

Aus dem Department für Frauengesundheit Tübingen

Universitäts-Frauenklinik

**Sertoli – Leydigzelltumoren des Ovars: Analyse des
Dicer1 – und Foxl2 – Mutationstatus**

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

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

vorgelegt von

Keul, Jacqueline Sophie Luise

2020

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. S. Kommos
2. Berichterstatter:	Professor Dr. B. Wiesinger
Tag der Disputation:	25.11.2020

gewidmet meinem Vater

Dr. med. Hans Georg Keul

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Sertoli – Leydigzelltumoren.....	1
1.2 Dicer1 – Mutationen bei SLCT.....	6
1.3 Foxl2 – Mutationen bei SLCT.....	7
1.4 Fragestellung.....	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Studienaufbau	10
2.2 Material.....	10
2.3 Methoden.....	11
2.3.1 DNA/RNA – Extraktion.....	11
2.3.2 Foxl2 – Testung.....	14
2.3.3 Dicer1 – Sequenzierung nach Sanger	16
2.3.4 Dicer1 – MiSeq Sequenzierung	18
2.3.5 Erhebung klinischer Daten	19
2.4 Statistische Analyse.....	19
3. Ergebnisse.....	20
3.1 Allgemeine Beschreibung der Kohorte	20
3.2 Beschreibung der SLCT mit einer Dicer1 – Mutation	29
3.3 Beschreibung der SLCT mit der Foxl2 – C134W – Mutation	33
3.4 Beschreibung der SLCT ohne Dicer1 – und Foxl2 – Mutation.....	35
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	38
4. Diskussion.....	43
4.1 Allgemeine Analyse des Kollektivs	43
4.2 Bedeutung der Dicer1 – Mutationsanalysen	46
4.3 Bedeutung der Foxl2 – Mutationsanalyse	48
4.4 Bedeutung dieser Arbeit für die Klassifikation der SLCT.....	49
5. Zusammenfassung	51
6. Tabellarischer Anhang.....	53
6.1 Verbrauchsmaterialien.....	53
6.2 Chemikalien und Enzyme	53
6.3 Kommerziell erwerbliche Kits.....	54

6.4	Geräte.....	54
6.5	Computer – Software	55
6.6	Fragebogen zur Erhebung klinischer Daten	56
7.	Liste der Veröffentlichungen.....	59
8.	Literaturverzeichnis	60
9.	Erklärung zum Eigenanteil	64
10.	Danksagung	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fälle mit einem auffälligen Laboregebnis präoperativ (Quelle: eigene Darstellung)	25
Tabelle 2: Verteilung der Operationsverfahren (Quelle: eigene Darstellung)	27
Tabelle 3: Patientinnen mit einem Rezidiv (Quelle: eigene Darstellung)	29
Tabelle 4: Fälle mit einer Hotspotmutation im Dicer1 – Gen (Quelle: eigene Darstellung)	30
Tabelle 5: Fälle mit einer Foxl2 – Mutation (Quelle: eigene Darstellung)	33
Tabelle 6: Fälle ohne Foxl2 – und Dicer1 – Mutation (Quelle: eigene Darstellung)	36

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unterformen der Ovarialtumoren	2
Abbildung 2: Bildung der miRNA	6
Abbildung 3: Funktionen von Foxl2 – WT im Vergleich zu Foxl2 mit C134W – Mutation (rot)	9
Abbildung 4: Ablauf der DNA – und RNA – Extraktion	12
Abbildung 5: Herstellung der Qubit – Proben	14
Abbildung 6: Ablauf der Realtime PCR	15
Abbildung 7: Auswertung des Allelic discrimination assays	16
Abbildung 8: Prinzip der Sequenzierung nach Sanger	17
Abbildung 9: Auswertung der Sanger – Sequenzierung bei Vorliegen des Wildtyps (a) oder einer Mutation (b)	18
Abbildung 10: Auswirkung der spezialisierten Zweitbegutachtung auf die Diagnose SLCT	21
Abbildung 11: Altersverteilung	22
Abbildung 12: Verteilung der Differenzierungsgrade	22
Abbildung 13: Altersverteilung nach Differenzierungsgrad mit Angabe des Medians	23
Abbildung 14: Präoperative laborchemische Auffälligkeiten	24
Abbildung 15: Auftreten von Symptomen in der Kohorte	26
Abbildung 16: Wahl der operativen Therapie in Abhängigkeit vom Alter	28
Abbildung 17: Altersverteilung der Dicer1 – mutierten Fälle	31
Abbildung 18: Laborauffälligkeiten bei Vorliegen der Dicer1 – Mutation	32
Abbildung 19: Verteilung der Leitsymptome bei Vorliegen einer Dicer1 – Mutation	32
Abbildung 20: Altersverteilung der Foxl2 – mutierten Fälle	34
Abbildung 21: Verteilung der Leitsymptome bei Foxl2 – Mutation	35
Abbildung 22: Altersverteilung der Wildtyp – Gruppe	36
Abbildung 23: Auffälligkeiten in den Labortests bei Wildtyp – SLCT	37
Abbildung 24: Verteilung der Leitsymptome bei Patientinnen mit einem Wildtyp – SLCT	38
Abbildung 25: Altersverteilung in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	39
Abbildung 26: Differenzierungsgrade in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	40
Abbildung 27: Laborauffälligkeiten in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	41
Abbildung 28: Klinik in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	42

Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha – Feto – Protein
AP – 1	Aktivator – Protein 1
BSO	Bilaterale Salpingo – Oophorektomie
CA – 125	Cancer – Antigen 125
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CYP19A1	Cytochrome P450 Familie 19 Subfamilie A Member 1 (Aromatase)
ddNTP	Didesoxyribonukleosid – Triphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid – Triphosphate
EMA	Epitheliales Membran – Antigen
FFPE	formalin – fixed paraffin – embedded
Foxl2	Forkhead box protein L2
FSH	Follikel – stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GRAS	GnRH receptor activating sequence
LH	Luteinisierendes Hormon
miRNA	microRNA
mRNA	Messenger RNA
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
PAZ	Proteindomäne, benannt nach den ersten drei beschriebenen Proteinen mit PAZ – Domäne (Piwi/Argonaut/Zwille)
PCR	Polymerase chain reaction
RISC	RNA – induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
SLCT	Sertoli – Leydigzelltumor
Smads	Proteine ähnlich zu MAD (Drosophila) und Sma (C. elegans)
SOX9	SRY (Sex Determining Region Y) – Box 9
Star	Steroidogenic acute regulatory protein
TESCO	Testis – specific enhancer core region von SOX9
USO	Unilaterale Salpingo – Oophorektomie

WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Sertoli – Leydigzelltumoren

In Deutschland erhielten 2014 knapp 7250 Frauen die Erstdiagnose „Eierstockkrebs“. Damit zählen die bösartigen Ovarialtumoren nach den Tumoren der Brustdrüse, des Darmes, der Lunge, der Gebärmutter, dem malignen Melanom der Haut sowie den Tumoren der Bauchspeicheldrüse und den Non-Hodgkin-Lymphomen mit einem prozentualen Anteil von 3,2% zu den zehn häufigsten Tumorneuerkrankungen der Frau [1]. Hinter dieser Tumorentität verbirgt sich eine Vielzahl unterschiedlicher Subtypen, welche sich, wie in Abbildung 1 gezeigt, grob in drei Hauptkategorien einordnen lassen. Die größte Gruppe stellen die epithelialen Ovarialtumoren dar, deren häufigster und wohl auch bekanntester Vertreter das high grade seröse Ovarialkarzinom ist. Bei der zweitgrößten Gruppe handelt es sich um ovarielle Keimzelltumoren, die sich aus pluripotenten Keimzellvorstufen entwickeln. Hierzu gehören beispielsweise die Dermoidzyste und das Dysgerminom. Die dritte und mit einem Anteil von 8% auch kleinste Untergruppe umfasst die Keimstrang – Stromatumoren, welche aus den Granulosazellen oder den stromabildenden Zellen wie zum Beispiel Thekazellen oder Fibroblasten hervorgehen. Diese präsentieren sich in der Mehrzahl der Fälle als östrogenproduzierende adulte Granulosazelltumoren [2].

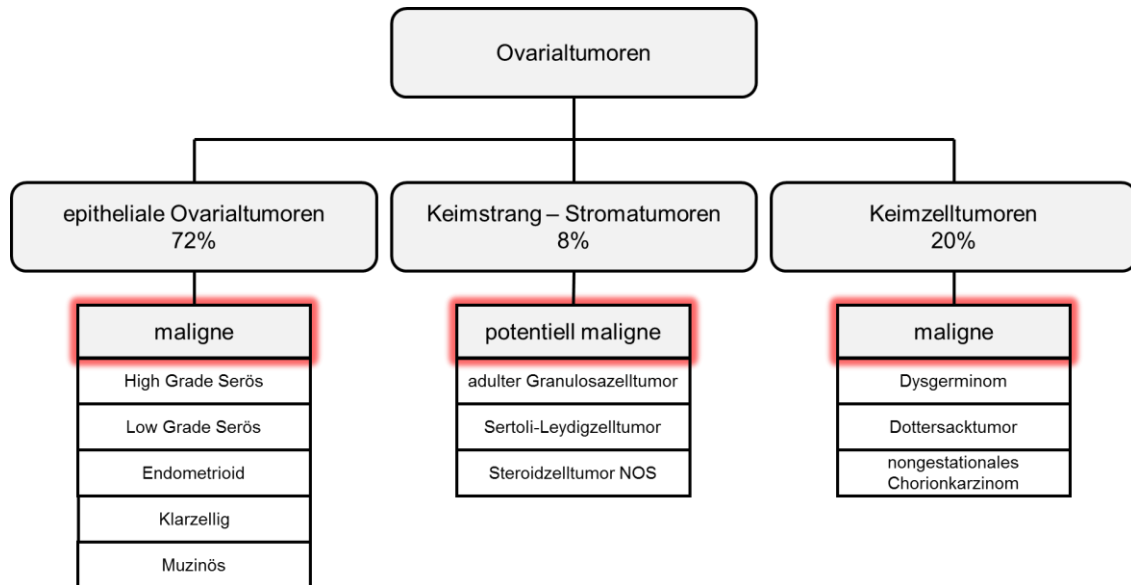


Abbildung 1: Unterformen der Ovarialtumoren
 (Quelle: in Anlehnung an Kurman, Ellenson et al. 2011 [3] und Peres, Cushing-Haugen et al. 2018 [4])

Die hier vorgelegte Dissertation beschäftigt sich mit den Sertoli – Leydigzelltumoren (SLCT), die zu der Gruppe der Keimstrang – Stromatumoren gehören und weniger als 0,5% aller Ovarialtumore ausmachen [5]. Gemäß der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) handelt es sich dabei um Tumoren, die aus Sertolizellen und Leydigzellen unterschiedlicher Differenzierung bestehen [6]. Diese beiden Zelltypen sind Bestandteil des männlichen Hodengewebes. Die Sertolizellen bilden das Epithel der Samenkanälchen und sind neben der Ernährung der Spermien für die Produktion verschiedener Proteine wie Inhibin und Anti – Müller – Hormon zuständig [7]. Die Leydigzellen dagegen finden sich im Hodenstroma wieder und bilden Androgene, welche unter anderem für die Spermatogenese und die Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale benötigt werden [7]. Es wird vermutet, dass diese beiden primär nicht bei der Frau vorkommenden Zelltypen sich über verschiedene, bislang noch nicht gut erforschte Pathomechanismen aus den ovariellen Granulosa – und Thekazellen entwickeln [8]. Betroffen von dieser seltenen Tumorentität sind vor allem junge Patientinnen, welche im Durchschnitt 25 Jahre alt sind [5]. Laut einer Studie von Gui et al. mit 40 weiblichen Probanden, die an einem SLCT litten, sind 62,5% der Patientinnen unter 30 Jahre alt, während knapp 28% sich bereits in der Postmenopause befinden [9].

Die Tumore sind in der Regel auf ein Ovar begrenzt. 70% der Tumore werden im FIGO Stadium I A entdeckt, bei 30% war der Tumor bei Diagnosestellung bereits rupturiert (FIGO Stadium I C) [9]. Histologisch lassen sich die SLCT in gut, intermediär und gering differenzierte Tumoren einteilen. Während Roth et al. in seiner Analyse aus dem Jahre 1981 von 34 SLCTs 8 (24%) als gut, 15 Fälle (44%) als intermediär und 11 (32%) als gering differenziert klassifizierte [10], findet sich in einer Auswertung von Gui et al. 2012 folgende Aufteilung: 10% gut, 35% intermediär und 50% gering differenziert. Weitere 5% blieben undefiniert [9]. Gut differenzierte SLCT sind als benigne einzustufen, während bei schlechterer Differenzierung durchaus ein malignes Potenzial vorliegen kann [6]. Die SLCT Grad I zeichnen sich durch tubuläre Strukturen, welche dem Gewebe des Hodens ähneln, aus. Diese bestehen aus Tubuli mit zum Teil steroidsekretierenden Epithelzellen, eingebettet in ein Stroma aus fibrösem Bindegewebe [11]. Kernatypien und Mitosefiguren sind selten. Auffällig ist, dass die gut differenzierten Tumoren im Durchschnitt eine Dekade später auftreten [5], während mit fortschreitender Entdifferenzierung das Erkrankungsalter der Patientinnen sinkt [10]. Tumore mit geringer Differenzierung sind schwieriger abzugrenzen, die Übergänge zwischen intermediär und gering differenzierten SLCT sind fließend. Im erstgenannten Fall zeigen sich mikroskopisch unreife Sertolizellen mit kleinen und bizarr geformten Kernen. In gering differenzierten Tumoren findet sich eine noch stärker ausgeprägte Unreife der Zellen. Bei diesen beiden Differenzierungsgraden kann es zudem zur Ausbildung histologischer Sonderformen kommen. In 5% der Tumoren treten heterologe Elemente auf [9], die sowohl neuroendokriner als auch mesenchymaler oder epithelialer Natur sein können [11]. In 7,5% kommen zudem retiforme Komponenten bei diesen Differenzierungsgraden vor [9]. Namensgebend für diese histologische Struktur ist die Ähnlichkeit zu dem Rete testis im Hoden.

Die Tatsache, dass die SLCT histologisch in einem gewissen Grad dem Hoden entsprechen, spiegelt sich auch in der klinischen Präsentation der Tumoren wider, sodass für die Patientinnen der mit der Erkrankung verbundene Leidensdruck oft besonders hoch ist. In 30 bis 60% fallen die SLCT durch ihre paraendokrine Androgenproduktion auf [9, 12]. So kann es laborchemisch zur Erhö-

hung der Testosteron – und Androstendionwerte im Blut kommen. In einigen Fällen wurden auch erhöhte AFP – Werte festgestellt, die in ihrem Ausmaß allerdings selten dieselbe Höhe wie bei Dottersacktumoren erreichen [5].

