome liegt in der onkogenen Wirkung der E6 und E7 Onkoproteine des HP Virus. Das HP Virus ist ein doppelsträngiges DNA Virus, das nach der Infektion der Zellen der zervikalen Transformationszone in deren Zytoplasma episomal nachgewiesen wird. Das „frühe Gen“ E2 bzw. sein Transkript kontrolliert durch Promotorbindung der anderen frühen Gene E6 und E7 deren (unkontrollierte) Transkription. Für den Fall, dass die virale Infektion die immunologische Abwehr überdauert und persistiert, kann die virale DNA in das menschliche Genom eingebaut werden. Dabei kommt es zur Disruption und Funktionsverlustmutation des E2 Genes. Wenn die viralen E6 und E7 Gene daraufhin die zuvor E2 mediierte Repression verlieren, werden die entsprechenden „Onkoproteine“ übermäßig transkribiert bzw. translatiert. Das E6 Protein bindet und degradiert das Tumorsuppressorprotein p53, das E7 Protein degradiert die „Pocket Domäne“ des Retinoblastoma Tumorsuppressorproteins. Dadurch entsteht unkontrollierte Zellproliferation im Sinne einer malignen Tumorentwicklung. (64) (65) Neuroendokrine Tumoren der Zervix uteri sind selten, können aber auch HPV assoziiert sein.

Muzinöses Adenokarzinom vom gastrischen/intestinalen Typ und muzinöses Adenokarzinom vom zervikalen Typ

Muzinös differenzierte Adenokarzinome der Zervix uteri sind ebenfalls selten, weisen aber üblicherweise keinen HPV Bezug auf. (7) (66) (67) (68) Die muzinösen Adenokarzinome der Zervix uteri beinhalten zwei Subtypen, nämlich einerseits das muzinöse Adenokarzinom vom intestinalen Typ (= intestinal or gastric type endocervical adenocarcinoma) und andererseits das muzinöse Adenokarzinome vom zervikalen Typ (= endocervical-type mucinous adenocarcinoma). Das letztere wird seit der 2014 WHO Klassifikation der Tumoren weiblicher reproduktiver Organe als seromuzinöses Karzinom bezeichnet (7), das in gleicher Form auch in den Ovarien seinen Ursprung nehmen kann. Das seromuzinöse Karzinom kann sich aus einer atypisch dedifferenzierten Endometriose entwickeln. Es weist üblicherweise eine *ARID1A*-Mutation und eine *KRAS*-Mutation auf. Beim intestinalen Typ des muzinösen Adenokarzinoms der Zervix uteri wird zwar auch sehr häufig eine *KRAS*-Mutation aber fast nie eine *ARID1A*-Mutation beobachtet. (6)

Leider gibt es auch zum seromuzinösen Karzinom widersprüchliche Literaturdaten. Eine rezente Studie untersuchte 32 sogenannte seromuzinöse Karzinome histologisch, immunhistochemisch und mittels

NGS-basiertem Tumorpanel von 50 Genen (Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 - ThermoFisher Scientific) und fand dabei folgende Mutationsfrequenzen: *KRAS* 70%, *PIK3CA* 37%, *PTEN* 19%, *ARID1A* 16%, *CTNNB1* 0%. Es wurde deshalb geschlossen, dass keine Rechtfertigung für eine eigene Kategorie seromuzinöser Karzinome bestünde, weil sich dieses genotypische Muster auch bei endometroiden und muzinösen Karzinomen findet. (69) Dieser Umstand rückt auch die muzinösen Adenokarzinome der Zervix uteri genetisch nahe an andere muzinöse Karzinome im Becken und stellt außerdem eine Zäsur in der sonst dominanten HPV-Assoziation von Zervixkarzinomen dar.

Die Therapiekonzepte beim Zervixkarzinom orientieren sich an der anatomischen Lokalisation und am Tumorstadium, berücksichtigen aber keine tumorbiologischen Besonderheiten. Bei selbem (klinischen) FIGO Stadium wird ein epithelialer, HPV assoziierter Tumor denselben Behandlungsrichtlinien unterzogen wie z.B. ein HPV-negatives muzinöses Adenokarzinom vom gastrischen Typ. Dieser Umstand mag infolge der biologisch klar unterschiedlichen Tumoren überraschen, folgt aber einem dzt. gültigen Leitlinienkonzept der meisten Fachgesellschaften der Industrieländer. (70)

Histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Assoziationen muzinöser Karzinome im Becken

Lichtmikroskopie

Muzinöse Karzinome sind eine besondere Form von epithelialen Adenokarzinomen. Für die Charakterisierung als muzinöses Karzinom wird ein intraepithelialer Muzingehalt von $\geq 50\%$ des Zytoplasmas in mehr als 90% der Tumorzellen gefordert. Für CRCs wird die Bezeichnung eines muzinösen Karzinoms auch gewählt, wenn $\geq 50\%$ des Tumors extrazelluläres Muzin enthält. In diesen "Muzinpools" finden sich maligne Epithelzellen als azinös-drüsige Formationen, einfachen Zelllagen oder individuellen Tumorzellen mit oder ohne Siegelringzellen. (71) Alle im Folgenden gelisteten Erscheinungsformen von muzinösen Karzinomen kommen in allen hier untersuchten Organen (Ovar, Tube, Peritoneum, Kolon, Rectum, Appendix vermiformis) mit unterschiedlicher Häufigkeit vor. Das histologische Bild ist vom Gewebstyp entweder gastral oder intestinal. Der Nachweis von Becherzellen ist für die Zuordnung zum gastralen bzw. intestinalen Gewebstyp nicht erforderlich. Auch der endozervikale Typ des muzinösen Karzinoms wird als eine mögliche Variante in allen o. a. Organen beschrieben s.o. (21) (19) (22) (3) (7) Das Epithel der muzinösen Karzinome zeigt sich zum einen in einem expansilen Muster mit kribriform, Rücken an Rücken liegenden Drüsen mit sehr geringem Stromaanteil und kaum nachweisbarer Stromainvasion (expansile type), zum anderen in einem infiltrativen Muster mit Drüseninvasion und desmoplastischer Stromareaktion (infiltrative type). (20) Epithelanteile von muzinösen Zystadenomen und muzinösen Borderlinetumoren sind häufig neben invasiven muzinösen Karzinomen lokalisiert, sodass ein Kontinuum von der prämaligen in die maligne Form möglich scheint.

Nichtsdestotrotz ist die Zuordnung eines Adenokarzinoms als muzinöses Karzinom willkürlich und hängt häufig von der individuellen pathologischen Einschätzung ab. Muzinöse Karzinome werden üblicherweise als geringdifferenziert (G3) graduiert, wobei auch das Grading ohne präzise Kriterien subjektiv bleibt und von vielen pathologischen Institutionen abgelehnt wird. Es bleibt nicht genau geklärt, wie histopathologische Charakteristika wie Wachstumsmuster, Aspekt der Tumorränder, Lokalisation des Muzins, Verhältnis des Volumenanteiles von Tumorzelle und intrazellulärem Muzin das klinische Ergebnis betroffener Patienten beeinflussen. Darüber hinaus ist auch der bisher als prognostisch ungünstig erachtete Einfluss von vorhandenen Siegelringzellen in Diskussion geraten. (72) Gesichert scheint, dass der infiltrative Typ klinisch aggressiveres Verhalten als der expansile Typ aufweist. (20)

Muzinöse Metastasen von primären CRCs, Appendix-, Magen-, Pankreas- und endocervicalen Karzinomen können primäre ovarielle muzinöse Zystadenome, muzinöse Borderline Tumore oder muzinöse Ovarialkarzinome imitieren. Infolge der substantiellen histologischen Überlappungen und Ähnlichkeiten ist die allein mikroskopische Zuordnung zu einem Ursprungsorgan des muzinösen Karzinoms eine pathologische Herausforderung oder Unmöglichkeit.

Immunhistochemie

Mithilfe der Immunhistochemie kann der Ursprung eines Tumors durch chemischen Nachweis und Färbung eines organ-typischen Expressionsproduktes (meist Protein) bestimmt werden. Dieses Verfahren wird auch bei muzinösen Karzinomen im Becken eingesetzt. Die meisten in der Routine eingesetzten Marker haben allerdings differentialdiagnostische Grenzen.

Cytokeratin 7 (CK7) ist in den meisten muzinösen ovariellen Borderlinetumoren und MOCs exprimiert. CK7 findet sich jedoch auch in etwa einem Drittel aller niedriggradig muzinösen Appendixneoplasmen (low-grade appendiceal mucinous neoplasm, LAMN) und muzinösen Appendixkarzinomen. (73)

Cytokeratin 20 (CK20) ist in muzinösen Tumoren der Appendix vermiformis häufig positiv, aber seine Expression wird auch in einer beträchtlichen Fraktion von muzinösen Ovarialtumoren gefunden. Das menschliche Homeobox Protein CDX-2 wird durch das korrespondierende *CDX-2* Gen kodiert und ist in Signaltransduktionsprozesse in der Embryonalentwicklung der Extremitäten eingebunden. Das Gen gehört zur Familie der caudalen Homeobox Transkriptionsfaktoren und wird auch in epithelialen, intestinalen Zellen exprimiert. (74) Seine Expression ist aber auch in etwa zwei Dritteln aller muzinösen Ovarialtumoren dokumentiert. (75) (76)

Das Panel von CK7, CK20 und CDX2 sei also bei primären muzinösen Ovarialkarzinomen überwiegend CK7⁺CK20⁻CDX2⁻ während es bei kolorektalen und appendicealen Karzinomen CK7⁻CK20⁺CDX2⁺ erscheinen sollte. Durch die signifikante Überlappung ist darauf zur Unterscheidung der Tumorentitäten kein Verlass.

SATB2 (special AT-rich sequence-binding protein 2) ist ein eher rezent identifiziertes Protein, dessen Expression auf Drüsenepithelien im aboralen Teil des Gastrointestinaltraktes beschränkt sei. Damit wurde Hoffnung auf ein präzises Instrument zur Diskriminierung von muzinösen Tumoren geweckt, da kolorektale Adenokarzinome mit einer >90% Sensitivität durch SATB2 Positivität identifiziert werden könnten. (77) (78) (79) Aktuelle Daten zeigen jedoch auch, dass SATB2 in muzinösen Ovarialtumoren und osteoblastischen Tumoren positiv sein kann. (80)

Auch andere, schon lange bekannte Proteine wie die der Muzin-Protein Familie (Muc1, Muc2) können keine sichere Unterscheidung zwischen den Entstehungsorten der muzinösen Tumoren garantieren.