Die klinische Beschwerdesymptomatik der Patientinnen ist sehr variabel. Knapp zwei Drittel der Patientinnen stellen sich mit Zeichen der Virilisierung vor [9]. Dazu zählen Oligomenorrhoe bis Amenorrhoe sowie Verlust sekundärer Geschlechtsmerkmale wie zum Beispiel Abnahme des Brustvolumens, Akne, Hirsutismus, Haarverlust, Entwicklung einer tieferen Stimme und Klitoromegalie. In einigen Fällen kann es zu einer Erythrozytose durch die Androgensekretion des Tumors kommen [5]. Die Patientinnen mit diesen Symptomen sind im Durchschnitt 25 Jahre alt [9]. Die Virilisierung ist seltener in Tumoren zu finden, welche histologische Zusatzmerkmale wie heterologe oder retiforme Elemente aufweisen [5], aber ist meist Kennzeichen von SLCT intermediärer oder geringer Differenzierung [10]. Weitere 15% der Patientinnen stellen sich mit einem klinischen Hyperöstrogenismus vor, der sich meist in Menstruationsabnormalitäten äußert. Charakteristischerweise sind diese Patientinnen im Durchschnitt älter (60 Jahre) [9] und die Tumore eher gut differenziert [5]. Knapp 22,5% zeigen allerdings keine endokrinen Manifestationen, sondern klagen über Zunahme des Abdomenumfangs und abdominelle Schmerzen [9]. Bei diesen Patientinnen liegt der Altersdurchschnitt bei 33 Jahren. Auffällig ist, dass deren Tumore meist einen größeren Durchmesser (>10cm) haben, eher gering differenziert sind und öfter rupturieren [9].

Aufgrund der recht spezifischen und oft belastenden Symptomatik kommt es in der Regel zu einer zeitnahen Diagnostik und damit einhergehend zu einer frühen Einleitung der Therapie. Für eine leitliniengerechte Behandlung sollte bei einem SLCT eine Tumorentfernung durch eine Salpingo - Oophorektomie angestrebt werden. Das weitere Vorgehen orientiert sich am Alter der Betroffenen. Bei jungen prämenopausalen Patientinnen sollte die unilaterale Salpingo – Oophorektomie im Sinne eines Fertilitätserhalts durchgeführt werden. Dagegen wird bei postmenopausalen Patientinnen sowie bei SLCT mit malignem Potenzial die operative Therapie durch eine Hysterektomie und einer bilateralen Sal-

pingo - Oophorektomie ergänzt. Bei geringeren Differenzierungsgraden wird gegebenenfalls noch eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Der Nutzen dieser wird aber aktuell noch kontrovers diskutiert [13].

Allgemein lässt sich feststellen, dass SLCT eine günstige Prognose aufweisen. Bei Gui et al kam es in 2 von 40 Fällen zu einem Rezidiv, welches erfolgreich therapiert werden konnte, sodass zum Zeitpunkt des Follow – up alle Frauen tumorfrei waren. Keine Patientin ist in dieser Studie an ihrem Tumor verstorben [9]. Eine retiforme Komponente scheint allerdings prognostisch ungünstiger zu sein, denn bei einer Analyse von Talerman wurde festgestellt, dass von neun Patienten mit retiformen SLCT drei an diesem verstarben [14].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass diese Tumorentität gut therapiert werden kann und eine für die Patientin in der Regel gute Prognose aufweist. Trotzdem stellen die SLCT im klinischen Alltag eine besondere Herausforderung dar. Einerseits handelt es sich um sehr seltene Vertreter der Ovarialtumoren, die unter anderem wegen ihrer geringen Häufigkeit oft schwierig zu diagnostizieren sind. Hinzu kommt, dass bislang keine spezifischen Marker bekannt sind, die zur Diagnostik genutzt werden können wie beispielsweise Foxl2 bei den adulten Granulosazelltumoren [15]. Die Diagnostik erfolgt bislang vor allem über die Zuordnung zu den Keimstrang – Stromatumoren über die Immunhistochemie, da diese im Gegensatz zu epithelialen Ovarialtumoren keine Expression von EMA zeigen, aber dagegen positiv für Inhibin und Calretinin sind [16]. Zum besseren Verständnis und einer einfacheren Diagnosestellung wäre es hilfreich, spezifische Mutationen der SLCT zu identifizieren. Als möglicher Ausgangspunkt für weitere Forschung scheint das gehäufte Auftreten von SLCT im Zuge des Dicer1 – Tumorsyndroms in Frage zu kommen. Eine Dicer1 – Mutation wurde erstmals 2009 bei dem familiären pleuropulmonalen Blastom beschrieben [17] und konnte im Verlauf bei weiteren seltenen pädiatrischen Tumoren festgestellt werden, wie zum Beispiel beim zystischen Nephrom [18], bei multinodulären Strumen [19] und eben auch bei SLCT [20]. In den betroffenen Familien wird die Mutation autosomal – dominant weitergegeben und die Be-

troffenen haben ein erhöhtes Risiko für eine Vielzahl an Tumoren, die bereits im Kindes- und jungen Erwachsenenalter auftreten können [21].

1.2 Dicer1 – Mutationen bei SLCT

Lange Zeit war keine spezifische Mutation für die SLCT bekannt, erst im Zuge der Erforschung des oben erwähnten Dicer1 – assoziierten Tumorsyndroms wurde die Korrelation von Dicer1 – Mutationen und SLCT festgestellt [20]. Dicer1 ist ein Enzym der Ribonuklease III – Familie [22]. Es besteht aus mehreren Domänen, unter anderem einer Helicase [23], der Protein – Domäne PAZ zur Bindung des 2nt – Überhangs der Ribonukleinsäure [24] und zwei RNase III Nuklease Domänen [23]: einer RNase IIIa zur Prozessierung des 3p – Armes der RNA und einer RNase IIIb zur Prozessierung des 5p – Armes der RNA [25]. Dicer1 spielt eine wichtige Rolle bei der RNA – Bildung, unter anderem bei der Reifung der microRNA. Wie in Abbildung 2 gezeigt schneidet Dicer1 aus der pre – miRNA einen miRNA/miRNA* – Duplex durch Abtrennen der terminalen Basenpaare sowie der Schleifenstruktur. Dieser Duplex wird durch die Helicase aufgetrennt, sodass zwei unterschiedliche miRNA – Stränge als Endprodukt des Reifungsprozesses entstehen [26].

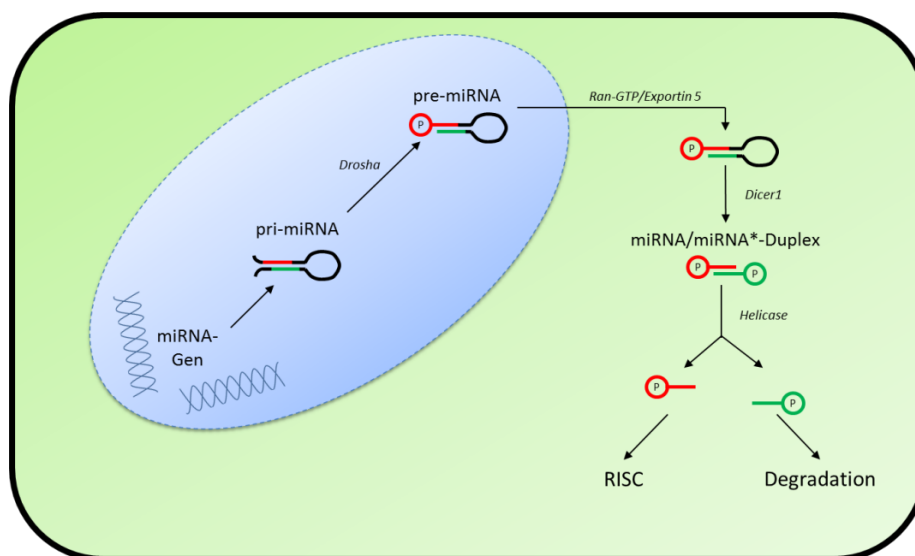


Abbildung 2: Bildung der miRNA
(Quelle: eigene Darstellung)

Der miRNA – Strang mit dem instabileren 5' – Ende wird in den RNA – induced silencing complex (RISC) aufgenommen, der andere Strang wird meist abgebaut [26]. Dieser Komplex wirkt über verschiedene posttranslationale Mechanismen hemmend auf die Genexpression in Abhängigkeit von der Komplementarität der messengerRNA zur miRNA. Findet sich eine ausgeprägte Komplementarität der mRNA zur miRNA, so wird das Schneiden der mRNA durch RISC eingeleitet. Ist die mRNA nur auf einem kurzen Abschnitt komplementär zur miRNA, so wird die mRNA im RISC gebunden und die Translation dieser mRNA kann nicht erfolgen.

2012 fanden dann Heravi – Moussavi et al. in SLCT heterozygote Hotspot – Mutationen (E1705, D1709, E1788, D1810, E1813) in der RNase IIIb – Domäne von Dicer1 [27]. Es konnte gezeigt werden, dass durch die folgende Veränderung der Metallbindung im katalytischen Zentrum der RNase III im Vergleich zu nicht – mutierten SLCT weniger 5p miRNA gebildet wurde [28]. Daraus ergibt sich bei SLCT mit Dicer1 – Hotspotmutation eine andere mRNA – Expression in den Tumorzellen und folglich ein anderes Zellverhalten [29]. In den Tumorzellen findet eine erhöhte Expression von Genen statt, die für die Regulation von Zellüberleben, Proliferation und Entwicklung eine Rolle spielen. Des Weiteren wird der Transkriptionsfaktor SOX9 vermehrt exprimiert. SOX9 ist maßgeblich verantwortlich für die Entwicklung des Hodens beim Mann und damit bei der Bestimmung des Geschlechtes. Auf der anderen Seite wird das Enzym CYP19A1, das als Aromatase für die Östrogenproduktion wichtig ist, geringer exprimiert.

1.3 Foxl2 – Mutationen bei SLCT

So wie die Dicer1 – Mutation ein Kennzeichen der SLCT zu sein scheint, so gilt die somatische Foxl2 – Mutation bislang als spezifisch für adulte Granulosazelltumore, den häufigsten Vertretern der Keimstrang – Stromatumoren [29, 30, 30]. Nur in vereinzelt Fällen wurde diese Mutation auch bei SLCT dokumentiert [31].

Foxl2 ist ein Mitglied der Familie der forkhead/winged helix Transkriptionsfaktoren [32], das im fetalen Augenlid aber auch in ovariellen Follikel- und Stromazellen exprimiert wird und als frühester Marker der Ovardifferenzierung bei Säugetieren gilt [33]. Foxl2 übt eine Vielzahl an Funktionen in der Zelle aus. Durch die Bindung mit Proteinen wie Smads und Aktivatorprotein AP – 1 an die GnRH receptor activating sequence (GRAS) wird die Transkription des GnRH – Rezeptors aktiviert und somit die Freisetzung der Gonadotropine LH und FSH gefördert [34]. Außerdem hemmt Foxl2 den StAR – Promoter, sodass der Transport von Cholesterol zur inneren Mitochondrienmembran und somit die Steroidogenese gehemmt wird [35]. Zudem hemmt Foxl2 die Proliferation [36] und spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Granulosazellen [37]. Es aktiviert die Transkription von CYP19A1, welche Testosteron in Estradiol umwandelt [38], und hemmt gleichzeitig über TESCO die Expression von SOX9 [39], sodass davon auszugehen ist, dass Foxl2 eine große Bedeutung für den Erhalt des ovariellen Phänotyps hat. Eine weitere Funktion ist die Regulation der Zellproliferation. So findet beispielsweise durch die Überexpression von Foxl2 eine Hochregulation von Apoptoserepressoren statt [40].

Die Foxl2 – C134W(402C→G) – Mutation ist eine somatische Mutation, bei der im Foxl2 – Gen sich an der Position 402 statt einem Cytosin ein Guanin befindet und somit im Protein an der Position 134 die Aminosäure Cystein (C) durch Tryptophan (W) ersetzt wird [30]. Bei Tumoren mit dieser Mutation findet sich neben einer reduzierten proapoptotischen Aktivität [41] auch eine geringere Expression des Tumorsuppressorgens CDKN2A [38]. Gleichzeitig wird im Vergleich zu Foxl2 – Wildtyp – Zellen der Promoter der Aromatase CYP19A1 stärker aktiviert [42]. Abbildung 3 stellt die Auswirkungen der Mutation nochmal zusammenfassend dar.

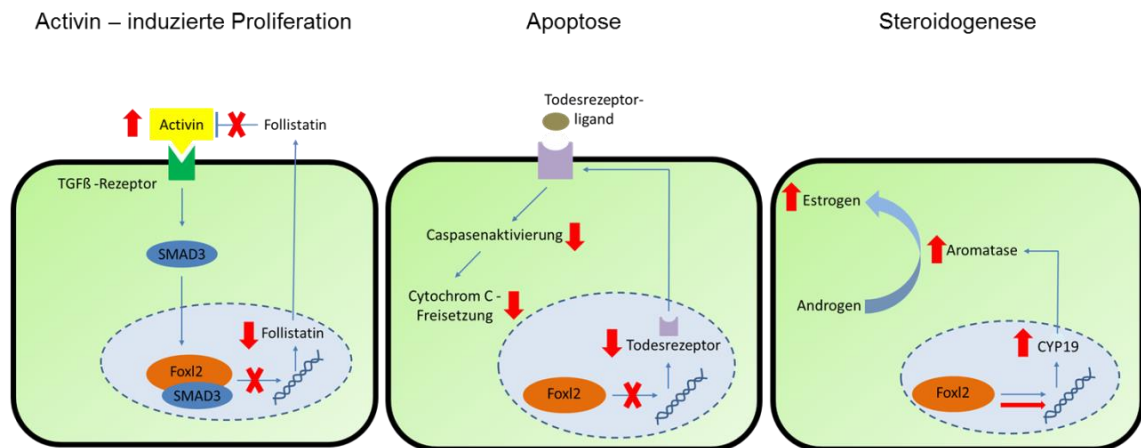


Abbildung 3: Funktionen von Foxl2 – WT im Vergleich zu Foxl2 mit C134W – Mutation (rot)
 (Quelle: eigene Darstellung in Anlehnung an Leung et. al. 2016, S.52 [43])

1.4 Fragestellung

Bei den Sertoli – Leydigzelltumoren handelt es sich um eine seltene Tumorentität, die trotz ihrer relativ guten Prognose aufgrund ihrer Klinik für die Patientinnen häufig einen immensen Leidensdruck bedeutet. Die große Heterogenität der SLCT stellt oft eine diagnostische Herausforderung dar und aktuell sind noch viele Fragen ungeklärt. Dennoch sind in den letzten Jahren einige neue Entdeckungen – vor allem in Bezug auf spezifische Mutationen – gemacht worden. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob mithilfe der oben genannten Erkenntnisse eine genauere Klassifikation möglich ist, um so der vielfältigen Präsentation dieser Tumorentität besser gerecht zu werden.

2. Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Bei der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchung handelt es sich um eine multizentrische Studie. Nach Beratung durch die Ethikkommission der Universität Heidelberg vom 13.10.2016 (S – 159/2016) wurde ein positives Votum erteilt. Patientinnen, bei denen die Erstdiagnose SLCT im Zeitraum von 1995 bis 2016 am SYNLAB MVZ Pathologie in Mannheim, am Vancouver General Hospital oder an der Universitätsfrauenklinik Tübingen gestellt wurde, wurden in das Studienkollektiv eingeschlossen. Weitere Einschlusskriterien waren das Vorliegen von in Paraffin eingebetteten Tumorblöcken (FFPE) für die molekulargenetischen Untersuchungen sowie die Bestätigung der Diagnose in einer unabhängigen spezialisierten histologischen Zweitbegutachtung durch zwei anerkannte Gynäkopathologen (F. Kommos, B. Gilks).

Im Zuge dieser Zweitbegutachtung wurden ebenfalls das Grading, das Auftreten heterologer oder retiformer Elemente sowie weitere histologische Auffälligkeiten festgelegt. Bei den als SLCT bestätigten Tumoren wurden im Anschluss eine Foxl2 – C134W – Mutationstestung sowie zwei unterschiedliche Sequenzierungen zur Detektion von Dicer1 – Mutationen durchgeführt. Komplettierend wurden retrospektiv die klinischen Daten der Fälle aufgearbeitet und das Follow – up erfasst.

2.2 Material

Eine genaue Auflistung der für die Mutationsanalysen verwendeten Materialien findet sich im Anhang.

2.3 Methoden

2.3.1 DNA/RNA - Extraktion

Es standen zu Beginn in Paraffin eingebettete Tumorböcke (FFPE) zur Verfügung, bei denen die Ränder des Tumors nach mikroskopischer Sichtung rot markiert wurden. Aus diesen Arealen wurden im Anschluss Stanzproben entnommen, welche für die Extraktion der RNA als Ausgangsprodukt verwendet wurden. Die RNA - Extraktion wurde mithilfe des miRNeasy FFPE Kit (QIAGEN) vorgenommen. Die Stanzproben wurden mit einer Mikropistille gemörsert, mit 1ml Xylene versetzt und drei Minuten im 50°C warmen Wasserbad inkubiert, um das Paraffin aus den Proben zu entfernen. Im Anschluss wurden die Proben zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (13200/min) zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Im nächsten Schritt wurde den Proben 1ml Ethanol (100%) hinzugegeben, woraufhin diese zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurden. Dadurch wird das restliche Xylene entfernt. Danach erfolgte wiederum die Entfernung des Überstandes. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Zum Trocknen der Proben wurden diese zehn Minuten mit geöffnetem Deckel ohne Temperatureinstellung vakuumzentrifugiert. Um die Lyse der Proben einzuleiten, wurden erst 150µl Puffer PKD und dann Proteinase K zu den Proben pipettiert und anschließend eine Wärmeinkubation bestehend aus 45 Minuten im 56° Heizblock und 15 Minuten im 90° Heizblock durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine dreiminütige Inkubation auf Eis, um die Reaktion zu beenden. Nach einer fünfzehnminütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand in ein 2ml Mikrozentrifugieröhrchen überführt und das übrig gebliebene Pellet, welches für die DNA - Extraktion benötigt wird, im Kühlschrank aufbewahrt. Um die RNA - Extraktion abzuschließen wurde die RNA - Probe weiter gereinigt analog zu dem Protokoll aus dem „RNeasy FFPE Handbuch“ [44]. Die dazu nötigen Schritte sind in Abbildung 4 ersichtlich.

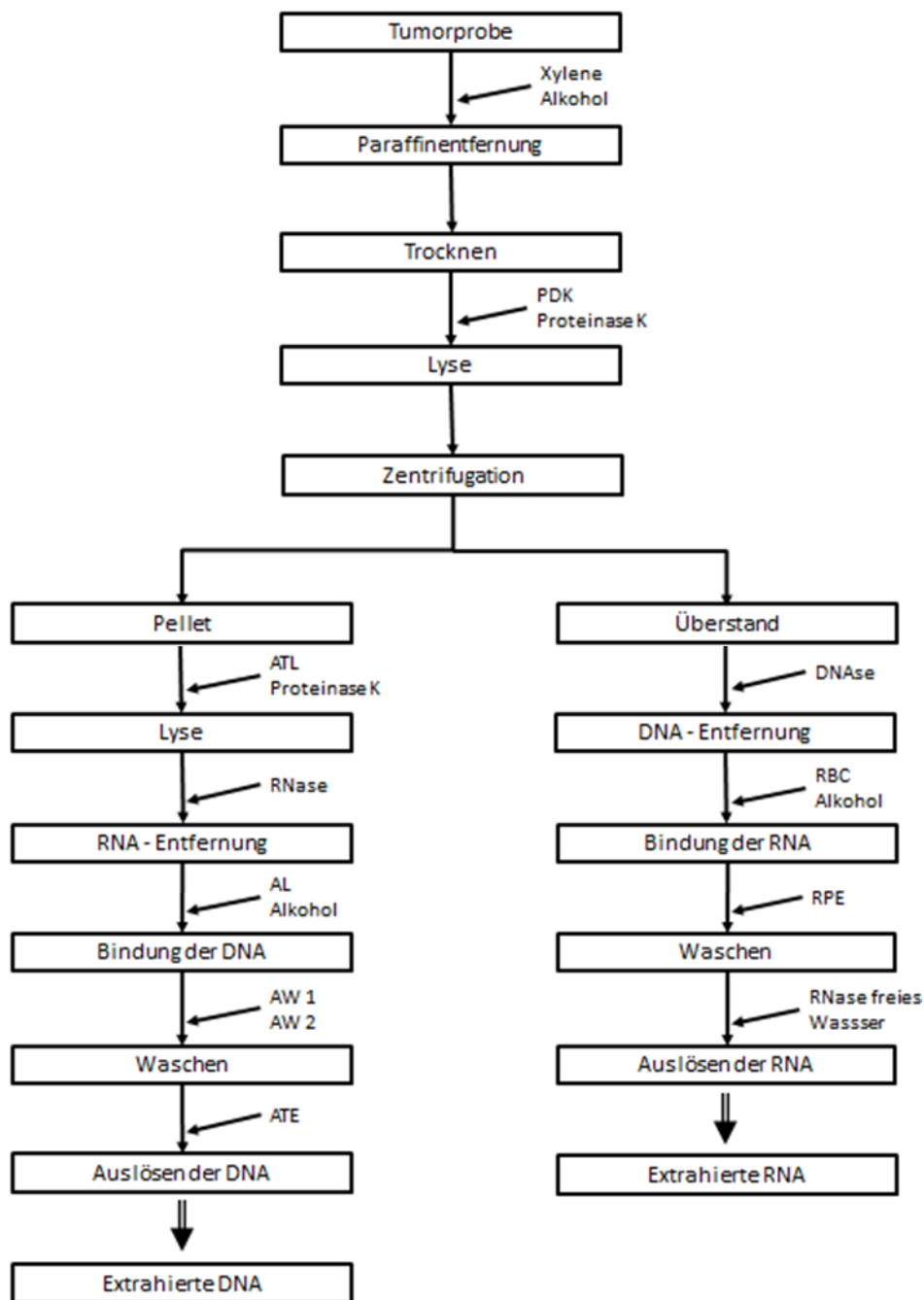


Abbildung 4: Ablauf der DNA – und RNA – Extraktion
 (Quelle: eigene Darstellung in Anlehnung an RNeasy FFPE Handbook S.9 und DNA FFPE Tissue Handbook S.7)

Das bei der RNA – Extraktion entstandene Pellet wurde mithilfe des QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) weiter aufbereitet. Zuerst wurden zu den Proben jeweils 180µl Puffer ATL und 20µl Proteinase K pipettiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 56°C im Heizblock wurden die Proben, sobald sie voll-

ständig lysiert waren, eine Stunde im 90° Heizblock inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Nach einer kurzen Abkühlphase wurde pro Probe je 2µl RNase A zugegeben und diese zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die DNA zu binden, wurde zu jeder Probe 200µl Puffer AL und 200µl 100%iges Ethanol hinzugegeben. Die Lysate wurde nach einer kurzen Zentrifugation in die QIAamp MinElute Röhrchen überführt und eine Minute bei 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Filter wurde anschließend in ein neues 2ml Sammelröhrchen gesetzt, während der Durchfluss entsorgt wurde. Dann wurde den Proben jeweils 500µl Puffer AW1 zugegeben und diese für eine Minute bei 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Filter erneut in ein 2ml Sammelröhrchen gesetzt und der Waschvorgang mit dem Puffer AW2 wiederholt. Dann wurde der Filter für drei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Nach dem Einsetzen des Filters in ein neues 2ml Sammelröhrchen wurde 20µl Puffer ATE in das Zentrum der Membran pipettiert, die Röhrchen sechs Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend in ein etikettiertes 1,5ml Mikrozentrifugerröhrchen überführt [45].

Um die Quantität der Proben zu überprüfen, erfolgte nach abgeschlossener Extraktion eine Konzentrationsmessung mit dem Qubit® ds DNA BR Assay Kit (Invitrogen™). Dazu wurde ein Mastermix aus dem Qubit® dsDNA BR Buffer und Qubit® dsDNA BR Reagenz wie in Abbildung 5 gezeigt hergestellt. Anschließend wurden je 199µl des Mastermixes und 1µl der DNA – Probe und 190µl des Mastermixes und 10µl des Standards 1 beziehungsweise des Standards 2 in einen Qubit Assay Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden dann zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit dem Qubit 2.0 Fluorometer gemessen [46].

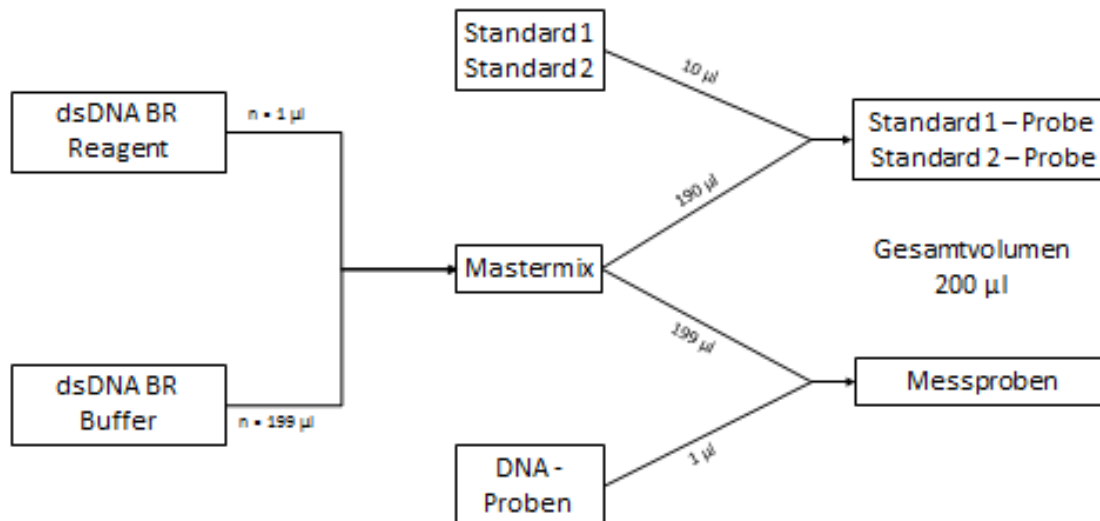


Abbildung 5: Herstellung der Qubit – Proben
(Quelle: eigene Darstellung)

2.3.2 Foxl2 – Testung

Für die Foxl2 – Mutationsanalyse wurde ein Allelic Discrimination Assay mit dem 7900 HT Fast Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) System angewendet. Mit dieser Methode ist es möglich, zwei verschiedene Varianten einer bestimmten DNA – Sequenz zu detektieren. Dazu werden zwei fluoreszenzmarkierte Marker verwendet, die jeweils entweder komplementär zur Wildtyp – Sequenz (Allel 1) oder zur Sequenz der beschriebenen C134W – Mutation (Allel 2) sind. Nach erfolgter Anlagerung passender Sequenzen, die in Abbildung 6 bildlich dargestellt ist, verknüpft die Polymerase diese unter Abspaltung des Farbstoffes, der daraufhin zu fluoreszieren beginnt. Je nach Art der Fluoreszenz kann somit eine Klassifikation in homozygot (nur Allel 1 oder 2) und heterozygot (Allel 1 und 2) erfolgen.