Tumorgenetik

Infolge der eindrucksvollen Überlappung der o. a. immunhistochemischen Marker und dem den Ursprung des Tumors nicht beweisenden histologischen Bild wäre ein einzigartiger, molekularer Marker von großem Wert.

Dem Wissenstand des Verfassers entsprechend gibt es aber keine Studien mit direktem Vergleich von Genmutationen und Expressionsprofilen zwischen MOCs und CRCs bzw. anderen muzinösen Karzinome in Becken, wie überhaupt nur moderates Interesse in der Beachtung von Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen bei MOCs besteht. Durch den Vergleich von Daten nicht zusammenhängender Studien über genetische Profile von entweder MOCs oder CRCs ergeben sich folgende, beachtenswerte Ähnlichkeiten:

KRAS und *BRAF* Mutationen

Etwa 40 bis 50 Prozent der MOCs weisen aktivierende *KRAS* Mutationen auf (n=22) wohingegen *BRAF* Mutationen in Untersuchungsserien nicht oder nur selten (ca. 8%) gefunden wurden. (23) (81) *KRAS* Mutationen finden sich etwa in der gleichen Häufigkeit bei CRCs. (81) (82) Die klinischen Auswirkungen hängen vom Zeitpunkt der Mutation ab. Die allosterische Aktivierung des *KRAS* Proteins führt zu einer Aktivierung bzw. höheren Expression von Wachstumsfaktoren und viele Signaltransduktionen aktivierende Rezeptoren wie z.B. PI3 Kinase. Wenn das *KRAS* Gen isoliert mutiert ist, führt die Proliferationssteigerung üblicherweise nur zu selbstlimitierenden hyperplastischen oder Borderline-Veränderungen ohne starkes malignes Potential; nach vorausgegangener *APC* (Gate-keeping) Mutation führt die *KRAS* Mutation aber als Driver zur malignen Transformation. *KRAS* Mutationen bei CRCs sind häufiger bei Tumoren im Caecum, Colon ascendens (proximales Colon) als im aboralen Dickdarmabschnitt. Das Vorliegen von *KRAS* Mutationen bedeutet auch, dass Tumoren schlecht auf EGF-Rezeptor inhibierende Therapie ansprechen, weil in diesem Fall das *KRAS* Protein unabhängig von einer möglichen Blockade des EGF-Rezeptors aktiviert wird. (83) EGF Rezeptor inhibierende Therapeutika wie Panitumumab oder Cetuximab werden deshalb nur bei Tumoren mit *KRAS* Wildtyp eingesetzt.

CRCs mit *KRAS* Mutationen haben eine mehr als dreifach erhöhte Hazard Ratio für ovarielle Metastasen als CRCs ohne *KRAS* Mutationen. (84) (85) Es darf in diesem Zusammenhang suspiert

werden, dass es sich bei diesen Untersuchungen infolge der genetischen (und histologischen) Übereinstimmungen um dieselbe Tumorentität mit nicht sicher bestimmbarem Organbezug gehandelt haben könnte.

Auch bei *BRAF* Mutationen bestehen bestechende Übereinstimmungen zwischen MOCs und CRCs. *BRAF* Mutationen werden in unterschiedlichen Untersuchungsserien bei MOCs nicht oder nur selten (ca. 8%) gefunden. (23) (81) In CRCs zeigen 2- 8-15% der Fälle *BRAF* Mutationen, wobei über die Frequenz bei muzinösen Subtypen Unsicherheit herrscht. (86) (87) So ist z.B. in der cBioPortal for Cancer Genomics Datenbank bei einer Abfrage von TCGA Daten muzinöser CRCs eine *BRAF* Mutationshäufigkeit von 40% angegeben. Dieser Frequenzangabe liegen aber nur 23 bzw. 10 Patientendaten zugrunde. (88) (89) Es bleibt anzumerken, dass in der Frequenz der *BRAF* Mutationen ein Unterschied zwischen muzinösen CRCs und anderen muzinösen Beckenkarzinomen bestehen könnte, wenngleich das Vorkommen der *BRAF V600* Mutation auch hinweisgebend für eine muzinöse Histologie mit schlechter Prognose unabhängig vom Tumorursprung sein kann. Klinisch aggressive *BRAF* Mutationen von CRCs im Codon 600 (entweder *BRAF c.1799T>A [V600E]* oder *BRAF c.1798G>A [V600M]* oder *BRAF c.1799T>G [V600G]*) sind häufiger im rechtsseitigen Colon und eher bei muzinöser Histologie mit peritonealer Metastasierung und Lymphknotenmetastasierung zu finden. Im Gegensatz dazu sind die noch selteneren *BRAF* Mutationen der Codons 594 und 596 (1 % aller CRCs) häufiger mit linksseitigen, rektalen und nicht-muzinösen Tumoren ohne peritoneale Metastasierung assoziiert. Im Vergleich zur *BRAF V600* Mutation sind die letzteren klinisch prognostisch günstiger mit erheblich längeren Überlebenszeiten (Median 62,0 vs 12,6 Monate; HR 0,36, p=0,002). (90) (46) Darüber hinaus sind *BRAF V600* Mutation häufiger Mikrosatelliten-instabil, während *BRAF 594* – und *596* Mutationen Mikrosatelliten-stabil sind. Klinisch aggressive *BRAF V600*-Mutationen finden sich sonst noch selten (ca. 1,5 %) bei muzinösen Adenokarzinomen der Appendix. Über *BRAF V600* Mutationen bei MOCs finden sich keine Angaben.

In muzinösen Appendixkarzinomen wurde die *BRAF V600 E* Mutation nur in einem (1,4%) niedrig differenziertem (high grade) Tumor von 74 untersuchten gefunden. (91)

SMAD4 und *NTRK1* Mutationen

CRCs mit ovariellen Metastasen zeigen eine gehäufte Frequenz von Mutationen in *SMAD4* (*SMAD* family member 4) Gen und *NTRK1* (neurotrophic receptor tyrosine kinase 1) Gen als auch in *KRAS* Genen. Im Vergleich von 38 ovarialmetastasierten CRCs mit 426 CRCs ohne Ovarialmetastasen waren die Mutationshäufigkeiten o. a. Gene wie folgt: *RAS* (65.8% vs 46.5%; $P = .0224$), *SMAD4* (39.5% vs 18.5%; $P = .0021$), and *NTRK1* (10.5% vs 3.8%; $P = .049$). (84)

Die solcherart mutierten Tumoren zeigen auch ein klinisch aggressiveres Verhalten. Leider findet sich in dieser Publikation keine Angabe über die histologischen Entitäten der CRCs, sodass ein direkter Rückschluss auf diese Mutationen in nur muzinösen CRCs nicht möglich ist.

PIK3CA

PI3 Kinase Mutationen finden sich bei Ovarialkarzinomen v. a. bei klarzelliger Histologie und selten bei muzinösen Tumoren. (92) Von 262 epithelialen Ovarialkarzinomen der EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) 55971 Studie waren 47% aller klarzelligen Karzinome *PI3 Kinase* mutiert; im Vergleich dazu wiesen 50% aller MOCs *KRAS* Mutationen auf (s.o.) In dieser Studie waren aber nur acht der 262 Ovarialkarzinome muzinös. Bei CRCs mit muzinöser Histologie haben in einer Cbioportal-Abfrage von 26 auf Mutationen untersuchten muzinösen CRCs 26% eine *PI3 Kinase* Mutation, die in dieser Gruppe damit zu den selteneren Mutationen zählt. (93) In TCGA finden sich keine Daten zu muzinösen Ovarialkarzinomen.

Mikrosatelliten Instabilität MSI

MSI-H wird in etwa 15% aller CRCs (unabhängig vom histologischen Subtyp) gefunden und zeigt sich bei rechtsliegenden CRCs (Colon ascendens bis zur linken Colonflexur) sogar mit einer Häufigkeit von mindestens 20%. Wie o.a. ist es meist auf eine somatische Hypermethylierung der *hMLH1* Gen Promotorregion zurückzuführen, wohingegen Keimbahnmutationen wie beim klassischen Lynch-Syndrom mit maximal 3 % selten sind. (94)

In einer Cbioportal Abfrage nach Mutationen der MMR Gene *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS1*, *hPMS2* finden sich unter den 66 muzinösen CRCs niedrige Mutationsfrequenzen zwischen 4 bis 9 %. (93). In einer unizentrischen, retrospektiven Untersuchung des M.D. Anderson Cancer Centers von 108 Fällen

von Appendixkarzinomen mit muzinöser Histologie zeigen sich noch niedrigere MSI-H Vorkommen 3%. (94) Muzinöse Ovarialkarzinome haben ähnliche niedrige, wenngleich etwas höhere Mutationsfrequenzen der MMR-Defizienz Gene. In einer Studie mit 127 untersuchten Ovarialkarzinomen mit MSI-H Status zeigten 18% der MOCs (n=17) eine hochgradige Mikrosatelliteninstabilität. (95)

Genexpressions- und Transkriptionsprofile

Aus 3 MOCs und 4 muzinösen Borderlinetumoren wurden mittels Oligonukleotid Microarrays (Affymetrix GeneChip oligonucleotide microarray) Muzin-codierende Gene identifiziert, die in ihrem Profil denen von muzinösen CRCs gleichen, nämlich *MUC3A* und *MUC17* aber nicht *MUC16*. Das Fehlen von *MUC2* und *MUC5A* ist eine besondere Ähnlichkeit zu intestinalen Tumoren. Auch ein mRNA Transkriptionsprofil für *LGALS4* (Galactin 4) weist auf eine besondere Verwandtschaft zu intestinale Gewebe hin. Diese Tumoren könnten dieser kleinen Studie folgend eher mit Dickdarmepithel oder CRCs assoziiert werden als mit ovariellen Oberflächenepithel und lässt vermuten, dass die Pathogenese für MOCs und muzinöse CRCs ähnlich ist. (96) In derselben Studie wurden 40 Gene mit höherer Expression bei MOCs im Vergleich zu normalem Ovarialgewebe identifiziert. Diese hochregulierten Gene wurden nach ihrer chromosomalen Lokalisation aufgereiht („clustered“), sodass die folgenden genomischen Regionen (und die korrespondierenden Gene) charakterisiert werden konnten, die bei MOCs überrepräsentiert zu sein scheinen: 3p21.3 (*VILL*, *MST1R*, *GLYCTK*, *FLJ20209*, *SLC26A6*), 7q22 (*MUC3B*, *MUC17*, *CLDN15*, *ACHE*, *LOC55971*), 11p15 (*USH1C*, *MUC2*, *MUCDHL*, *SLC22A18*), 11q13 (*STATD10*, *PLCB3*, *MOGAT2*), 11q24 (*LOC120224*, *CTXL*, *KIAA1201*, *RICS*), 15q14-15 (*CKMT1*, *PPP1R14D*, *ITPKA*, *NMES1*), 19p13.3 (*FUT3*, *LOC284422*, *FLEKHJ1*, *C19orf21*, *GNA11*), 19q13.1-13.4 (*CYP2S1*, *CEACAM6*, *FXYD3*, *LGALS4*, *CEACAM5*, *FLJ20200*, *PTPRH*), und 20q13 (*BCAS1*, *HNF4A*, *PTK6*).