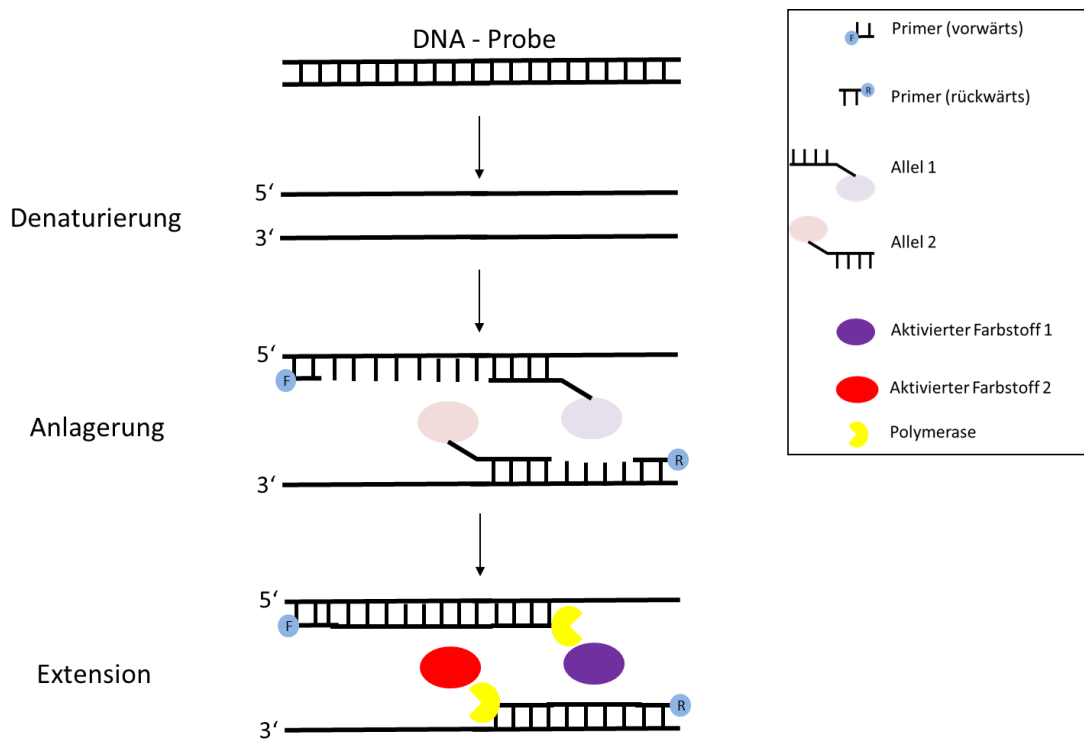


Abbildung 6: Ablauf der Realtime PCR
(Quelle: eigene Darstellung)

Als Erstes wurden die DNA – Proben von der davor durchgeführten Extraktion auf die für die Testung benötigte Konzentration von 20ng/µl verdünnt. Ein Mindestgesamtvolumen von 10µl wurde für diese Analyse benötigt. Für die PCR – Reaktion wurden folgende Primer verwendet: 5'–GCGCAAGGGCAACTACTG–3' (vorwärts) und 5'–CGGTAGTTGCCCTTCTCGAA–3' (rückwärts). Als Marker dienten die Wildtypsequenz 5'–FAM dye–CATGTCTTCCCAGGCCG–NFQ und die Mutationssequenz 5'–VIC dye–CATGTCTTCGCAGGCCG–NFQ. Die Negativkontrolle war destilliertes Wasser und die Positivkontrolle die DNA eines Foxl2 – mutierten adulten Granulosazelltumors. In die PCR – Platte wurde pro Vertiefung ein Reaktionsvolumen von 5µl folgender Zusammensetzung pipettiert: 2,5µl TaqMan Genotyping Mastermix, 0,125µl Foxl2 TaqMan Assay Mix, 1,375µl destilliertes Wasser und 1µl der DNA – Probe bzw. der Positiv – oder Negativkontrolle. Die Reaktion erfolgte in der PCR – Maschine QuantStudio 6 Flex bestehend aus einem Pre – Read – Run zur Feststellung der Grundfluoreszenz, der eigentlichen Amplifikation und einem Post – Read – Run, bei dem

die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert wird. Die Amplifikation bestand aus folgendem Ablauf: 10min Aktivierung der Taq – Polymerase bei 95°C und 40 PCR – Zyklen (15s Denaturierung bei 95°C und 1min Anlagerung/Polymerisierung bei 60°C). Die Auswertung erfolgte wie in Abbildung 7 gezeigt grafisch.

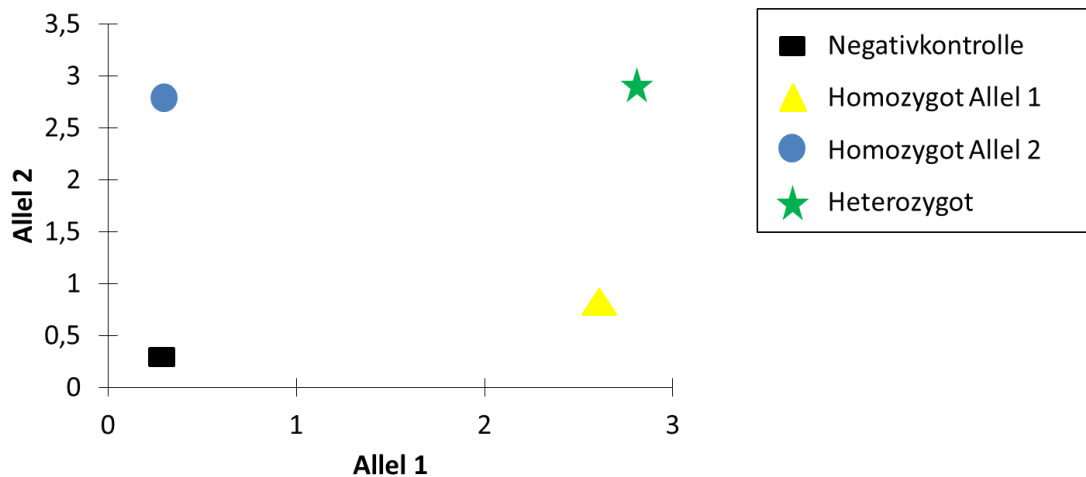


Abbildung 7: Auswertung des Allelic discrimination assays
(Quelle: in Anlehnung an Applied Biosystems Realtime PCR Getting Started Guide, S.64 [47])

Lag für die Probe sowohl ein mutiertes als auch ein Wildtyp – Allel vor, so fand sich das Ergebnis in der rechten oberen Ecke des Diagramms wieder.

2.3.3 Dicer1 – Sequenzierung nach Sanger

Zur Vorbereitung der Proben für die Genanalyse wurde als Erstes eine 50ng/µl – Verdünnung der DNA – Proben hergestellt. Im zweiten Schritt erfolgte die Vervielfältigung der RNase IIIb – Region mit M13 markierten Primer – Sets durch eine PCR sowie anschließend eine Erfolgskontrolle durch eine Gelelektrophorese. Nach erfolgreicher Vervielfältigung aller Proben wurde jede Probe mit 4µl Exosap versetzt, um überschüssige Primer und Nukleotide zu entfernen. Anschließend erfolgte die Quantitätskontrolle in Form einer Konzentrationsmessung mit dem Qubit – Fluorometer. Dann wurden die Proben, falls erforderlich,

auf eine Zielkonzentration von 3ng/µl bei einem minimalen Zielvolumen von 10µl verdünnt und in die Vertiefungen der Sequenzierungsplatte gegeben.

Die Sequenzierung erfolgte extern durch Source BioScience mit dem ABI BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit. Bei der Sequenzierung nach Sanger werden neben den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch Didesoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTP) verwendet, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Polymerisation führen, da diese die Bindung weiterer dNTPs verhindern. Aus diesem Grund entstehen bei der Sequenzierung DNA – Sequenzen unterschiedlicher Länge, welche in Abbildung 8 anhand einer Beispielsequenz exemplarisch dargestellt worden sind.

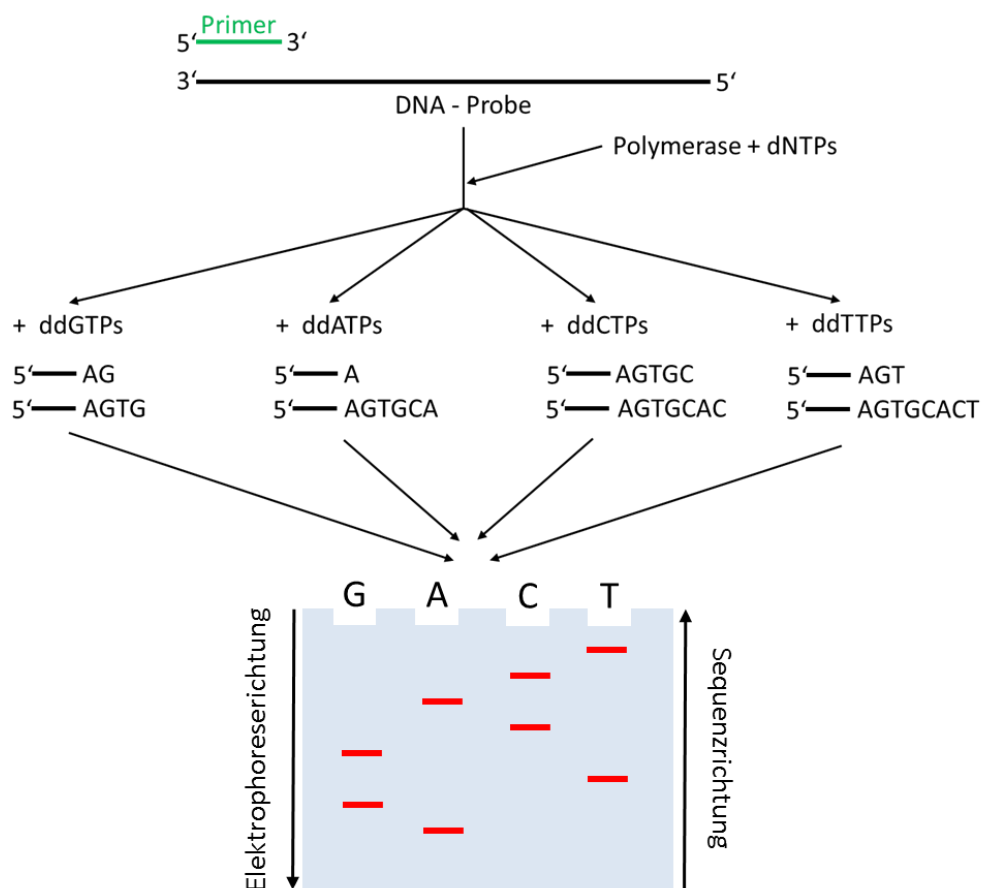


Abbildung 8: Prinzip der Sequenzierung nach Sanger
(Quelle: eigene Darstellung)

Die Auswertung erfolgte in diesem Fall mit dem ABI Prism 3130x Genetic Analyzer. Nach der Sequenzierung wurde eine kapilläre Elektrophorese durchgeführt, bei der sich kurz vor der positiven Elektrode ein Laser befindet. Durch diesen wurden die verschiedenen Fluoreszenzspektren der markierten ddNTPs ausgelöst und im Anschluss detektiert.

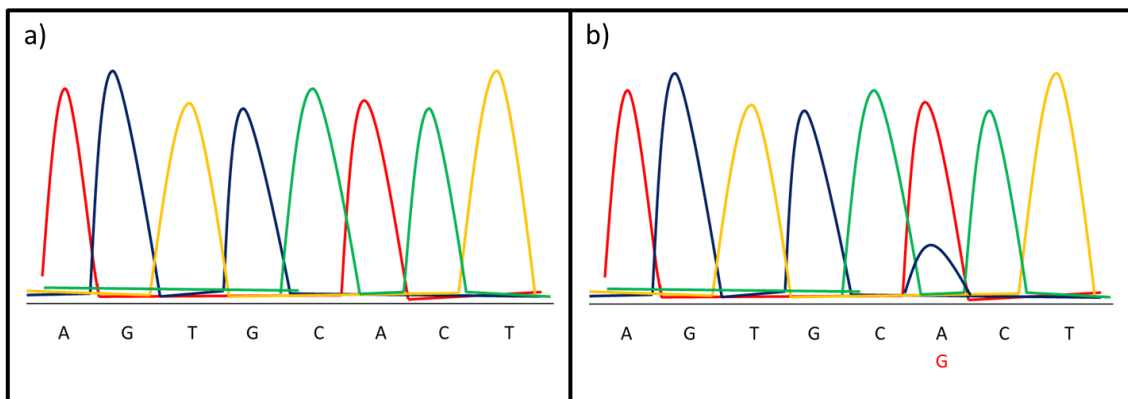


Abbildung 9: Auswertung der Sanger – Sequenzierung bei Vorliegen des Wildtyps (a) oder einer Mutation (b)
(Quelle: eigene Darstellung)

Abbildung 9 a) zeigt die Auswertung der in Abbildung 8 bereits beschriebenen Sequenz. Bei Vorliegen einer Mutation würde es wie in Abbildung 9 b) gezeigt zu einer zweiten Fluoreszenzspitze kommen.

2.3.4 Dicer1 – MiSeq Sequenzierung

Zur Validierung der Ergebnisse der Sanger – Sequenzierung wurde zusätzlich eine Next Generation Sequenzierung durchgeführt. Hier wurde das MiSeq System von Illumina verwendet. Die Hotspotregionen der RNase IIIb – Region von Dicer wurden via PCR vervielfältigt. Anschließend wurden die Proben gepoolt, verdünnt und mit einem Barcode versehen. Insgesamt wurden auf diese Weise zwei Bibliotheken erstellt, um dann zusammengemischt, mit Agencourt AMPure

XP gereinigt und auf 8pM verdünnt zu werden. Danach wurde das Illumina MiSeq Reagent Kit V2 (300 – cycle) beladen.

Bei der MiSeq Sequenzierung wird initial eine Brückenvervielfältigung durchgeführt, die eine parallele und damit schnellere Vervielfältigung ermöglicht. Anschließend findet durch die Zugabe von vier verschiedenen Nukleotiden die Polymerisation statt. Die überschüssigen Nukleotide werden daraufhin herausgewaschen und die Fluoreszenzen detektiert. Final werden die Fluoreszenzmarker sowie die terminalen Gruppen abgeschnitten und durch erneutes Waschen entfernt. Diese Schritte werden wiederholt, bis die Sequenzierung beendet ist.

2.3.5 Erhebung klinischer Daten

Es erfolgte die retrospektive Aktenrecherche der klinischen Daten anhand eines Fragenkataloges. Mit diesem wurden, wie im Anhang dieser Dissertation ersichtlich, unter anderem Informationen über den Krankheitsverlauf, die Symptome und Therapie bei der Erstdiagnose sowie das Auftreten eines Rezidivs erhoben.