Die Regionen 11q24, 19q13.2 und 20q13 werden auch mit einer höheren Frequenz von Heterozygotie (LOH) in MOCs assoziiert, 3p21.3 (*MST1R*) und 20q13 (*PTK6*) enthalten vermeintliche Onkogene.

Die Genprodukte der z.T. in MOCs, z.T. in anderen muzinösen Adenokarzinomen hochregulierten Gene *FUT3*, *GCNT3*, *SI*, *FBP1*, *UGT1A9* und *TFF1* sind in den Kohlehydratstoffwechsel und in die Proteinglykosylierung der Muzinbildung eingebunden. (28) (97) In diesen Untersuchungen wurden auch weitere hochregulierte Gene bei MOCs gefunden, die bei der Entwicklung intestinal differenzierten Epithels und seiner Zelladhäsion eine Rolle spielen wie *CDX1* und *CDX2* (caudal type

homeobox transcription 1 und 2) *SI* (sucrase isomaltase), *LGALS4* (ein Mitglied aus der Galektin Familie der Kohlehydrat bindenden Moleküle), *CDH17*, *TM4SF4/IL-TMP*, *TM4SF5/L6H* und *TM4SF3/CO-029*, *CEACAM6* und *CEACAM5*.

Genomweite Assoziationsstudien

Dem Autor dieser Masterthesis ist eine genomweite Assoziationsstudie des „Ovarian Cancer Association Consortium“ für ausschließlich muzinöse Ovarialkarzinome bekannt. (24) Genetische Assoziationsstudien dienen der Feststellung, ob eine bestimmte genetische Variante mehr als zufällig mit einer Erkrankung, einem Tumor oder einem bestimmten Phänotyp assoziiert ist. Dabei wird unter der „genetischen Variante“ ein bestimmter Genotyp eines Polymorphismus (bestimmtes Allel, ein „rekombinationsresistenter“ Haplotyp) oder ein oder mehrere SNPs verstanden.

In dieser großen Studie wurden multizentrisch über 1000 Fälle mit MOC eingeschlossen. Die zugrunde liegenden, nicht kompletten Sequenzierdaten stammen aus britischen und US-amerikanischen, nicht öffentlich zugänglichen Quellen und basieren auf unterschiedlichen technischen Plattformen, überwiegend auf Genotypisierungs-Arrays und nicht auf NGS-Sequenzierdaten. Fehlende Daten wurden durch Imputationstechniken mit Hilfe entsprechender Software (SHAPEIT® und IMPUTE2®) interpoliert.

Für MOCs wurden Risikoassoziationen für folgende SNPs identifiziert: rs752590 auf 2q13, rs688187 auf 19q13.2 und rs711830 auf 2q31.1.

In eQTL (expression Quantitative Trait Locus) Assoziationsuntersuchungen werden Abschnitte eines Chromosoms lokalisiert, für den ein Einfluss auf die Ausprägung eines phänotypischen Merkmals nachgewiesen wird. Für MOCs wurden eQTL Loci für *HOXD9* auf 2q31.1 bestimmt, für CRCs ebendort und *PAX8* auf 2q13. Es ist nicht angegeben und auch nicht anzunehmen, dass diese CRCs von ausschließlich muzinöser Histologie waren, sodass nicht beantwortet wird, ob damit eine genetische Assoziation zwischen muzinösen CRCs und MOCs besteht. Mit „chromosome conformation capture analysis“, einer Methodik zur Klärung des räumlichen Bezuges des Chromatins im Zellkern zueinander und seiner möglichen funktionellen Auswirkung, wurden Interaktionen des *HOXD9* Promotors und SNPs auf 2q31.1 nachgewiesen. Leider ist in dieser Studie kein direkter Vergleich von MOCs mit muzinösen CRCs oder anderen muzinösen Karzinomen im Becken angestellt. Die Sequenzierdaten der MOCs dieser Studie sind nicht öffentlich abrufbar und es ist dem Verfasser dieser Masterthesis nicht ableitbar, wieviele MOCs wirklich untersucht wurden. In der Diskussion dieser „Ovarian Cancer Association Consortium Study“ wird darauf hingewiesen, dass „die Ergebnisse wegen der nur kleinen Zahl an untersuchten MOCs“ eingeschränkt interpretierbar wären – eine genaue Zahl der untersuchten

MOCs findet sich wie gesagt nicht. Darüber hinaus bestand keine zentrale, standardisierte histologische Begutachtung, sodass zweifelsfreie Rückschlüsse, insbesondere auf präzise genetische Assoziationen zu anderen muzinösen Karzinomen, nicht möglich sind. Es ist auch zu erwähnen, dass in TCGA keine Daten von MOCs abrufbar sind - ein Umstand, der auch in der Diskussion des Consortium Papers bedauert wird.

Pilotstudie

Da die Frage der genetischen Assoziation der muzinösen Beckenkarzinome in der Literatur nicht ausreichend beantwortet werden kann, wurde ein Konzept für eine Pilotstudie entwickelt. Die Hintergründe sollen an dieser Stelle noch einmal zusammengefasst werden.

Muzinöse Karzinome im Becken werden in den Ovarien, der Zervix uteri, dem Kolon und Rektum und der Appendix vermiformis beobachtet. Die pathologisch-lichtmikroskopische und immunhistochemische Beurteilung erlaubt keine sichere Zuordnung zu einem der oben beschriebenen Organe. Trotz der morphologischen Ähnlichkeit unterscheiden sich die empirisch gewählten Therapieoptionen und die Tumorprognosen der muzinösen Karzinome. Die Behandlung wird in Abhängigkeit vom betroffenen Organ und nicht von Tumorcharakteristika bestimmt. Mit dieser Pilotstudie sollte untersucht werden, ob - neben Ähnlichkeiten in Morphologie und Immunhistochemie - auch Assoziationen in tumorgenetischen Befunden bestehen.

Methodik

Die Studie wurde der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz vorgestellt und unter dem Eintrag 29-496 ex 16/17 genehmigt.

Es erfolgte eine textsensitive Abfrage über das Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation der Medizinischen Universität Graz (MUG) aus der Datenbank des Institutes für Pathologie der MUG unter der Bearbeitungsnummer IMIJOBID7986. Der Abfragezeitraum erstreckt sich vom 01.01.2002 bis 31.10.2017. Gesucht wurde nach allen in diesem Zeitraum diagnostizierten muzinösen Karzinomen von Ovar, Kolon, Rektum, Appendix vermiformis und Zervix uteri. Die gefundenen Präparate sollten einer pathologischen Zweitbegutachtung unterzogen werden, um Zweifel an der

Diagnose eines „muzinösen Beckenkarzinoms“ auszuschließen. Das Transkriptom des Tumormaterials, entweder in Paraffin- oder in kryokonservierter Nativpräparation aus der Biobank der MUG, sollte mittels Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung (Whole Transcriptome Sequencing; RNA-seq) und Microarray Technik untersucht werden. Aus budgetären Gründen mussten für die Pilotstudie Einschränkungen akzeptiert werden, sodass nur das Transkriptom eines einzigen muzinösen Ovarialkarzinoms bestimmt werden konnte.

Das Transkriptom ist ein Abbild der Gene, die in einer Zellpopulation (zu einem bestimmten Zeitpunkt) aktiv exprimiert bzw. transkribiert werden. Das Genom, also die DNA-Sequenz aller gesunden Zellen im Körper, ist ident. Die in unterschiedlichen Organen oder Zellen spezifische Genexpression ist der fundamentale Mechanismus zur Ausprägung eines wiederum spezifischen Phänotyps. Je nach Aktivierung (=Expression) oder Deaktivierung von Genen kommt es zu gesteigerter Transkription von mRNA und weiterer Translation von tRNA in Proteine. Die Analyse des gesamten Transkriptoms beschreibt somit den Aktivitätszustand einer Zellpopulation besser als die entsprechende Analyse des gesamten Genoms.

Unter RNA-Seq wird die Ermittlung der Nukleotidabfolge der RNA mit Hochdurchsatzmethoden (Next-Generation Sequencing) verstanden. Hierfür wird die messenger RNA (mRNA) mittels reverse transcriptase-PCR in cDNA umgeschrieben, um auf die Technik der DNA-Sequenzierung zurückgreifen zu können. RNA-Seq gibt anders als eine Sequenzierung der DNA Informationen über die Genexpression, wie zum Beispiel mehrere Allele eines Gens exprimiert werden, ob Gene „ein- oder ausgeschaltet“ sind und ermöglicht das Erkennen von posttranskriptionalen Modifikationen wie alternatives Spleißen oder die Identifizierung von Fusions-Genen.

Die RNA einer Zelle besteht zu 90 % aus ribosomaler RNA und nur etwa zu 10% aus messenger RNA. Um die mRNA von der rRNA zu trennen, gibt es standardisierte Methoden, die als „Ribosomal Depletion Kits“ eingesetzt werden.(98) (99) Die Qualität der gewonnenen RNA wird mittels RNA Integrity Number (RIN) auf einer Skala von 1 bis 10 gemessen. Für die Sequenzierung muss entweder die mRNA oder die cDNA fragmentiert werden. Für die auf der „Ion Torrent Technik“ basierende RNA-Seq erfolgte ein „barcodierte Library Preparation“ mittels SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis kit aus 10 ng totaler RNA. Die cDNA wurde mit Ion AmpliSeq™ Technologie vermehrt um entsprechend hohe Expressionslevels der möglicherweise interessanten Gene zu erzielen. Die Qualität und Quantität der cDNA Libraries wurde mittels Agilent Bioanalyzer High sensitivity chip™ geprüft. Die Libraries wurden auf 100pM verdünnt und auf 8 gepoolte Proben geteilt. Diese gepoolten Libraries wurden mittels Ion Torrent OneTouch2 Instruments (OT2) amplifiziert und nach Herstellerangaben angereichert. Die Sequenzierung erfolgte am Ion Torrent Proton™ Sequencing System unter Verwendung des Ion PI™ Sequencing 200 Kit und des Ion PI™ Chip v2.