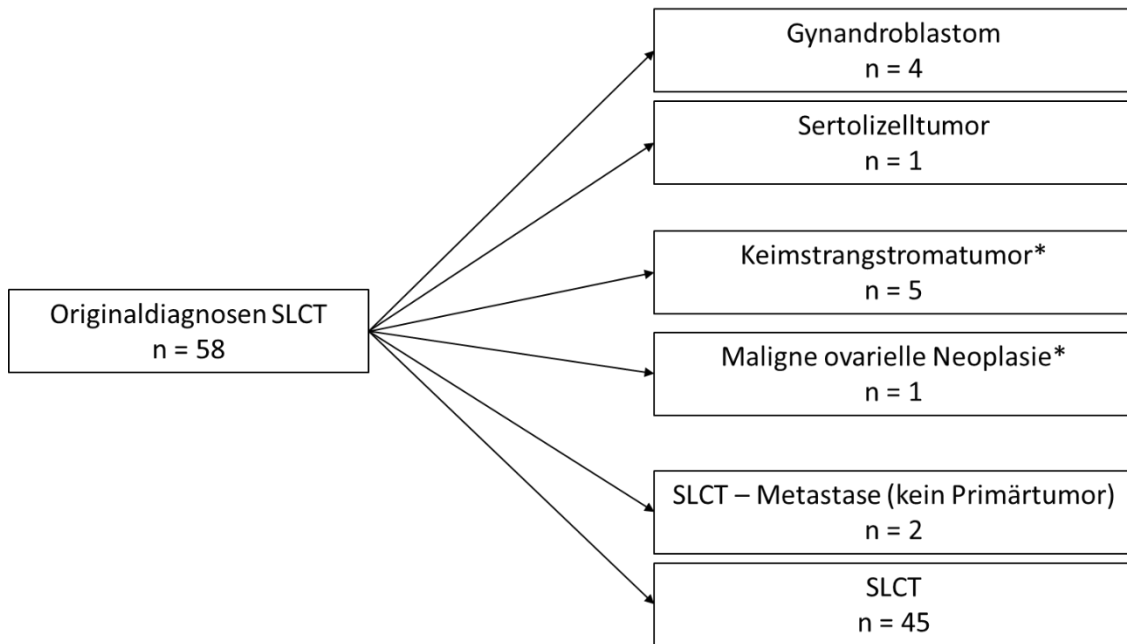
2.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm SPSS IBM 24 sowie JMP 13 und unter Verwendung des Chi – Quadrat – Tests durchgeführt. Die Diagramme wurden mit JMP 13 und Excel erstellt, während die restlichen Abbildungen und Tabellen mithilfe von PowerPoint beziehungsweise Excel angefertigt wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeine Beschreibung der Kohorte

Nach einer ersten Recherche wurden initial 58 Fälle mit der Originaldiagnose „Sertoli – Leydigzelltumoren“ in die Studie aufgenommen, welche durch die drei folgenden Zentren bereitgestellt wurden. 45 Fälle (2005 – 2015) wurden durch die Konsultätigkeit von Prof. Dr. med. Kommos (SYNLAB MVZ Pathologie Mannheim) zur Verfügung gestellt. Zehn weitere Fälle stammten aus dem Vancouver General Hospital (1995 – 2016). Drei Fälle wurden in der Universitätsfrauenklinik Tübingen (2001 – 2016) identifiziert. In allen Fällen erfolgte als Erstes eine spezialisierte Zweitbegutachtung durch zwei erfahrene Gynäkopathologen. Wie in Abbildung 10 gezeigt stimmten diese in 45 Fällen der Originaldiagnose zu, sodass nach der Zweitbegutachtung 13 Fälle ausgeschlossen wurden. In vier Fällen lautete die korrigierte Diagnose Gynandroblastom, in einem weiteren Fall Sertolizelltumor. Des Weiteren handelte es sich bei zwei Fällen um Metastasen, bei denen die Originalschnitte des Primärtumors nicht zur Verfügung standen. Fünf Fälle wurden als nicht genauer klassifizierbare Keimstrang – Stromatumoren beurteilt und ein Fall erhielt die Diagnose „nicht genauer spezifizierbare maligne ovarielle Neoplasie“. Die verbliebenen 45 Fälle konnten als reine SLCT eingestuft werden und wurden in die weiteren Analysen eingeschlossen. Davon stammten noch 33 Fälle aus dem MVZ Mannheim, neun Fälle aus dem Vancouver General Hospital und die restlichen drei aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen.



*nicht genauer klassifizierbar

**Abbildung 10: Auswirkung der spezialisierten Zweitbegutachtung auf die Diagnose SLCT
(Quelle: eigene Darstellung)**

Die Patientinnen waren im Median 48 Jahre alt (15 – 90 Jahre). Aus der Abbildung 11 erschließt sich, dass 14 Patientinnen (31%) jünger als 30 Jahre waren. Davon lag das Alter bei acht Frauen unter 20 Jahren. 49% der Patientinnen waren über 50 Jahre alt und befanden sich somit bereits in der Postmenopause. Von diesen stammten 17 von 22 Fällen aus dem MVZ Mannheim, 2 aus der Frauenklinik Tübingen und 3 aus der Klinik in Vancouver.

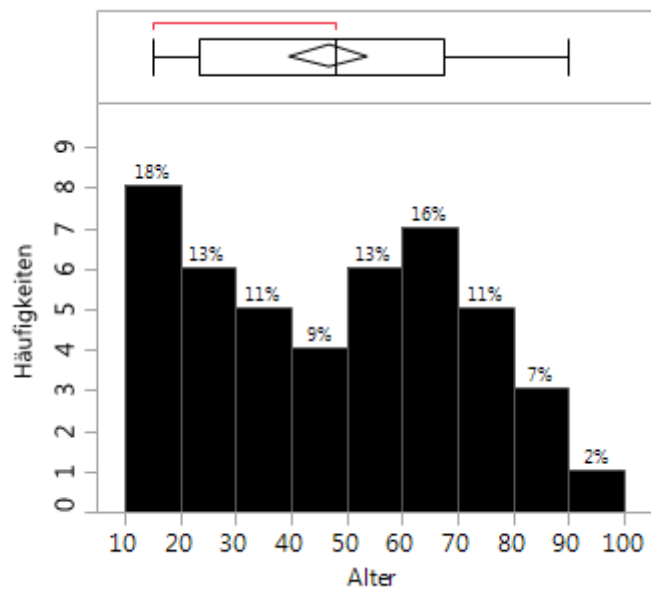


Abbildung 11: Altersverteilung
(Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

Histologisch wurden, wie Abbildung 12 zeigt, die Tumoren durch die Pathologen in 5 (11,1%) gut, 34 (75,6%) intermediär und 6 (13,3%) gering differenzierte SLCT eingeteilt.

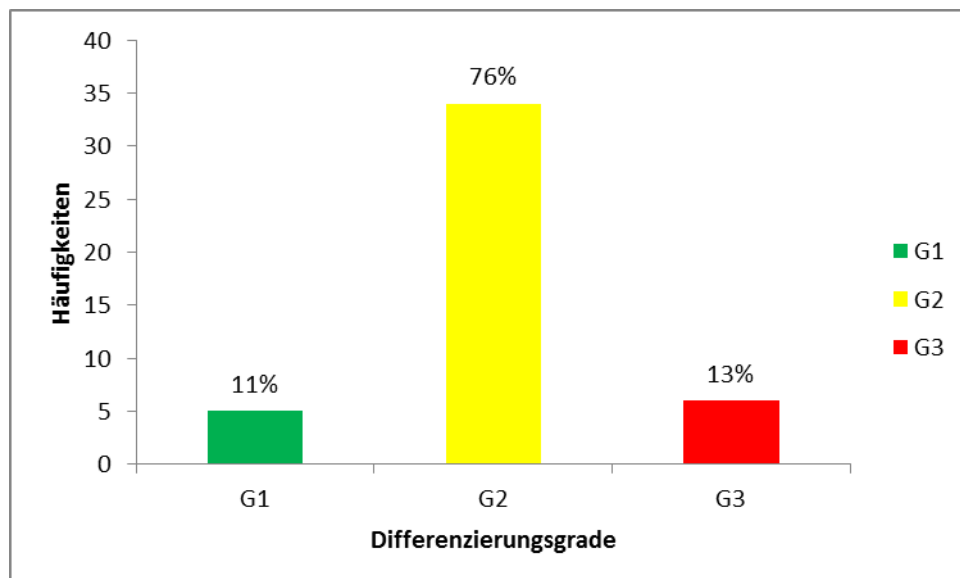


Abbildung 12: Verteilung der Differenzierungsgrade
(Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

Die gut differenzierten SLCT traten im Alter von 23 bis 69 Jahren ohne besondere Häufung mit einem Median von 44 Jahren auf. Bei den intermediär differenzierten Tumoren zeigte sich eine Altersspanne von 15 bis 90 Jahren. Knapp ein Drittel dieser Patientinnen (12/34) war unter 30 Jahren bei einem Median von 43,5 Jahren, ein weiteres Drittel (15/34) befand sich bereits in der Postmenopause. Dagegen traten die gering differenzierten Tumoren (5/6), wie man in Abbildung 13 sehen kann, gehäuft in der Postmenopause auf ($p = 0,254$). Nur in einem der Fälle handelte es sich um eine 15 – jährige Patientin. Das mediane Alter der Patientinnen mit einem SLCT Grad 3 lag somit bei 61 Jahren.

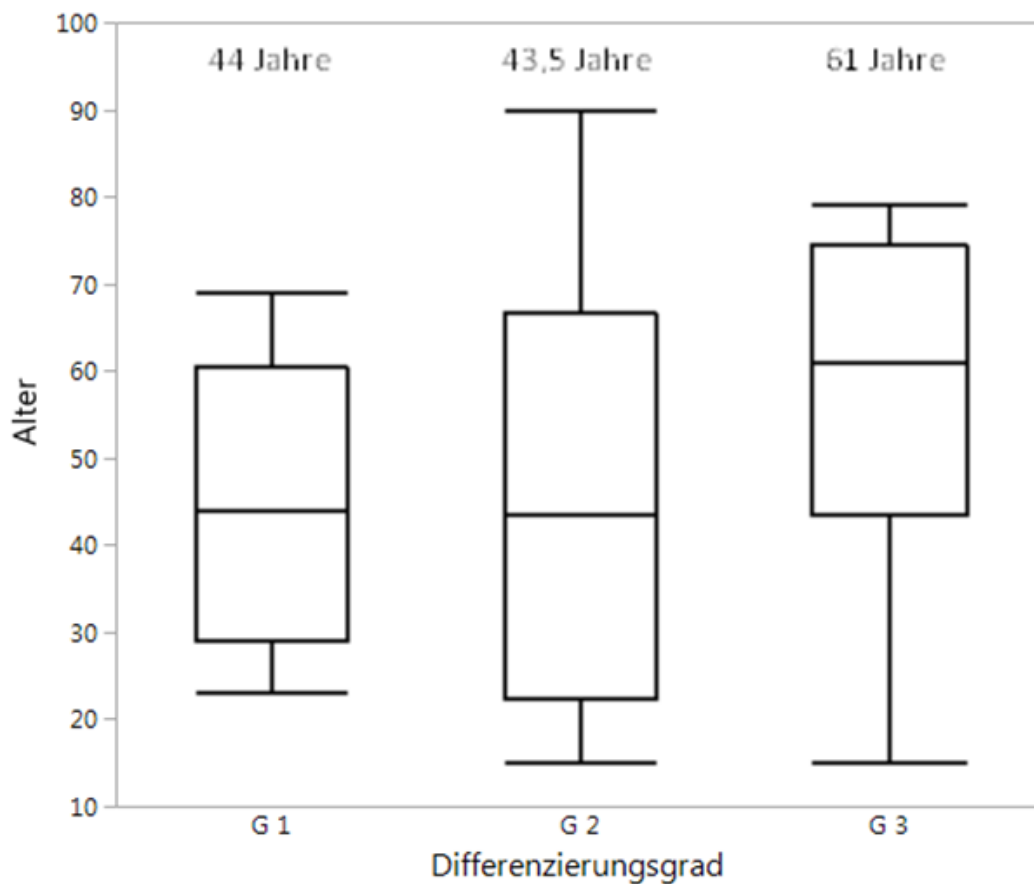


Abbildung 13: Altersverteilung nach Differenzierungsgrad mit Angabe des Medians (Quelle: eigene Darstellung)

Die eingangs erwähnten histologischen Zusatzmerkmale wurden in insgesamt 10 Fällen beschrieben. In 8/45 Fällen (17,8%) fanden sich im Tumor heterologe Elemente. Dabei handelte es sich soweit bekannt um epitheliale heterologe Strukturen, zum Teil waren fokal Becherzellen zu sehen. Diese Tumoren waren

allesamt intermediär differenziert ($p = 0,169$). Die Patientinnen waren zwischen 10 und 49 Jahre alt, davon befanden sich drei Viertel der Frauen noch vor dem 30. Lebensjahr. Zwei weitere SLCT (4,4%) zeigten retiforme Strukturen. Auch diese Fälle waren alle von intermediärer Differenzierung ($p = 1,00$). Die Patientinnen waren 48 und 57 Jahre alt.

In 31/45 Fällen konnten Daten zu präoperativ durchgeführten spezifischen Laboruntersuchungen in Form von Tumormarkern oder Androgenen im Blut erhoben werden. So zeigten sich bei 16/31 Fällen präoperativ auffällige Blutuntersuchungen: bei 14 Patientinnen fand sich eine Androgenerhöhung im Serum, wobei bei vieren auch die Tumormarker erhöht waren. Im Blut von zwei weiteren Betroffenen waren nur die Tumormarker erhöht. Die Erhebung dieser Zahlen ist aus der Abbildung 14 ersichtlich und eine Liste aller Fälle mit einem auffälligen Laborergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt.

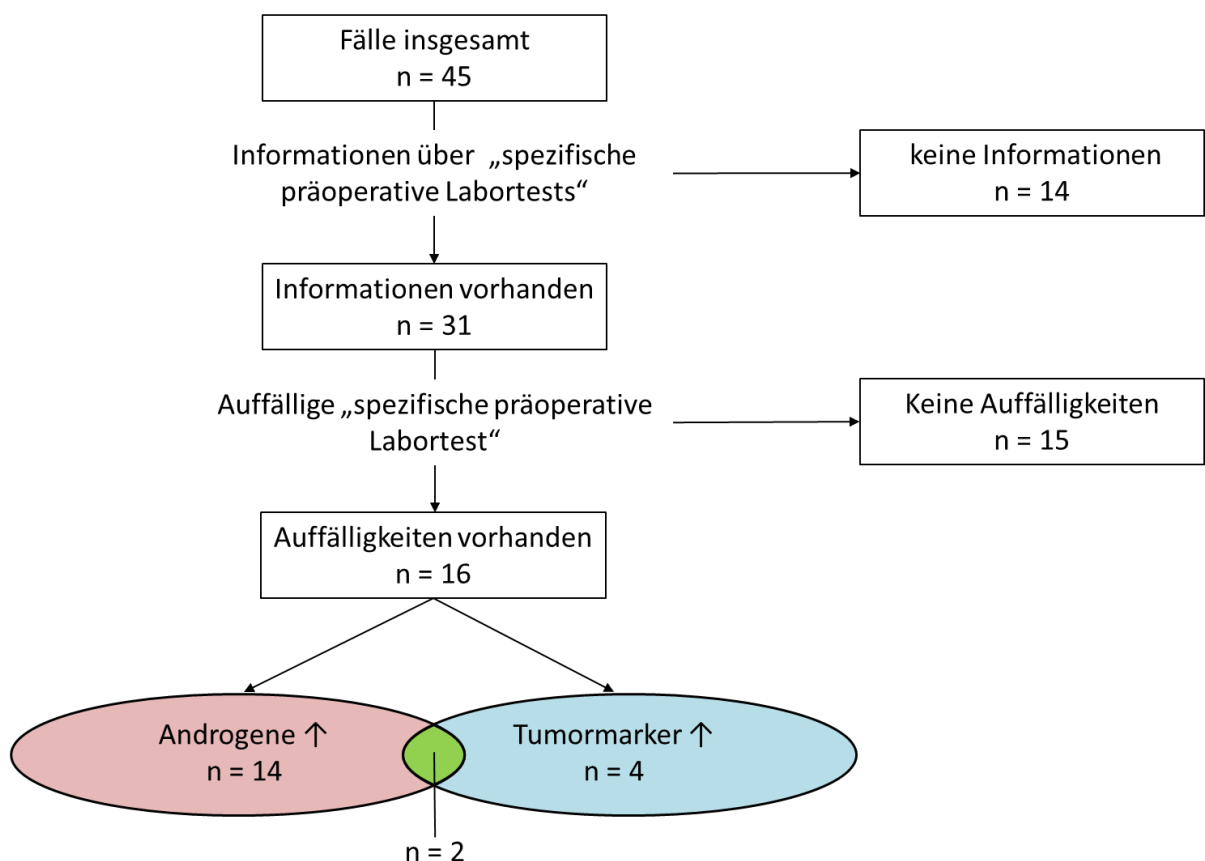


Abbildung 14: Präoperative laborchemische Auffälligkeiten(Quelle: eigene Darstellung)

Tabelle 1: Fälle mit einem auffälligen Laborergebnis präoperativ (Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

ID	Alter [Jahre]	Grading	Androgene erhöht	Tumormarker erhöht	Klinik bei Erstdiagnose
1	15	G 3	ja	unbekannt	androgene Symptome
9	69	G 2	unbekannt	ja	keine
10	23	G 1	ja	unbekannt	androgene Symptome
12	43	G 2	ja	unbekannt	androgene Symptome
18	18	G 2	ja	ja	androgene Symptome
20	17	G 2	ja	ja	androgene Symptome, abdominelle Beschwerden
23	51	G 2	unbekannt	ja	abnormale Blutungen, abdominelle Beschwerden
24	34	G 2	ja	nein	androgene Symptome
31	35	G 2	ja	nein	androgene Symptome
36	17	G 2	ja	ja	androgene Symptome
53	15	G 2	ja	unbekannt	androgene Symptome
54	15	G 2	ja	unbekannt	androgene Symptome
55	35	G 1	ja	unbekannt	androgene Symptome, abnormale Blutungen
56	26	G 2	ja	unbekannt	abnormale Blutungen
58	44	G 1	ja	unbekannt	androgene Symptome
59	61	G 2	ja	ja	androgene Symptome, abdominelle Beschwerden

Von den 16 Patientinnen mit einem auffälligen präoperativen Labortest waren drei postmenopausal, während die restlichen 13 Frauen sich noch in der Menopause befanden. Bei 92,9% der Frauen mit Androgenerhöhung im Serum wurde auch ein klinischer Hyperandrogenismus festgestellt ($p < 0,001$).

Informationen über die Symptome waren, wie man in Abbildung 15 sieht, in 40/45 Fällen verfügbar. 29/40 Patientinnen klagten über Symptome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Bei neun Erkrankten (22,5%) zeigten sich abnormale Blutungen, vor allem als postmenopausale Blutungen aber auch als Oligomenorrhoe. In zwei Fällen traten zusätzlich noch Symptome androgener Art wie Hirsutismus und Akne auf und zwei weitere Patientinnen klagten außerdem über abdominelle Beschwerden. Bei 18 Patientinnen (45%) wurden androgene Symptome diagnostiziert, welche sich in Form von Klitoromegalie ($n=4$), Stimm-

vertiefung (n=6), Hirsutismus (n=8), Akne (n=2), Amenorrhoe (n=10), Infertilität (n=2) aber auch Abnahme des Brustvolumens (n=1) und Libidoverlust (n=1) manifestierten. Zwei dieser 18 Frauen litten zudem unter abdominellen Beschwerden. Im gesamten Kollektiv litten acht Patientinnen unter unspezifischen abdominellen Beschwerden. Diese äußerten sich in einer Zunahme des Abdomenumfangs und/oder Bauchschmerzen, aber bei einigen Betroffenen auch in Form von Aszites, welcher sonografisch oder klinisch diagnostiziert wurde.

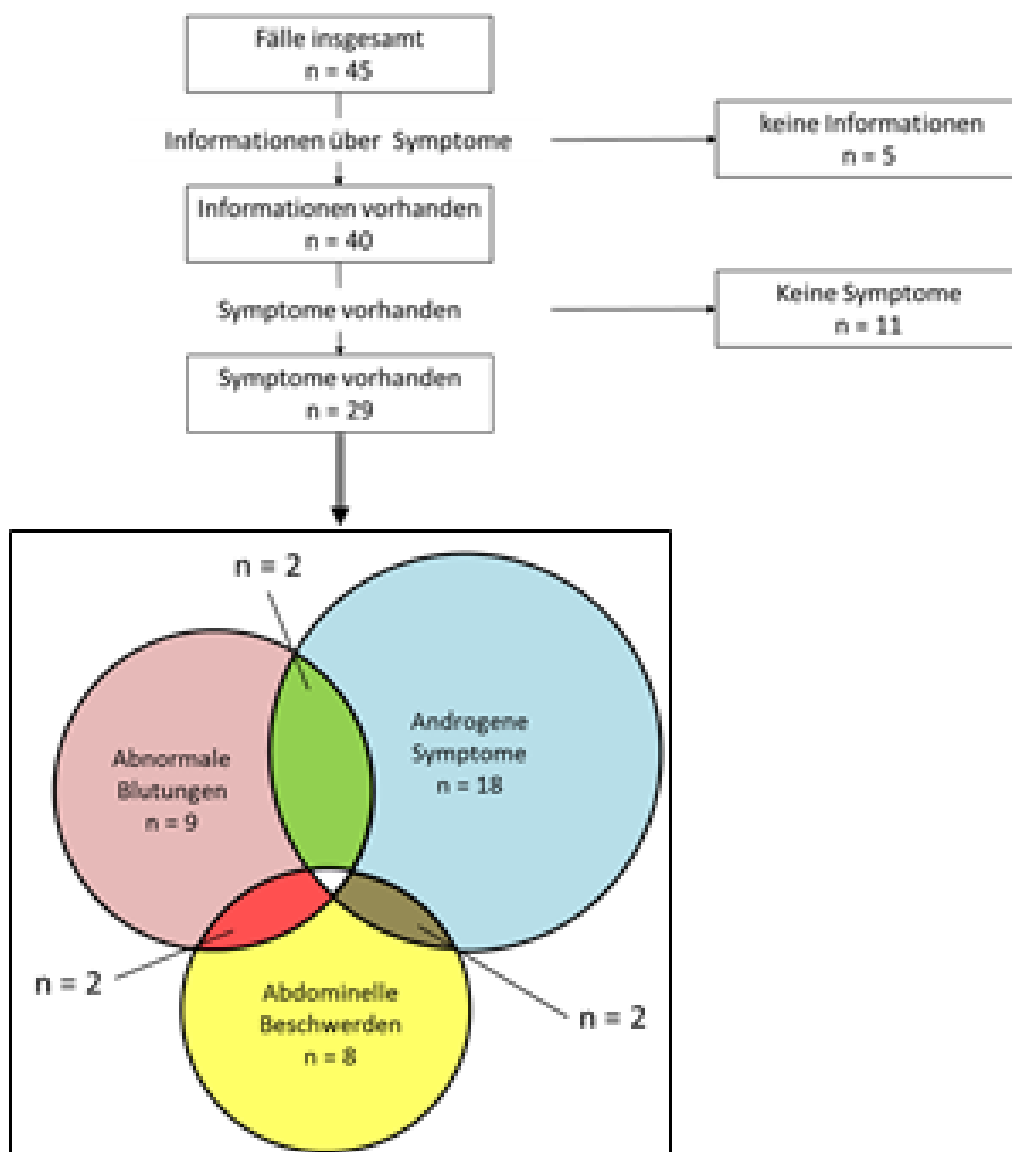


Abbildung 15: Auftreten von Symptomen in der Kohorte (Quelle: eigene Darstellung)

In 43/45 Fällen konnten die behandelnden Kliniken Informationen über die Therapie der Patientin nach Diagnosestellung zur Verfügung stellen. Tabelle 2 zeigt, dass 16 Fälle laparoskopisch behandelt wurden und in 18 Fällen wurde eine Laparotomie durchgeführt. Eine zweizeitige Operation zur Komplettierung erfolgte in 9 Fällen, sechs davon nach initialer Laparoskopie.

Tabelle 2: Verteilung der Operationsverfahren (Quelle: eigene Darstellung)

Operationsverfahren	n (%)	Altersmedian [Jahre]	Zweitzeitige Operation (%)
Laparoskopie	16 (37)	33	6/16 (37,5)
Laparotomie	18 (42)	60,5	3/18 (16,7)
unbekannt	9 (21)	35	-
Gesamt	43 (100)	48	9/43 (20,9)

Hinsichtlich des Operationsausmaßes lässt sich sagen, dass bei 19 Patientinnen eine unilaterale Salpingo – Oophorektomie erfolgte. Von diesen erhielten zwei Patientinnen zusätzlich eine Hysterektomie. In Abbildung 16 ist die Altersverteilung dieser Patientinnen grafisch dargestellt: Von diesen 19 Patientinnen waren 16 jünger als 50 Jahre. Bei 20 weiteren Patientinnen wurde eine bilaterale Salpingo – Oophorektomie durchgeführt. Im Vergleich zu der Gruppe mit einer einseitigen Entfernung des Ovars sah man hier einen größeren Anteil an älteren Patientinnen, so waren 17 von diesen 20 Frauen über 50 Jahre alt. In der Gruppe, die eine BSO erhielten, wurden 14 Patientinnen zusätzlich hysterektomiert. So kann man ebenfalls in der Abbildung 16 sehen, dass eine Hysterektomie vermehrt bei älteren Frauen vorgenommen wurde. Die letzten 4 von 43 Fällen wurden in einem geringeren Umfang operiert. In drei Fällen erfolgte lediglich eine Tumorentfernung unter Erhalt des Ovars. Die Patientinnen waren 35, 50 und 69 Jahre alt. Im vierten Fall ist nur die Durchführung einer Biopsie bei der 21 – Jährigen bekannt, da die weitere Behandlung der Patientin trotz intensiver Bemühungen nicht in Erfahrung gebracht werden konnte.

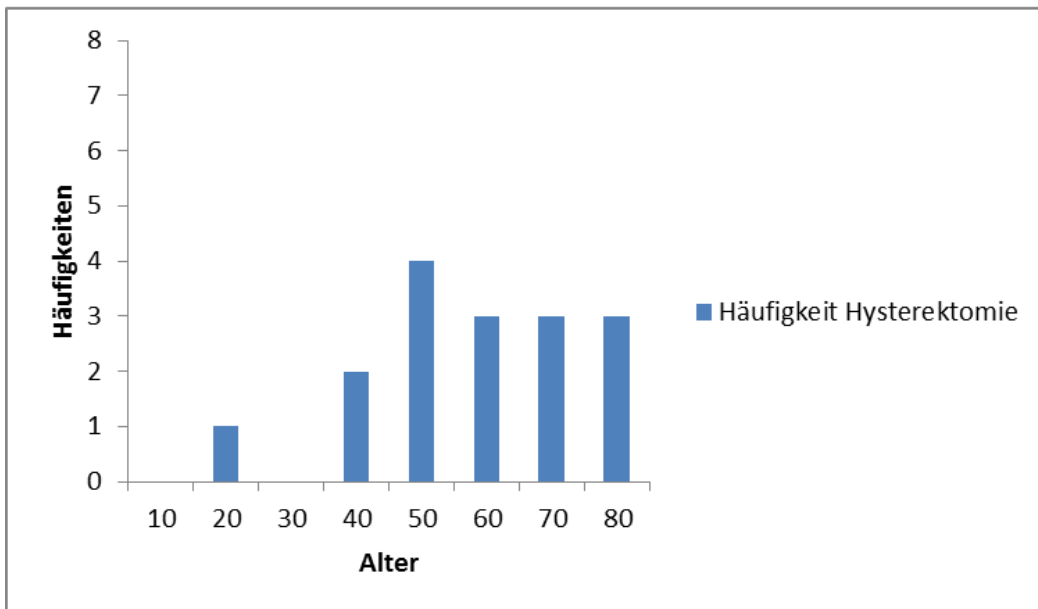
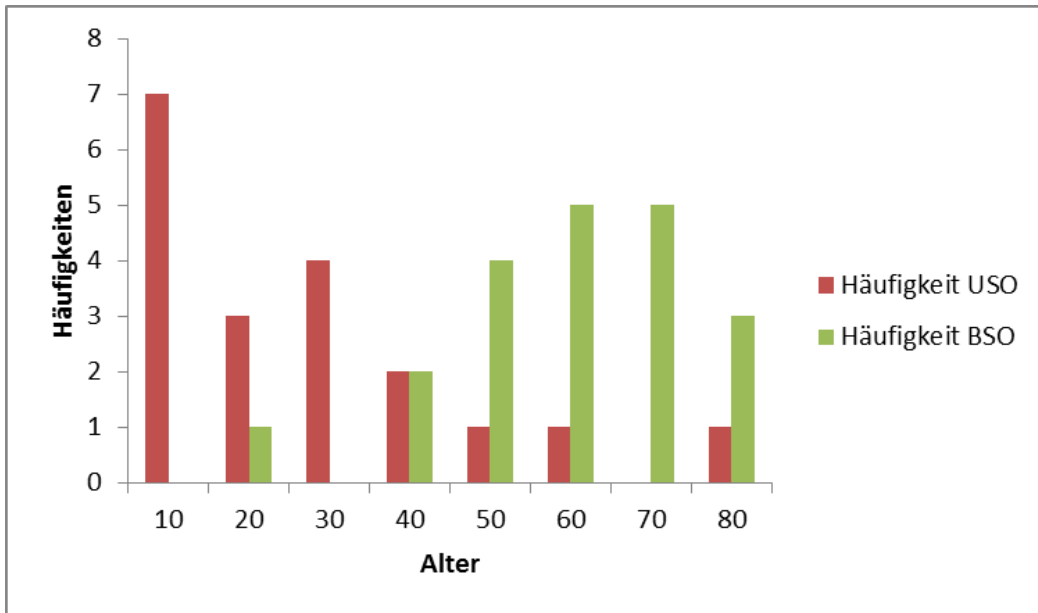


Abbildung 16: Wahl der operativen Therapie in Abhängigkeit vom Alter (Quelle: eigene Darstellung)

Eine adjuvante Therapie erfolgte in vier Fällen: Drei Patientinnen wurden mit einer alleinigen, in der Regel platinhaltigen Chemotherapie behandelt. Eine weitere Patientin wurde zusätzlich zur Chemotherapie bestrahlt.