Sequenzierung

In den letzten 10 Jahren wurden Verfahren der Hochdurchsatz-Sequenzierung entwickelt, die als Next-Generation Sequencing (NGS) bezeichnet werden. Dabei werden Millionen DNA-Fragmente in einem einzigen Sequenzierlauf parallel sequenziert, sodass diese Verfahren auch unter dem Begriff „high-throughput genomic sequencing“ subsummiert werden. So ist es nun möglich, praktisch alle monogenen Krankheitsbilder, insbesondere auch solche mit ausgeprägter genetischer Heterogenität, zu analysieren.

Die in dieser Studie intendierte „Ion Torrent Sequenzierung“ wurde im Jahr 2010 auf Halbleitertechnologie basierend von Ion Torrent Inc. eingeführt. Die Methode ähnelt einer „Sequenzierung durch Synthese“ nur insofern, als dass eine DNA Vorlage durch sequentiellen Nukleotideinbau vervollständigt wird. (100) Zum besseren Verständnis soll zuerst die Methode der Sequenzierung durch Synthese dargestellt werden.

Sequenzierung mittels Synthese

Die von Illumina™ bzw. Solexa™ im Jahr 2006 veröffentlichte Technologie soll kurz vorgestellt werden. Dabei wird als Grundprinzip auf die Sequenzierung mittels Synthese gesetzt. Der Einbau von farbmarkierten Nukleotiden während der Kopie einer DNA-Kette wird Nukleotid für Nukleotid registriert - mit einer hohen Anzahl parallel verlaufender Schritte.

Die Sequenzierung mit Synthese findet auf einem Glasobjektträger (FlowCell) statt, auf dessen Oberfläche in festgelegtem Muster definierte Oligonukleotide kovalent gebunden sind. Im Detail wird bei dieser Methode die zu untersuchende „Template“-DNA zuerst fragmentiert. Die Fragmente werden an beiden Enden mit sogenannten Adaptoren (kurze DNA Stücke) gebunden; Die Fragmente mit den Adaptoren werden an beiden Enden noch um die Bindungsstelle der „sequenzierenden“ Primer, um eine „probenidentifizierende Indexsequenz“ und um eine DNA-Sequenz verlängert, die komplementär zu den auf der Messzelle gebunden Oligonukleotiden ist. Von dem gebundenen Startmolekül ausgehend werden durch einen PCR-ähnlichen Schritt Cluster aus identischen Molekülen gebildet (Bridge-Amplification). Die Sequenzierung erfolgt zyklusweise und nutzt reversible

Terminatorchemie und fluoreszenzmarkierte Nukleotide. In jedem Sequenzierzyklus wird genau ein Nukleotid komplementär zu der Template-DNA eingebaut. Anschließend wird die Fluoreszenzgruppe abgespalten, das folgende Lichtsignal detektiert und die Terminatorgruppe entfernt, so dass ein weiteres Nukleotid im folgenden Zyklus eingebaut werden kann. Eine besondere Eigenschaft der Illumina SBS-Methode ist die sogenannte „paired-end“-Sequenzierung. Dabei werden die zu sequenzierenden DNA-Fragmente von beiden Enden mit einer vorher festgelegten Leseweite von 100-250 bp sequenziert. Je nach Größe der DNA-Fragmente können diese „Reads“ überlappen oder aber über einen nicht-sequenzierten DNA-Teil (Insert) getrennt sein. Die „Paired-end“-Sequenzierung erlaubt viele Vorteile bei der bioinformatischen Auswertung und kann die Präzision der Analysen signifikant erhöhen. (100)

Die erzielte Sequenziertiefe ermöglicht zudem die Auffindung struktureller Aberrationen wie Deletionen und Duplikationen, sogenannter CNVs (copy number variations), die in der konventionellen Sequenzierung nicht nachgewiesen werden können – ein Vorteil vor allem bei solchen Genen, für die keine MLPA-Kits zur Verfügung stehen. Mittels NGS nachgewiesene pathogene Veränderungen können mit konventioneller Sanger-Sequenzierung bzw. MLPA, Array-CGH oder qPCR (bei CNVs) bestätigt werden. (101)

Ion Torrent Sequenzierung

Diese Technik wird auch pH-vermittelte Sequenzierung oder „Post-Light“-Sequenzierung genannt. Die Methode folgt dem Sequenzierung-mittels-Synthese-Konzept insofern, dass eine DNA-Vorlage durch sequentiellen Nukleotideinbau komplementiert wird. Die Arbeitsweise zur Detektion der eingebauten Nukleotide unterscheidet sich allerdings grundlegend von der vorher beschriebenen Technik durch den Verzicht auf ein optisches Signal. Der Einbau eines Nukleotids hat das Formen einer kovalenten Bindung unter Freisetzung eines Pyrophosphats und eines positiv geladenen Wasserstoffions zur Folge. Der Einbau eines Nukleotids durch die DNA-Polymerase wird bei der Ion Torrent Sequenzierung durch eine Veränderung des pH-Wertes (durch das abgesonderte Wasserstoffion) detektiert. Die zu sequenzierende DNA wird in Mikroreaktionskammern (Sphären – kleine Kügelchen, in denen die DNA emulgiert ist) auf einen Halbleiterchip gebracht. Diese Reaktionskammern beinhalten die DNA Polymerase, die verschiedenen Nukleotide werden sequentiell zugesetzt. Komplementäre Nukleotide

werden mittels Polymerase eingebaut und die freigesetzten Wasserstoffionen werden von einer ionensensitiven Ebene unter den Reaktionskammern gemessen. (100)

Read Aligment und Bioinformatik

Die rohen Reads nach der Sequenzierung wurden mittels TopHat Software und den entsprechenden Einstellungen für „single-end-reads“ analysiert. Als Referenzgenom diente eine entsprechende Datei des UCSC Genome Browsers. (102)

Array CGH, Microarray

Die komparative genomische Hybridisierung mit in „Microarrays“ als Ziel-DNA auf Objektträgern aufgetragenen DNA-Sequenzen wurde als zweite, ergänzende Methode zur Analyse des Transkriptomes eingesetzt. Dabei konkurriert grün markierte Test-DNA des Probanden mit rot markierter genomischer Referenz-DNA um die Hybridisierung mit der aufgetragenen Ziel-DNA. Das entstehende rot-grüne (bzw. bei gleicher Anlagerung von Test- und Referenz DNA gelbe) Fluoreszenzmuster wird bildanalytisch erfasst. In der Auswertung sieht man, ob die untersuchten DNA Sequenzen der (Probanden-) Test DNA im Vergleich zur Ziel-DNA über- bzw. unterrepräsentiert oder gleich vorhanden sind.

Bei DNA-Microarrays muss die mRNA mittels reverser Transkriptase in einen komplementären cDNA-Strang synthetisiert werden. Dabei werden die zur Detektion notwendigen fluoreszenzmarkierten Desoxynukleotide eingebaut. Verwendete Fluorophore sind die Cyanfarbstoffe Cy3 (Emission im grünen Spektrum bei 570nm) und Cy5 (Emission im roten Spektrum bei 670nm).

Für das in dieser Pilotstudie untersuchte muzinöse Ovarialkarzinom wurde die Affymetrix U133 plus 2 Plattform nach einem Protokoll des Herstellers angewandt. (103)

Die so generierten Transkriptome sollten mit RNA-Seq Daten und Microarray-Transkriptom Daten der open source Datenbanken „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) (104) bzw. der nach Juni 2016 in das „Genomic Data Commons“ (105) migrierten Daten verglichen werden. Aus den erwähnten Datenbanken wurden Transkriptome aller dort gespeicherten Proben von gesundem Ovarialgewebe, serösen Ovarialkarzinomen, Proben von gesundem Kolon und aller kolorektalen Adenokarzinome

abgerufen. Vor der bioinformatischen Analyse wurden die RNA-Seq Daten der Proben mittels „Alignement“ entsprechenden Genen zugeordnet. Bei unterschiedlichen Messwerten von Proben für ein Gen (Multi probes for one gene) in den Microarrays erfolgte arbiträr eine arithmetische Mittelung, um einen einzigen Wert zu erhalten. (106) Gene, die nicht in der TCGA Datenbank enthalten waren, wurden herausgefiltert. Die bioinformatische Auswertung erfolgte mittels Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis = PCA) und wurde am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Das der Hauptkomponentenanalyse zugrundeliegende mathematische Verfahren ist auch als Hauptachsentransformation oder Singulärwertzerlegung bekannt. Die PCA gehört zu den Methoden der multivariaten Statistik und soll umfangreiche Datensätze strukturieren, veranschaulichen und vereinfachen. Dabei wird eine Vielzahl gemessener Variablen durch eine möglichst aussagekräftige Linearkombinationen (auf die „Hauptkomponenten“) reduziert und näherungsweise erfasst. Die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse lassen keinen Rückschluss auf bestimmte Gene zu, sondern erlauben die Zuordnung bzw. Unterscheidung von Daten/Signalen zu Gruppen. Damit kann z.B. auf die Gewebzugehörigkeit rückgeschlossen werden.

Ergebnisse

Aus der TCGA Abfrage konnten Transkriptomdaten von 535 serösen Ovarialkarzinomen und von 8 gesunden Ovarialgewebeproben sowie von 153 Adenokarzinomen des Colons bzw. Rektums und von 19 gesunden Kolongewebeproben abgerufen werden. Die gesunden als auch die malignen Proben vom

Ovar basierten auf Affymetrix U133a Microarray Plattformen, die gesunden und die malignen Proben des Kolons bzw. Rektums wurden mittels Agilent g4502 Plattform bestimmt (s. Tabelle1).

Tabelle 1: verwendete Plattformen, Art der Gewebstypen, Probenanzahl, Herkunft

Gewebe	Affymetrix U133 plus2	Affymetrix U133a	Agilent g4502
Muzinöses Ovarialkarzinom (MUG)	1		
Seröses Ovarialkarzinom (TCGA)		535	564
Gesundes Ovarialgewebe (TCGA)		8	
Adenokarzinom des Kolon (TCGA)			153
Gesundes Kolongewebe (TCGA)			19
Summe	1	543	736

Abk: TCGA: The Cancer Genome Atlas; MUG Medizinische Universität Graz

Die Agilent g4502 bildet mehr als 11840 Gene (103) ab, die Abdeckung der Affymetrix Plattformen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: aus Affymetrix Product Family data sheet (107)

Critical Specifications for GeneChip® Human Genome Products				
	Cartridge Format		Plate Format	
	Human Genome U133 Plus 2.0 Array	Human Genome U133A 2.0 Array	Human Genome U133 A Array Plate	Human Genome U133 B Array Plate
Number of transcripts	~47,400	~18,400	~18,400	~20,600
Number of genes	>38,500	>14,500	>14,500	>18,500
Number of probe sets	>54,000	>22,000	>22,000	>22,000
Feature size	11 µm	11 µm	8 µm	8 µm
Oligonucleotide probe length	25-mer	25-mer	25-mer	25-mer
Probe pairs/sequence	11	11	11	11
Control sequences included:				
Hybridization controls	<i>bioB, bioC, bioD, cre</i>	<i>bioB, bioC, bioD, cre</i>	<i>bioB, bioC, bioD, cre</i>	<i>bioB, bioC, bioD, cre</i>
Poly-A controls	<i>dap, lys, phe, thr</i>	<i>dap, lys, phe, thr</i>	<i>dap, lys, phe, thr</i>	<i>dap, lys, phe, thr</i>
Normalization control set	100 probe sets	100 probe sets	100 probe sets	100 probe sets
Housekeeping/Control genes	GAPDH, beta-Actin, ISGF-3 (STAT1)	GAPDH, beta-Actin, ISGF-3 (STAT1)	GAPDH, beta-Actin, ISGF-3 (STAT1)	GAPDH, beta-Actin, ISGF-3 (STAT1)
Detection sensitivity	1:100,000*	1:100,000*	1:100,000*	1:100,000*

*As measured by detection of pre-labeled transcripts derived from human cDNA clones in a complex human background.

In der textsensitiven Abfrage mit Suchkriterien für muzinöse Ovarialkarzinome aus dem Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz wurden nach histopathologischem Review im Zeitraum vom 01.01.2002 bis 31.10.2017 22 Fälle gefunden.

Aus budgetären Gründen konnte nur das Transkriptom eines Falles mittels Ion Torrent basierter RNAseq und mittels Affymetrix U133 plus 2 Plattform Microarray untersucht werden. Dazu wurde der aktuellste Fall mit in der Biobank der Medizinischen Universität Graz kryokonserviertem Gewebe ausgewählt. Die Bearbeitung des Materials erfolgte, wie in der Methodik angeführt, am Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz. Die RNA Integrity Number von 5 ergab einen Hinweis auf eine mittelgradig degradierte RNA. Die auf dieser RNA basierende Ion Torrent RNAseq Transkriptomanalyse lieferte kein verwertbares Ergebnis.

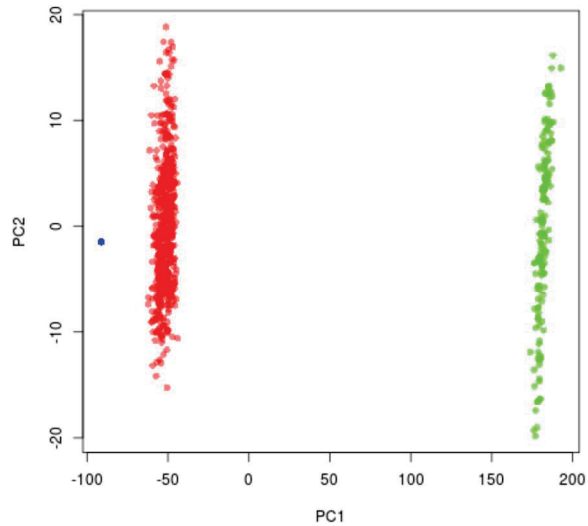
Die Microarray-Analyse des Transkriptoms des eigenen untersuchten Falles erfolgte mittels Affymetrix U133 plus 2 Plattform (s. Tabelle 1 und 2). Neben der Beschränkung auf Gene, die in den Transkriptomen der TCGA Datenbank erfasst sind, verblieben nach Ausscheiden von Matrixproben ohne verwertbares Fluoreszenzsignal 10283 analysierte Gene bzw. deren Transkripte.

In der Hauptkomponentenanalyse zeigt sich bei Beschränkung auf die Daten des muzinösen Ovarialkarzinoms, der serösen Ovarialkarzinome und der Adenokarzinome des Kolons bzw. Rektums ein vermeintlich eindeutiges Bild einer Diskrimination mit drei verschiedenen, distinkt voneinander

getrennten Punktwolken (s. Abb. 4). Die Interpretation der Daten lässt allerdings vermuten, dass dabei nur der Einfluss unterschiedlicher Microarray Plattformen zur Abbildung gelangt und kein Unterschied biologischer Qualität bzw. des biologischen Signals dargestellt wird.

Principal component analysis

Mucinous ovarian cancer
Serous ovarian cancer
Colon adenocarcinoma



First principal component
most likely only shows
variation between platforms
and no biological signal

Principal component 1 vs 2
Scaled and centered

Abbildung 4: Die erste Hauptkomponente zeigt am ehesten Unterschiede der zum Einsatz kommenden Microarray Plattformen

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis nach Elimination der ersten Hauptkomponente und die Darstellung der zweiten, dritten und vierten Hauptkomponente. In den sich überlappenden Punktwolken lässt sich kein wechselseitiger Bezug darstellen bzw. Anhalt für eine Diskrimination finden.

Principal component analysis

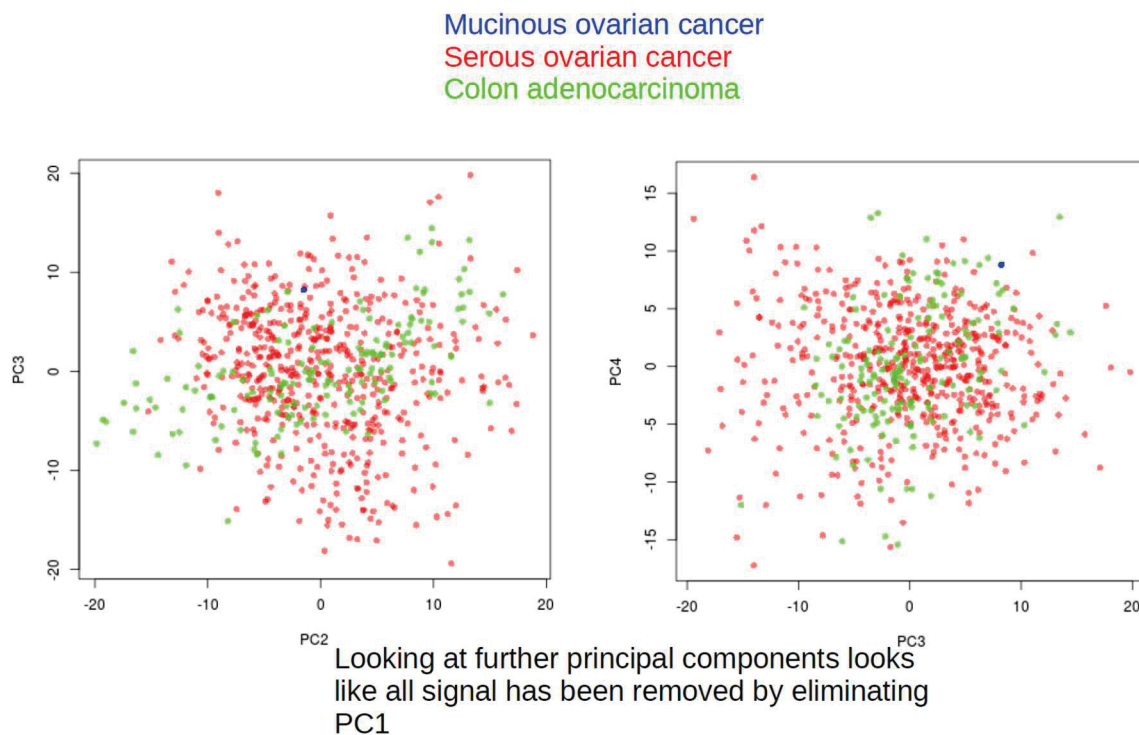


Abbildung 5: weitere Hauptkomponenten nach Subtraktion der ersten Hauptkomponente zeigen ein diffuses Bild ohne ersichtliche Diskrimination

Wenn die Hauptkomponentenanalyse um Proben von gesundem Ovarialgewebe und gesundem Kolongewebe erweitert wird, ergibt sich die Darstellung in der Abbildung 6. Diese ähnelt der Situation in Abb. 5, was die erste Hauptkomponente angeht. Für die zweite und dritte Hauptkomponente lassen sich zumindest Diskriminierungen zwischen Ovarialgewebe und Kolongewebe ableiten.

Principal component analysis

- Include healthy subjects

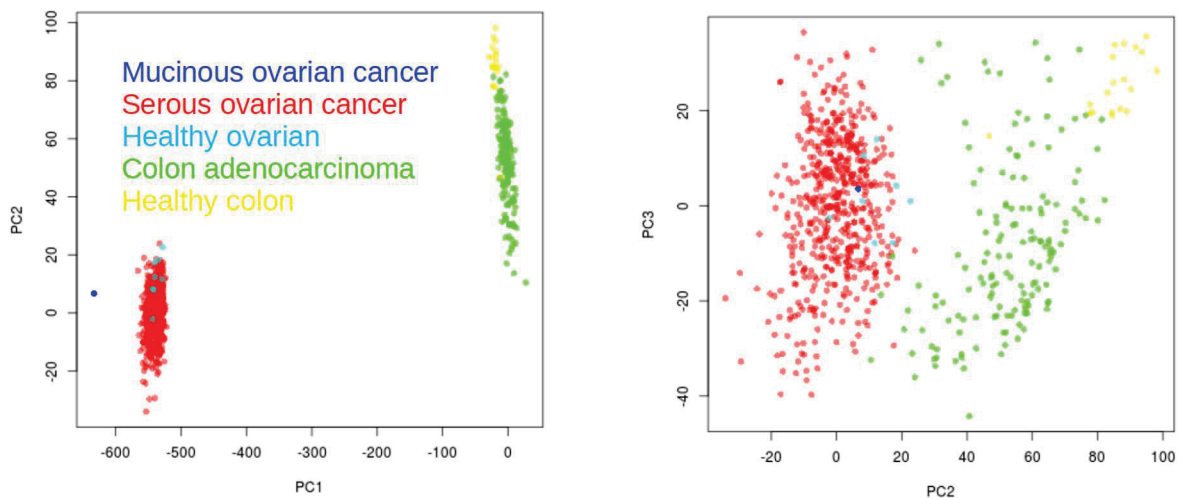


Abbildung 6: Bei Erweiterung der Analyse um Daten von gesundem Ovarialgewebe und gesundem Kolongewebe lassen sich Unterschiede zwischen Ovarial- und Kolongewebe erkennen. Gesundes Kolongewebe ist in gelber, kontrastarmer Schrift (an letzter Listenposition) bzw. gelber, kontrastarmer Punktvolke (rechts oben in den Graphiken) dargestellt.