Ein aktuelles Follow – up lag in 41/45 Fällen vor. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 5,4 Jahre (2 – 232 Monate). Vier Patientinnen erlitten, wie Tabelle 3 zeigt, ein Rezidiv nach einem rezidivfreien Intervall von 10 Monaten, 61 Monaten, 72 Monaten sowie 134 Monaten.

Tabelle 3: Patientinnen mit einem Rezidiv (Quelle: eigene Darstellung)

ID	Alter bei ED [Jahre]	Datum 1.Rezidiv	Alter bei 1.Rezidiv [Jahre]	Rezidiv-freies Intervall [Monate]	Therapie 1.Rezidiv	weitere Rezidive
6	57	01.06.2011	57	10	OP + Chemo	2.Rezidiv: 2012
23	51	15.06.2012	57	72	OP + Chemo	2.Rezidiv: 2013 3.Rezidiv: 2015
30	24	03.07.2013	29	61	unbekannt	unbekannt
53	15	28.06.2016	26	134	OP Chemo unbekannt	nein

Diese Patientinnen wurden erneut operativ versorgt. In zwei von vier Fällen mit einem Rezidiv ist bekannt, dass die Betroffenen eine adjuvante Chemotherapie erhielten. Im weiteren Verlauf kam es in diesen beiden Fällen noch ein zweites beziehungsweise drittes Mal zu einem Rezidiv. Die eine Patientin ist seit der Therapie ihres dritten Rezidivs tumorfrei, die andere Patientin verstarb im Alter von 57 Jahren an ihrem Tumorrezidiv. Im gesamten Kollektiv sind drei weitere Patientinnen altersbedingt verstorben.

3.2 Beschreibung der SLCT mit einer Dicer1 – Mutation

Die Dicer1 – Mutationstestungen konnten in 44/45 Fällen erfolgreich durchgeführt werden, ein Fall konnte weder mit der Sequenzierung nach Sanger noch durch die Next Generation Sequenzierung (MiSeq) analysiert werden. Eine Mutation wurde als gegeben festgehalten, wenn sie sowohl in der Sequenzierung nach Sanger und in der MiSeq oder in beiden Bibliotheken der MiSeq nachgewiesen wurde. Bei der Sequenzierung nach Sanger wurden 16 Fälle Hotspot – Mutationen detektiert, welche in der MiSeq bestätigt wurden. Durch die Next Generation Sequenzierung konnten Mutationen in beiden Bibliotheken in zwei

weiteren Fällen festgestellt werden, sodass insgesamt folgende, in der Tabelle 4 vorgestellte 18 Mutationen vorlagen:

Tabelle 4: Fälle mit einer Hotspotmutation im Dicer1 – Gen (Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

ID	Alter [Jahre]	Grading	Sequenzierung nach Sanger	Next Generation Sequenzierung
1	15	G 3	p.D1810V	p.D1810V
6	57	G 2	p.D1709N	p.D1709N
7	23	G 2	failed	p.E1813K
12	43	G 2	p.E1813K	p.E1813K
17	27	G 2	failed	p.E1813G (20%)
18	18	G 2	p.D1810H	p.D1810H
19	16	G 2	p.Y1701X; p.E1705K	p.Y1701X; p.E1705K
21	48	G 2	p.D1709E	p.D1709E
27	16	G 2	p.D1709N	p.D1709N
31	35	G 2	p.E1813D	p.E1813D; p.D1709N
32	62	G 2	p.D1709N	p.D1709N
36	17	G 2	p.E1813K	p.E1813K
44	21	G 2	p.E1705K	p.E1705K
49	44	G 2	p.E1813G	p.E1813G
53	15	G 2	p.D1709E	p.D1709E
54	15	G 2	p.D1709V	p.D1709V
56	26	G 2	p.D1709N	p.D1709N
59	61	G 2	p.D1709N	p.D1709N

Es konnte festgestellt werden, dass das Alter der Patientinnen mit einem Dicer1 – mutierten Tumor im Vergleich zum Gesamaltersdurchschnitt von 48 Jahren im Median 24,5 Jahre (15 – 62 Jahre) betrug ($p < 0,001$). Nur drei (17%) der Frauen befanden sich in der Postmenopause mit einem Alter von 57, 61 beziehungsweise 62 Jahren. Dagegen handelte es sich, wie man aus der Abbildung 17 erschließen kann, sogar in sieben Fällen (39%) um Personen unter 20 Jahren und über die Hälfte der Patientinnen waren jünger als 30 Jahre.

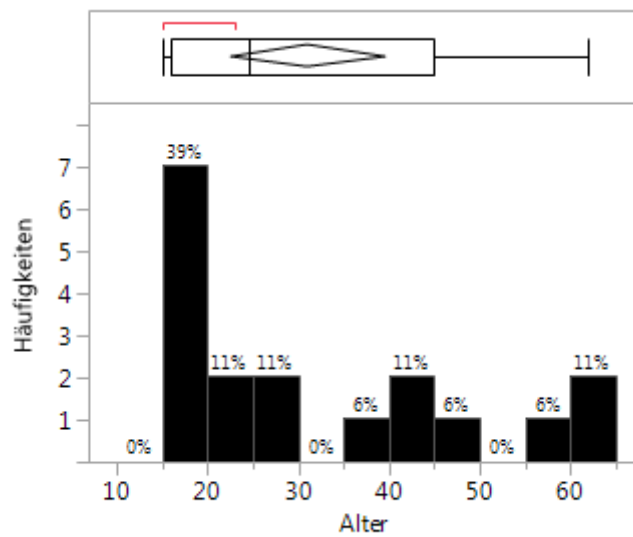


Abbildung 17: Altersverteilung der Dicer1 – mutierten Fälle (Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

In 17 Fällen wurde der Tumor als SLCT Grad 2 und in einem Fall als gering differenzierter Tumor klassifiziert. In der Gruppe der SLCT mit Dicer1 – Mutation traten alle Fälle mit histologischen Sonderformen auf: In 8/18 Fällen waren heterologe Elemente unter dem Mikroskop zu finden ($p < 0,001$), in zwei weiteren Fällen wurden retiforme Strukturen erfasst ($p = 0,162$).

Abbildung 18 stellt die Erkenntnisse über die präoperativ erfolgten Labortests grafisch dar. In 13/18 Fällen war es möglich, Informationen über diese Laboruntersuchungen zu erhalten. Bei 9/13 Patientinnen zeigten sich vor der Operation Auffälligkeiten im Blutbild, bei allen in Form von einer Androgenerhöhung ($p = 0,008$). Diese waren meist nur leicht bis mittelgradig erhöht, erreichten aber in einzelnen Fällen auch Spitzenwerte von bis zu 1773mmol/l. In drei Fällen sah man zusätzlich eine Erhöhung der Tumormarker wie zum Beispiel ein CA125 – Wert von 146U/l bei einem Normwert von kleiner 33U/ml oder einer AFP – Erhöhung auf 392ng/ml bei einem Normwert von weniger als 7ng/ml.

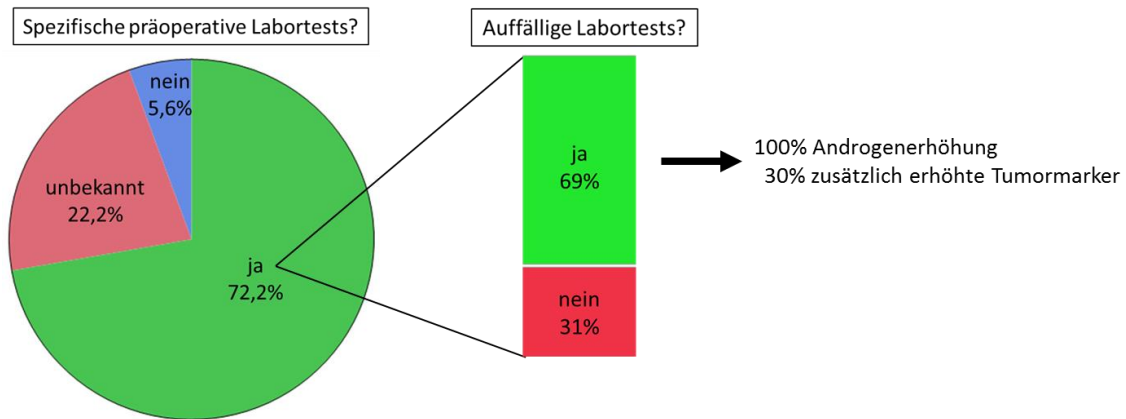


Abbildung 18: Laborauffälligkeiten bei Vorliegen der Dicer1 – Mutation
(Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

15 der 18 Patientinnen stellten sich mit den in Abbildung 19 gezeigten Symptomen vor. Drei (20%) dieser Frauen klagten über abnormale Blutungen, von diesen hatte eine zusätzlich abdominelle Beschwerden in Form von Bauchschmerzen und Zunahme des abdominellen Umfanges. Des Weiteren wurden in zehn Fällen (66,7%) Symptome androgener Art festgestellt ($p = 0,163$), davon handelte es in der Hälfte der Fälle um einen Hirsutismus (5/10) und/oder eine Amenorrhoe (6/10). Eine Patientin klagte zusätzlich über abdominelle Schmerzen. In zwei (13,3%) weiteren Fällen lagen rein abdominelle Beschwerden in Form von Bauchschmerzen vor.

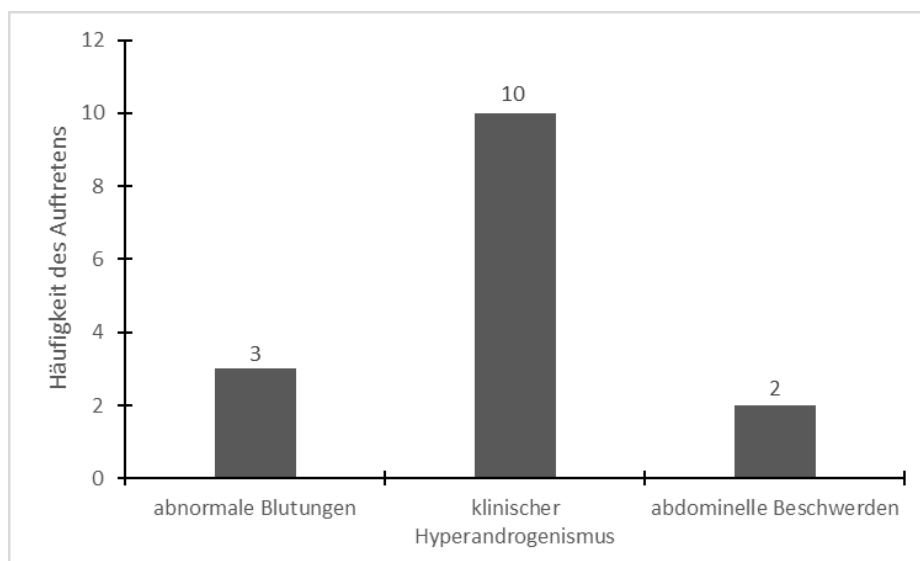


Abbildung 19: Verteilung der Leitsymptome bei Vorliegen einer Dicer1 – Mutation
(Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

In der Gruppe der SLCT mit einer Dicer1 – Mutation wurde in zwei Fällen ein Rezidiv diagnostiziert. Eine Patientin erlitt nach 134 Monaten ein Rezidiv, welches operativ versorgt wurde. Bei der zweiten Patientin war das rezidivfreie Intervall mit nur zehn Monaten weitaus kürzer. Sie wurde operativ und adjuvant mit einer Chemotherapie versorgt. Ein Jahr später kam es zum Auftreten eines zweiten Rezidivs, an welchem sie verstarb.

3.3 Beschreibung der SLCT mit der Foxl2 – C134W – Mutation

Der TaqMan allelic discrimination assay konnte in allen 45 Fällen erfolgreich durchgeführt werden. In der Tabelle 5 sind die zehn von 45 Fällen mit einer Heterozygotie für die Foxl2 – C134W – Mutation aufgelistet.

Tabelle 5: Fälle mit einer Foxl2 – Mutation (Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

ID	Alter [Jahre]	Grading	Foxl2 – Mutationsstatus
2	80	G 2	heterozygot
8	76	G 2	heterozygot
15	82	G 2	heterozygot
23	51	G 2	heterozygot
25	62	G 3	heterozygot
28	78	G 2	heterozygot
35	90	G 2	heterozygot
38	88	G 2	heterozygot
51	79	G 3	heterozygot
52	53	G 3	heterozygot

Im Median waren die Patientinnen 78,5 Jahre alt (51 – 90 Jahre)($p < 0,001$). Da alle Patientinnen, wie in Abbildung 20 deutlich wird, über 50 Jahre alt waren, befanden sie sich alle nach unserer Definition in der Postmenopause.

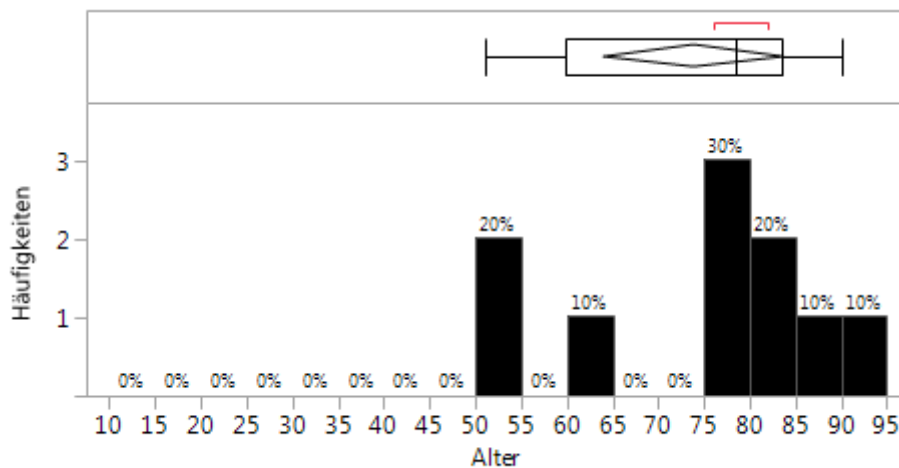


Abbildung 20: Altersverteilung der Foxl2 – mutierten Fälle (Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

In sieben Fällen war der Tumor von intermediärer Differenzierung, in drei Fällen handelte es sich um einen SLCT Grad 3. Keiner der SLCT mit einer Foxl2 – Mutation zeigte histologisch retiforme ($p = 1,00$) oder heterologe Elemente ($p = 0,168$).