Wenn die PCA um die Daten seröser Ovarialkarzinome des Agilent g4502 Microarrays erweitert wird, gibt sich wiederum in Zusammenschau mit der Abbildung 4 für die Hauptkomponente 1 ein analoges Bild (Abbildung 7). Die erste Hauptkomponente spricht demzufolge wohl ausschließlich für einen Unterschied zwischen den Plattformen. Bei Ausschluss der ersten Hauptkomponente liegt das untersuchte muzinöse Ovarialkarzinom bei Abbildung der zweiten und dritten Hauptkomponente distinkt unterschiedlich von serösen Ovarialkarzinomen und Kolonkarzinomen bzw. den Proben von gesundem Ovarial- und Kolongewebe zwischen „Ovar und Kolon“. Eine Interpretationsmöglichkeit für

die Position zwischen Ovarial- und Kolonkarzinomen ist, dass starke ovarielle Stromaanteile, deren Transkriptom mitanalysiert wurde, die ovarielle Herkunft mitabbilden können.

Principal component analysis

Add Agilent data of ovarian cancer samples

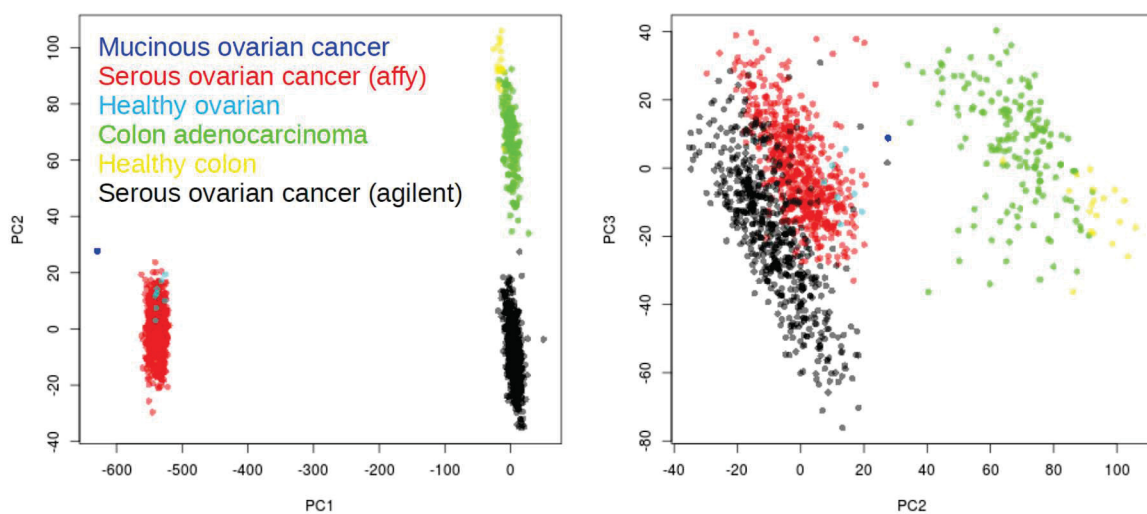


Abbildung 7: Die Erweiterung der Analyse um Agilent g4502 Daten lässt in den Hauptkomponenten 2 und 3 eine Abgrenzung vom muzinösen Ovarialgewebe zu den anderen Entitäten zu. Das muzinöse Ovarialkarzinom liegt zwischen „Ovar und Kolon“. Die serösen Ovarialkarzinome verschmelzen zu einer Entität. Gesundes Kolongewebe ist in gelber, kontrastarmer Schrift (an fünfter Listenposition) bzw. gelber, kontrastarmer Punktwolke (rechts oben bzw. rechts mittig in den Graphiken) dargestellt.

Wenn wie in Abbildung 8 die Daten der muzinösen CRCs von denen der nicht muzinösen Adenokarzinome getrennt dargestellt werden, sind die Punktwolken der beiden Entitäten zwar voneinander getrennt wahrnehmbar, der optische Eindruck des Unterschiedes ist aber gering. Eine Berechnung von Korrelationen im Rahmen der Hauptkomponentenanalyse konnte nicht erfolgen.

Principal component analysis

Distinguish mucinous from non-mucinous colon adenocarcinoma

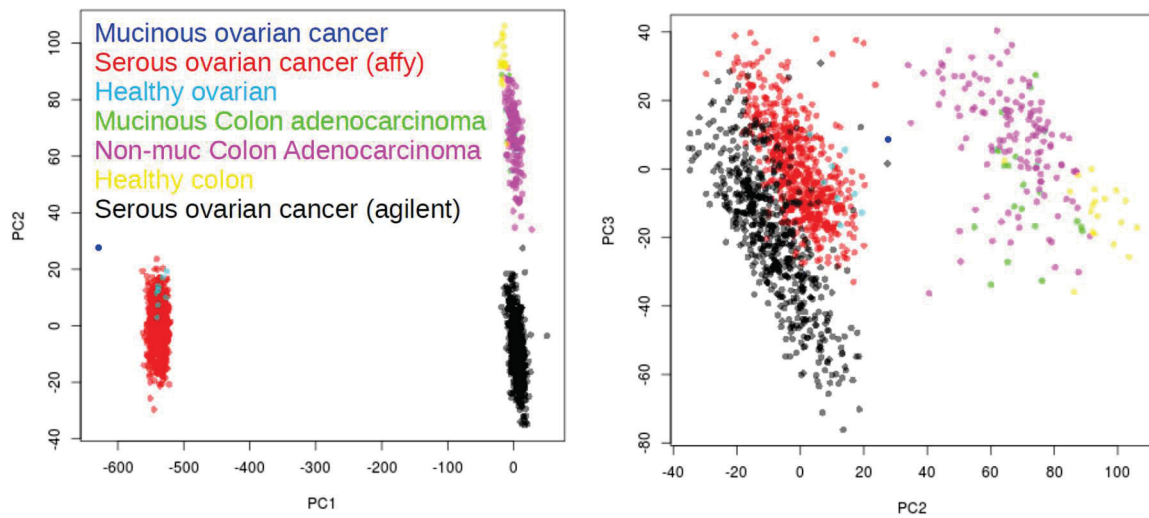


Abbildung 8: Die Punktwolken von muzinösen und nicht muzinösen Adenokarzinomen des Kolons sind trotz einiger Überlappung voneinander getrennt wahrnehmbar. Gesundes Kolongewebe ist in gelber, kontrastarmer Schrift (an sechster Listenposition) bzw. gelber, kontrastarmer Punktwolke (rechts oben bzw. rechts mittig in den Graphiken) dargestellt.

Zusammenfassung und Diskussion

Genetische Profile muzinöser CRCs und MOCs sind in der Literatur wenig beachtet und in den onkogenetischen Datenbanken (Cosmic, CBioportal, TCGA) im Vergleich zu nicht muzinöser Histologie von Ovarialkarzinomen bzw. CRCs unterrepräsentiert. Ein statistisch analytischer Vergleich ist infolge der wenigen Daten bzw. der unterschiedlichen Methodik nicht möglich.

Deskriptiv lässt sich aber der Eindruck gewinnen, dass muzinöse CRCs, muzinöse Appendixkarzinome und MOCs ähnliche Mutationsfrequenzen folgender Gene aufweisen: *KRAS*, *SMAD4* und *NTRK1* Mutationen sind häufig, *BRAF*, *PIK3CA*, *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS1*, *hPMS2* eher selten nachzuweisen. Darüber hinaus scheint die Identifikation von überexprimierten, eher „intestinalen“ Zelladhäsionsfaktoren ein wesentliches Charakteristikum von MOCs (und muzinösen CRCs) zu sein. Die Region 19q13.1-13.4, besonders 19q13.2 beinhaltet zumindest MOC spezifische SNPs (mit unbestimmter Assoziation in CRCs), eQTL Assoziationen zwischen MOCs und CRCs (ohne histologischen Subtypen) lassen sich für *PAX8* auf 2q13 finden.

In der Pilotstudie konnte infolge enger budgetärer Grenzen nur ein einziger Fall eines muzinösen Ovarialkarzinoms untersucht werden. Der Interpretation der Daten eines einzigen Falls im Vergleich zu korrespondierenden Daten mehrerer hundert aus TCGA *in silico* abrufbarer Datensätze sind naturgemäß sehr enge Grenzen gesetzt. Eine allenfalls mögliche induktive Schlussfolgerung als Gewinnung von allgemeinen Aussagen aus der Betrachtung eines Einzelfalls bleibt eine Hypothese. Die Ion Torrent RNAseq Transkriptomanalyse mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung lieferte kein verwertbares Ergebnis. Für diesen Umstand fand sich abgesehen von möglicherweise unzureichender RNA Qualität leider keine Erklärung.

Die Daten des Microarrays waren für die PCA verwertbar. Die Interpretation der Daten der ersten Hauptkomponente lässt allerdings vermuten, dass dabei nur der Einfluss unterschiedlicher Microarray Plattformen zur Abbildung gelangt und kein Unterschied biologischer Qualität dargestellt wird. Wenn man für diesen Umstand korrigierend die erste Hauptkomponente eliminiert und die zweite und dritte Hauptkomponente berücksichtigt, sind folgende Interpretationen denkbar. Das untersuchte muzinöse Ovarialkarzinom unterscheidet sich in seinem Transkriptom distinkt von serösen Ovarialkarzinomen. Die Position zwischen serösen Ovarialkarzinomen und Kolonkarzinomen kann mit dem Anteil ovariellen Stromaerwesbes erklärt werden. Eine Analyse mit weniger Stroma bzw. von isoliertem Karzinomepithel könnte Ergebnisse denkbar machen, die muzinöse Ovarialkarzinome in der Gruppe der muzinösen Darmkarzinome abbilden könnten. Um für diese Vermutung Beweise zu finden, bedarf es einer Analyse des Transkriptoms weiterer muzinöser Ovarialkarzinome. Diese Untersuchung ist

geplant, das aktuelle Votum der Ethikkommission hat dafür auch weitere Gültigkeit. Neben einer NGS-basierten Transkriptomanalyse soll dabei auch eine auf der Agilent Plattform basierte Microarray Analyse durchgeführt werden, weil es dafür ausreichend *in silico* abrufbare Vergleichsdaten gibt und weil diese Tests günstiger durchzuführen sind.

Das muzinöse Ovarialkarzinom ist nicht nur makroskopisch, mikroskopisch und immunhistochemisch anderen muzinösen Karzinomen im Becken sehr ähnlich, sondern scheint auch genetisch denselben Ursprung zu haben – der Beweis dafür steht aber weiterhin aus.

Literatur

1. Winter WE, Maxwell GL, Tian C, Carlson JW, Ozols RF, Rose PG, u. a. Prognostic Factors for Stage III Epithelial Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 7. Mai 2007;25(24):3621–7.
2. Warschkow R, Tarantino I, Huttner FJ, Schmied BM, Guller U, Diener MK, u. a. Predictive value of mucinous histology in colon cancer: a population-based, propensity score matched analysis. *Br J Cancer.* 26. April 2016;114(9):1027–32.
3. AWMF: Detail [Internet]. [zitiert 1. Dezember 2017]. Verfügbar unter: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-035OL.html>
4. Suchergebnisse [Internet]. [zitiert 1. Dezember 2017]. Verfügbar unter: https://www.statistik.at/web_de/nomenu/suchergebnisse/index.html
5. Harter P, Sehouli J, Lorusso D, Reuss A, Vergote I, Marth C, u. a. LION: Lymphadenectomy in ovarian neoplasms—A prospective randomized AGO study group led gynecologic cancer intergroup trial. *J Clin Oncol.* 20. Mai 2017;35(15_suppl):5500–5500.
6. Kurman RJ, Shih I-M. Seromucinous Tumors of the Ovary. What’s in a Name? *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol.* Januar 2016;35(1):78–81.
7. R.J. Kurmann, M.L. Carcangiu, C.S. Herrington, R.H. Young. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Lyon: IARC Press; 2014. (4; Bd. 6).
8. Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol.* Mai 2004;164(5):1511–8.
9. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, u. a. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 1. Juli 2014;15(8):852–61.
10. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, u. a. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *The Lancet.* 24. Juli 2010;376(9737):245–51.
11. Frey MK, Pothuri B. Homologous recombination deficiency (HRD) testing in ovarian cancer clinical practice: a review of the literature. *Gynecol Oncol Res Pract.* 22. Februar 2017;4:4.
12. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 29. Juni 2011;474:609.
13. Murken J, Grimm, Tiemo, Holinski-Feder, Elke, Zerres, Klaus. Humangenetik. 8. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2011. 589 S.

14. Moschetta M, George A, Kaye SB, Banerjee S. BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer. *Ann Oncol*. August 2016;27(8):1449–55.
15. Lupo B, Trusolino L. Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation in cancer: Old and new paradigms revisited. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 1. August 2014;1846(1):201–15.
16. Randall LM, Pothuri B. The genetic prediction of risk for gynecologic cancers. *Gynecol Oncol*. 1. April 2016;141(1):10–6.
17. Chiang JW, Karlan BY, Cass Ilana, Baldwin RL. BRCA1 promoter methylation predicts adverse ovarian cancer prognosis. *Gynecol Oncol*. 1. Juni 2006;101(3):403–10.
18. Hoerl HD, Hart WR. Primary ovarian mucinous cystadenocarcinomas: a clinicopathologic study of 49 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol*. Dezember 1998;22(12):1449–62.
19. Seidman JD, Kurman RJ, Ronnett BM. Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. *Am J Surg Pathol*. Juli 2003;27(7):985–93.
20. Muyldermans K, Moerman P, Amant F, Leunen K, Neven P, Vergote I. Primary invasive mucinous ovarian carcinoma of the intestinal type: Importance of the expansile versus infiltrative type in predicting recurrence and lymph node metastases. *Eur J Cancer*. 1. Mai 2013;49(7):1600–8.
21. Ramalingam P. Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Features of Epithelial Ovarian Cancer. *Oncol Williston Park N*. Februar 2016;30(2):166–76.
22. McCluggage WG. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology (Phila)*. August 2011;43(5):420–32.
23. Gemignani ML, Schlaerth AC, Bogomolny F, Barakat RR, Lin O, Soslow R, u. a. Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. August 2003;90(2):378–81.
24. Consortium OCA, others. Genome-wide significant risk associations for mucinous ovarian carcinoma. *Nat Genet*. 2015;47(8):888–897.
25. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, u. a. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 27. Juni 2002;417(6892):949–54.
26. Feeley KM, Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology*. Februar 2001;38(2):87–95.
27. Australian Cancer Study, Australian Ovarian Cancer Study Group, On behalf of the Ovarian Cancer Association Consortium, Earp MA, Kelemen LE, Magliocco AM, u. a. Genome-wide association study of subtype-specific epithelial ovarian cancer risk alleles using pooled DNA. *Hum Genet*. Mai 2014;133(5):481–97.
28. Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry JP, Scolyer RA, Smith AN, u. a. A distinct molecular profile associated with mucinous epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 27. März 2006;94(6):904–13.
29. Marquez RT, Baggerly KA, Patterson AP, Liu J, Broaddus R, Frumovitz M, u. a. Patterns of gene expression in different histotypes of epithelial ovarian cancer correlate with those in normal fallopian tube, endometrium, and colon. *Clin Cancer Res*. 2005;11(17):6116–6126.

30. Hauptmann S, Friedrich K, Redline R, Avril S. Ovarian borderline tumors in the 2014 WHO classification: evolving concepts and diagnostic criteria. *Virchows Arch.* 2017;470(2):125–42.
31. Alcohol, smoking and the risk of premalignant and malignant colorectal neoplasms. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 1. Oktober 2017;31(5):561–8.
32. Dickdarm, Enddarm [Internet]. [zitiert 18. Dezember 2017]. Verfügbar unter: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/menschen_und_gesellschaft/gesundheit/krebserkrankungen/dickdarm_enddarm/021701.html
33. Kolonkarzinom — Onkopedia [Internet]. [zitiert 18. Dezember 2017]. Verfügbar unter: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/kolonkarzinom>
34. Minsky BD, Mies C, Rich TA, Recht A, Chaffey JT. Colloid carcinoma of the colon and rectum. *Cancer.* 15. Dezember 1987;60(12):3103–12.
35. Minsky BD. Clinicopathologic impact of colloid in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum.* August 1990;33(8):714–9.
36. Kinzler KW, Vogelstein B. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* April 1997;386(6627):761.
37. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *science.* 2013;339(6127):1546–1558.
38. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, u. a. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1. September 1988;319(9):525–32.
39. Bosman FT, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Herausgeber. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010. 417 S. (World Health Organization classification of tumours).
40. Noffsinger AE. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:343–64.
41. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology.* Februar 2013;62(3):367–86.
42. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* Juni 2010;138(6):2044–58.
43. Andrieu N, Launoy G, Guillois R, Ory-Paoletti C, Gignoux M. Familial relative risk of colorectal cancer: a population-based study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. September 2003;39(13):1904–11.
44. Butterworth AS, Higgins JPT, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. Januar 2006;42(2):216–27.
45. AWMF: Detail [Internet]. [zitiert 16. Dezember 2017]. Verfügbar unter: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/021-007OL.html>
46. Schmiegel W, Buchberger B, Follmann M, Graeven U, Heinemann V, Langer T, u. a. S3-Leitlinie—Kolorektales Karzinom. *Z Für Gastroenterol.* 2017;55(12):1344–1498.

47. Kakar S, Aksoy S, Burgart LJ, Smyrk TC. Mucinous carcinoma of the colon: correlation of loss of mismatch repair enzymes with clinicopathologic features and survival. *Mod Pathol*. Juni 2004;17(6):696–700.
48. Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev*. Dezember 2016;51:19–26.
49. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, u. a. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1. Januar 2004;10(1 Pt 1):191–5.
50. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ, u. a. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet*. September 2004;41(9):664–8.
51. McGivern A, Wynter CVA, Whitehall VLJ, Kambara T, Spring KJ, Walsh MD, u. a. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer*. 2004;3(2):101–7.
52. Loughrey MB, Waring PM, Tan A, Trivett M, Kovalenko S, Beshay V, u. a. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer*. 2007;6(3):301–10.
53. Connor SJ, Hanna GB, Frizelle FA. Appendiceal tumors: retrospective clinicopathologic analysis of appendiceal tumors from 7,970 appendectomies. *Dis Colon Rectum*. Januar 1998;41(1):75–80.
54. Turaga KK, Pappas SG, Gamblin TC. Importance of histologic subtype in the staging of appendiceal tumors. *Ann Surg Oncol*. Mai 2012;19(5):1379–85.
55. Misdraji J, Yantiss RK, Graeme-Cook FM, Balis UJ, Young RH. Appendiceal mucinous neoplasms: a clinicopathologic analysis of 107 cases. *Am J Surg Pathol*. August 2003;27(8):1089–103.
56. Tirumani SH, Fraser-Hill M, Auer R, Shabana W, Walsh C, Lee F, u. a. Mucinous neoplasms of the appendix: a current comprehensive clinicopathologic and imaging review. *Cancer Imaging Off Publ Int Cancer Imaging Soc*. 22. Februar 2013;13:14–25.
57. Reiter E. Muzinöse Appendixtumoren und Pseudomyxoma peritonei: ein aktueller Überblick. *Interdiszip Onkol*. 2012;4(2):7–11.
58. Hinson FL, Ambrose NS. Pseudomyxoma peritonei. *Br J Surg*. Oktober 1998;85(10):1332–9.
59. Sugarbaker PH. Managing the peritoneal surface component of gastrointestinal cancer. Part 1. Patterns of dissemination and treatment options. *Oncol Williston Park N*. Januar 2004;18(1):51–9.
60. Lin M, Wei L-J, Sellers WR, Lieberfarb M, Wong WH, Li C. dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. *Bioinformatics*. 22. Mai 2004;20(8):1233–40.
61. Feltmate CM, Lee KR, Johnson M, Schorge JO, Wong K, Hao K, u. a. Whole-Genome Allelotyping Identified Distinct Loss-of-Heterozygosity Patterns in Mucinous Ovarian and Appendiceal Carcinomas. *Clin Cancer Res*. 1. November 2005;11(21):7651–7.

62. Choi YJ, Lee SH, Kim MS, Jung S-H, Hur SY, Chung Y-J, u. a. Whole-exome sequencing identified the genetic origin of a mucinous neoplasm in a mature cystic teratoma. *Pathology (Phila)*. 1. Juni 2016;48(4):372–6.
63. Hara K, Saito T, Hayashi T, Yimit A, Takahashi M, Mitani K, u. a. A mutation spectrum that includes GNAS, KRAS and TP53 may be shared by mucinous neoplasms of the appendix. *Pathol - Res Pract*. 1. September 2015;211(9):657–64.
64. Lee J-O, Russo AA, Pavletich NP. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature*. 26. Februar 1998;391:859.
65. Adams A, Wise-Draper T, Wells S. Human Papillomavirus Induced Transformation in Cervical and Head and Neck Cancers. *Cancers*. 15. September 2014;6(3):1793–820.
66. Lima PC, Teixeira J, Aires GN, Andrade LDA. Endocervical gastric-type adenocarcinoma, an unrelated HPV tumour: difficulties in screening and diagnosis. *BMJ Case Rep [Internet]*. 11. April 2017;2017. Verfügbar unter: <http://casereports.bmj.com/content/2017/bcr-2017-219724.abstract>
67. Wada T, Ohishi Y, Kaku T, Aman M, Imamura H, Yasutake N, u. a. Endocervical Adenocarcinoma With Morphologic Features of Both Usual and Gastric Types: Clinicopathologic and Immunohistochemical Analyses and High-risk Hpv Detection by In Situ Hybridization. *Am J Surg Pathol*. 1. Mai 2017;41(5):696–705.
68. Lax SF, Horn L-C, Löning T. Kategorisierung der Tumoren der Cervix uteri: Neues in der WHO-Klassifikation 2014. *Pathol*. November 2016;37(6):573–84.
69. Rambau PF, McIntyre JB, Taylor J, Lee S, Ogilvie T, Sienko A, u. a. Morphologic Reproducibility, Genotyping, and Immunohistochemical Profiling Do Not Support a Category of Seromucinous Carcinoma of the Ovary: *Am J Surg Pathol*. Mai 2017;41(5):685–95.
70. AWMF: Detail [Internet]. [zitiert 23. Januar 2018]. Verfügbar unter: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-033OL.html>
71. International Classification of Diseases for Oncology [Internet]. [zitiert 12. Februar 2018]. Verfügbar unter: <http://codes.iarc.fr/code/2964>
72. Hugen N, Brown G, Glynn-Jones R, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. Juni 2016;13(6):361–9.
73. Stewart CJR, Ardakani NM, Doherty DA, Young RH. An Evaluation of the Morphologic Features of Low-grade Mucinous Neoplasms of the Appendix Metastatic in the Ovary, and Comparison With Primary Ovarian Mucinous Tumors: *Int J Gynecol Pathol*. Januar 2014;33(1):1–10.
74. German MS, Wang J, Fernald AA, Espinosa R, Le Beau MM, Bell GI. Localization of the Genes Encoding Two Transcription Factors, LMX1 and CDX3, Regulating Insulin Gene Expression to Human Chromosomes 1 and 13. *Genomics*. 15. November 1994;24(2):403–4.
75. Saad RS. CDX2 as a marker for intestinal differentiation: Its utility and limitations. *World J Gastrointest Surg*. 2011;3(11):159.
76. Bayrak R, Haltas H, Yenidunya S. The value of CDX2 and cytokeratins 7 and 20 expression in differentiating colorectal adenocarcinomas from extraintestinal gastrointestinal

adenocarcinomas: cytokeratin 7-/20+ phenotype is more specific than CDX2 antibody. *Diagn Pathol.* 2012;7(1):9.

77. Moh M, Krings G, Ates D, Aysal A, Kim GE, Rabban JT. SATB2 Expression Distinguishes Ovarian Metastases of Colorectal and Appendiceal Origin From Primary Ovarian Tumors of Mucinous or Endometrioid Type: *Am J Surg Pathol.* März 2016;40(3):419–32.
78. Perez Montiel D, Arispe Angulo K, Cantú-de León D, Bornstein Quevedo L, Chanona Vilchis J, Herrera Montalvo L. The value of SATB2 in the differential diagnosis of intestinal-type mucinous tumors of the ovary: primary vs metastatic. *Ann Diagn Pathol.* August 2015;19(4):249–52.
79. Magnusson K, de Wit M, Brennan DJ, Johnson LB, McGee SF, Lundberg E, u. a. SATB2 in Combination With Cytokeratin 20 Identifies Over 95% of all Colorectal Carcinomas: *Am J Surg Pathol.* Juli 2011;35(7):937–48.
80. Berg KB, Schaeffer DF. SATB2 as an Immunohistochemical Marker for Colorectal Adenocarcinoma: A Concise Review of Benefits and Pitfalls. *Arch Pathol Lab Med.* 1. Oktober 2016;141(10):1428–33.
81. Cancer Browser [Internet]. [zitiert 22. Februar 2018]. Verfügbar unter: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue?wgs=off&sn=large_intestine&ss=colon&hn=adenoma&sh=&in=t&src=tissue&all_data=n
82. Chan E. KRAS c.34G>T (G12C) Mutation in Colorectal Cancer - My Cancer Genome [Internet]. [zitiert 10. Mai 2016]. Verfügbar unter: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/kras/33/>
83. KRAS - Wikipedia [Internet]. [zitiert 22. Februar 2018]. Verfügbar unter: <https://en.wikipedia.org/wiki/KRAS>
84. Ganesh K, Shah RH, Vakiani E, Nash GM, Skottowe HP, Yaeger R, u. a. Clinical and genetic determinants of ovarian metastases from colorectal cancer. *Cancer.* 1. April 2017;123(7):1134–43.
85. Christensen TD, Palshof JA, Larsen FO, Poulsen TS, Høgdall E, Pfeiffer P, u. a. Associations between primary tumor RAS, BRAF and PIK3CA mutation status and metastatic site in patients with chemo-resistant metastatic colorectal cancer. *Acta Oncol.* 30. Januar 2018;1–6.
86. Stover DG. BRAF c.1397G>T (G466V) Mutation in Colorectal Cancer - My Cancer Genome [Internet]. [zitiert 10. Mai 2016]. Verfügbar unter: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/braf/70/>
87. Gorukmez O, Yakut T, Gorukmez O, Sag SO, Karkucak M, Kanat O. Distribution of KRAS and BRAF Mutations in Metastatic Colorectal Cancers in Turkish Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 11. April 2016;17(3):1175–9.
88. cBioPortal for Cancer Genomics [Internet]. [zitiert 23. Februar 2018]. Verfügbar unter: <http://www.cbioportal.org/>
89. The Cancer Genome Atlas Home Page [Internet]. The Cancer Genome Atlas - National Cancer Institute. [zitiert 23. Februar 2018]. Verfügbar unter: <https://cancergenome.nih.gov/>

90. Cremolini C, Di Bartolomeo M, Amatu A, Antoniotti C, Moretto R, Berenato R, u. a. BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. *Ann Oncol*. 1. Oktober 2015;26(10):2092–7.
91. Nummela P, Saarinen L, Thiel A, Järvinen P, Lehtonen R, Lepistö A, u. a. Genomic profile of pseudomyxoma peritonei analyzed using next-generation sequencing and immunohistochemistry: Genomic alterations in pseudomyxoma peritonei. *Int J Cancer*. 1. März 2015;136(5):E282–9.
92. Despierre E, Yesilyurt BT, Lambrechts S, Johnson N, Verheijen R, van der Burg M, u. a. Epithelial Ovarian Cancer: Rationale for Changing the One-Fits-All Standard Treatment Regimen to Subtype-Specific Treatment. *Int J Gynecol Cancer*. März 2014;24(3):468–77.
93. Colorectal Adenocarcinoma (TCGA, Provisional) [Internet]. [zitiert 8. März 2018]. Verfügbar unter: http://www.cbioportal.org/study?id=coadread_tcga#summary
94. Taggart MW, Galbincea J, Mansfield PF, Fournier KF, Royal RE, Overman MJ, u. a. High-level Microsatellite Instability in Appendiceal Carcinomas: *Am J Surg Pathol*. August 2013;37(8):1192–200.
95. Segev Y, Pal T, Rosen B, McLaughlin JR, Sellers TA, Risch HA, u. a. Risk Factors for Ovarian Cancers With and Without Microsatellite Instability. *Int J Gynecol Cancer*. Mai 2014;24(4):664.
96. Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry JP, Scolyer RA, Smith AN, u. a. A distinct molecular profile associated with mucinous epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2006 [zitiert 29. April 2016];94. Verfügbar unter: <http://www.readcube.com/articles/10.1038%2Fsj.bjc.6603003>
97. Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, u. a. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Mol Med TFF Pept Mucosal Prot Repair More*. 1. Mai 2004;25(5):885–98.
98. Li W, Turner A, Aggarwal P, Matter A, Storvick E, Arnett DK, u. a. Comprehensive evaluation of AmpliSeq transcriptome, a novel targeted whole transcriptome RNA sequencing methodology for global gene expression analysis. *BMC Genomics*. 2015;16:1069.
99. Transcriptome Sequencing by Ion Torrent Next-Generation Sequencing | Thermo Fisher Scientific [Internet]. [zitiert 13. Juli 2017]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/sequencing/rna-sequencing/transcriptome-sequencing/transcriptome-sequencing-ion-torrent-next-generation-sequencing.html>
100. Next Generation Sequencing [Internet]. [zitiert 30. März 2018]. Verfügbar unter: <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=next-generation-sequencing>
101. Shomu's Biology. Illumina sequencing | DNA sequencing by synthesis [Internet]. [zitiert 30. März 2018]. Verfügbar unter: <https://www.youtube.com/watch?v=TDD6bExnR38>
102. UCSC Genome Browser Home [Internet]. [zitiert 30. März 2018]. Verfügbar unter: <https://genome.ucsc.edu/>
103. Affymetrix [Internet]. [zitiert 30. März 2018]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/microarray-analysis/affymetrix.html>

104. The Cancer Genome Atlas - Data Portal [Internet]. [zitiert 31. März 2018]. Verfügbar unter: <https://tcga-data.nci.nih.gov/docs/publications/tcga/>?
105. Home | NCI Genomic Data Commons [Internet]. [zitiert 31. März 2018]. Verfügbar unter: <https://gdc.cancer.gov/>
106. microarray: dealing with multi probes for one gene [Internet]. [zitiert 31. März 2018]. Verfügbar unter: <https://support.bioconductor.org/p/17259/>
107. Microarray Analysis | Thermo Fisher Scientific [Internet]. [zitiert 2. April 2018]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/microarray-analysis.html>