In 5/10 Fällen standen Informationen über die präoperativ durchgeführten Blutuntersuchungen zur Verfügung. In einem Fall wurde mit 125U/ml ein erhöhter Wert des Tumormarkers CA125 festgestellt. Bei keiner der Patientinnen wurden erhöhte Androgenwerte im Blut nachgewiesen ($p = 0,006$).

Informationen über die Symptome konnten in 8/10 Fällen gewonnen werden. Fünf dieser Patientinnen klagten dabei über Symptome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Bei vier Patientinnen lagen abnormale Blutungen vor ($p = 0,059$), die fünfte Patientin zeigte eine Zunahme des Abdomenumfangs. In der Abbildung 21 wird deutlich, dass in keinem Fall androgene Symptome beschrieben wurden ($p = 0,005$).

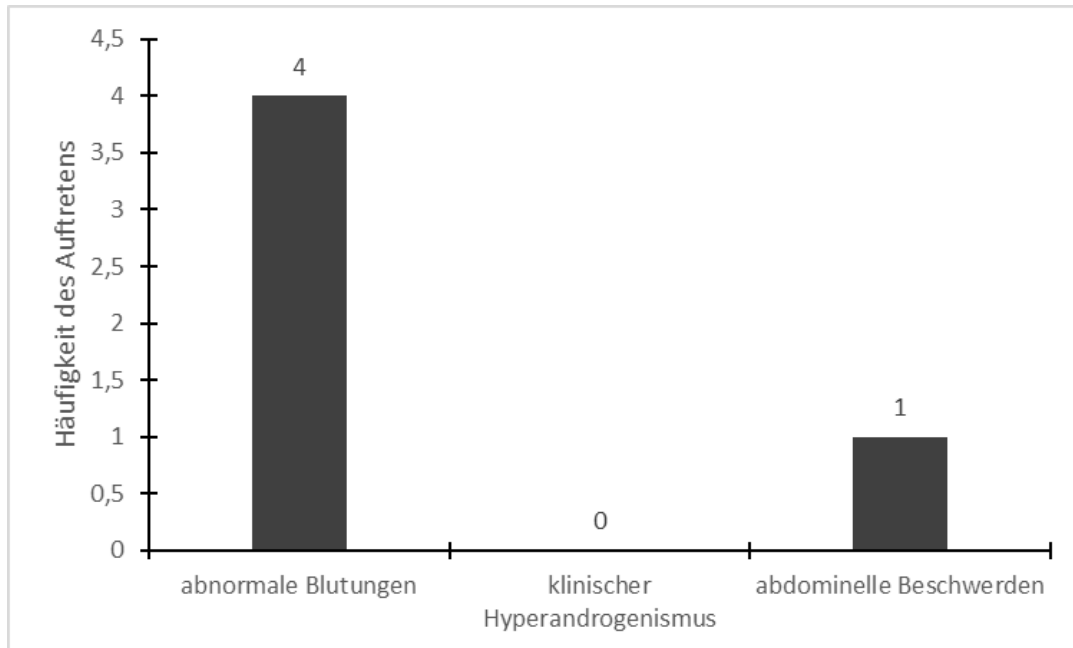


Abbildung 21: Verteilung der Leitsymptome bei Foxl2 – Mutation
(Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

Im weiteren Verlauf trat 2012 bei einer Patientin sechs Jahre nach der Diagnose das erste Rezidiv auf, zwei weitere folgten 2013 und 2015. Diese wurden jeweils operativ und chemotherapeutisch behandelt. Seitdem ist die Patientin tumorfrei. Im Gesamten ist keine der Patientinnen mit Foxl2 – Mutation an dem Tumor verstorben.

3.4 Beschreibung der SLCT ohne Dicer1 – und Foxl2 – Mutation

Als Letztes erfolgt nun eine Beschreibung der Gruppe an Tumoren, die wie aus Tabelle 6 ersichtlich weder eine Foxl2 – noch eine Dicer1 – Mutation (n=16/44) aufweisen.

Diese Patientinnen waren im Median 48,9 Jahre alt (17 – 74 Jahre). 9 von 16 Frauen befanden sich, wie in Abbildung 22 gezeigt, zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in der Postmenopause, im Gegensatz dazu waren nur zwei Patientinnen unter 30 Jahre alt.

Tabelle 6: Fälle ohne Foxl2 – und Dicer1 – Mutation (Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

ID	Alter	Grading	Foxl2 – Mutationsstatus	Dicer – Mutationsstatus
3	74	G 2	wt	wt
4	69	G 1	wt	wt
9	69	G 2	wt	wt
20	17	G 2	wt	wt
24	34	G 2	wt	wt
30	24	G 2	wt	wt
33	50	G 2	wt	wt
39	66	G 2	wt	wt
41	32	G 2	wt	wt
45	52	G 1	wt	wt
46	73	G 3	wt	wt
47	32	G 2	wt	wt
48	60	G 3	wt	wt
55	35	G 1	wt	wt
57	51	G 2	wt	wt

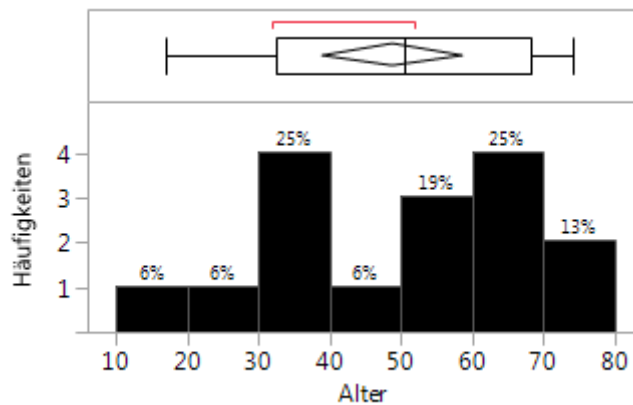


Abbildung 22: Altersverteilung der Wildtyp – Gruppe (Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

Neben zehn G2 und zwei G3 Tumoren befanden sich in dieser Gruppe auch 4/5 gut differenzierte Tumoren ($p = 0,013$). Über den fünften gut differenzierten SLCT kann nur gesagt werden, dass dieser keine Foxl2 – Mutation aufweist, da die Dicer1 – Mutationsanalyse wie oben erwähnt leider nicht möglich war. Kei-

ner der 16 WT/WT – SLCT zeigte retiforme ($p = 0,526$) oder heterologe Merkmale ($p = 0,036$).

In zwölf Fällen waren die Ergebnisse der präoperativ durchgeführten Laboruntersuchungen bekannt. Davon waren in fünf Fällen Auffälligkeiten feststellbar. Viermal zeigten sich eine Androgenerhöhung und zweimal eine Erhöhung der Tumormarker. Wie in Abbildung 23 verdeutlicht, trat dabei ein Fall auf, bei dem sowohl die Androgenwerte als auch die Tumormarker erhöht waren.

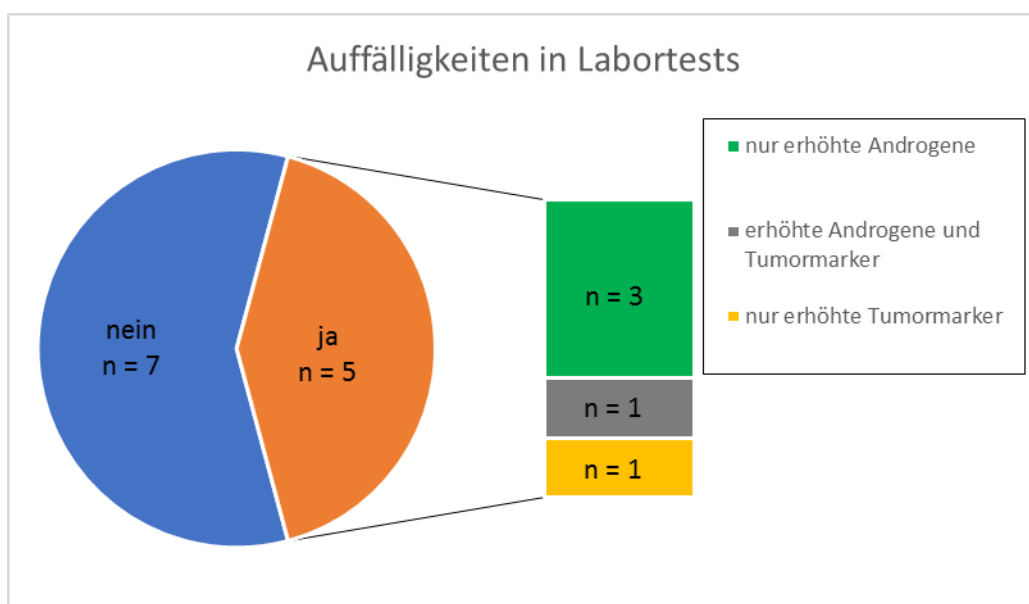


Abbildung 23: Auffälligkeiten in den Labortests bei Wildtyp – SLCT
(Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

Bei Angaben über die Symptome in 13/16 Fällen ließ sich feststellen, dass es zum Auftreten von Symptomen in acht Fällen kam. In 7/8 traten androgene Symptome auf ($p = 0,568$), dazu kamen bei zwei dieser Patientinnen abnormale Blutungen und bei einer weiteren abdominelle Beschwerden. Eine Patientin hatte rein abdominelle Beschwerden. In der Abbildung 24 ist zum Verständnis nur die Häufigkeit des vorherrschenden Leitsymptoms dargestellt.

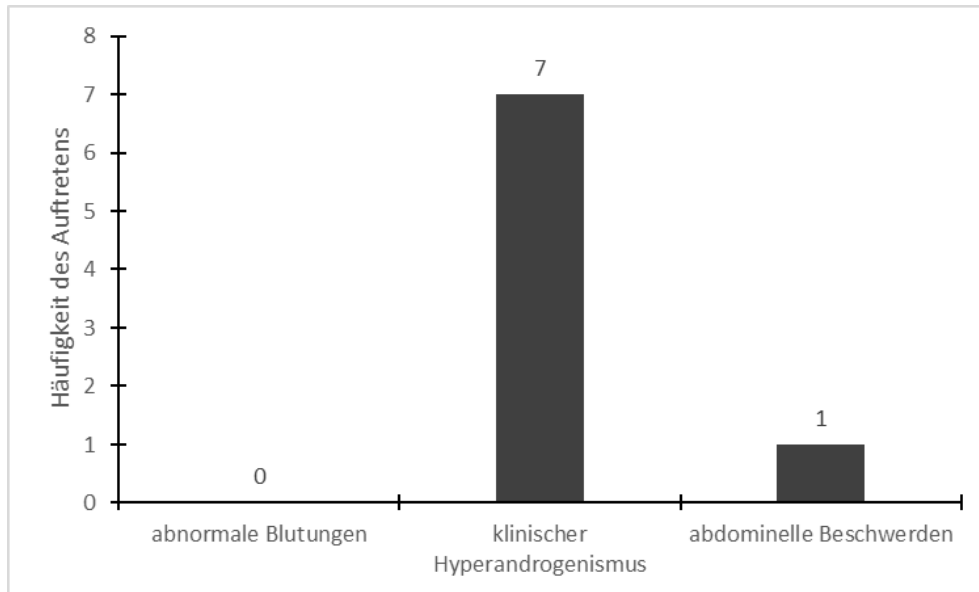


Abbildung 24: Verteilung der Leitsymptome bei Patientinnen mit einem Wildtyp – SLCT
(Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])

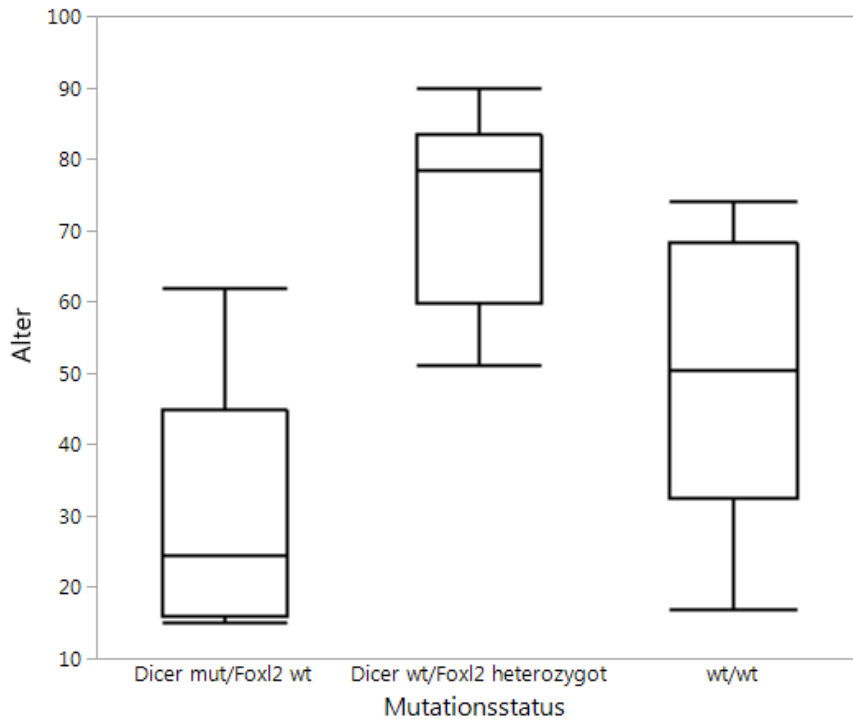
Ein Rezidiv trat bei einer Patientin nach einem Zeitraum von 61 Monaten auf. Über den weiteren Verlauf konnten keine weiteren Informationen in Erfahrung gebracht werden.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammengefasst lassen sich die Ergebnisse wie folgt darstellen: Nach Unterteilung des Kollektivs anhand des Mutationsstatus teilen sich die 45 Fälle in 18 SLCT mit einer Dicer1 – Hotspotmutation, zehn SLCT mit einer Foxl2 – Mutation und 16 SLCT ohne einer der beiden Mutationen auf. Es gibt keinen Fall, bei dem beide Mutationen in einem Tumor gleichzeitig auftraten.

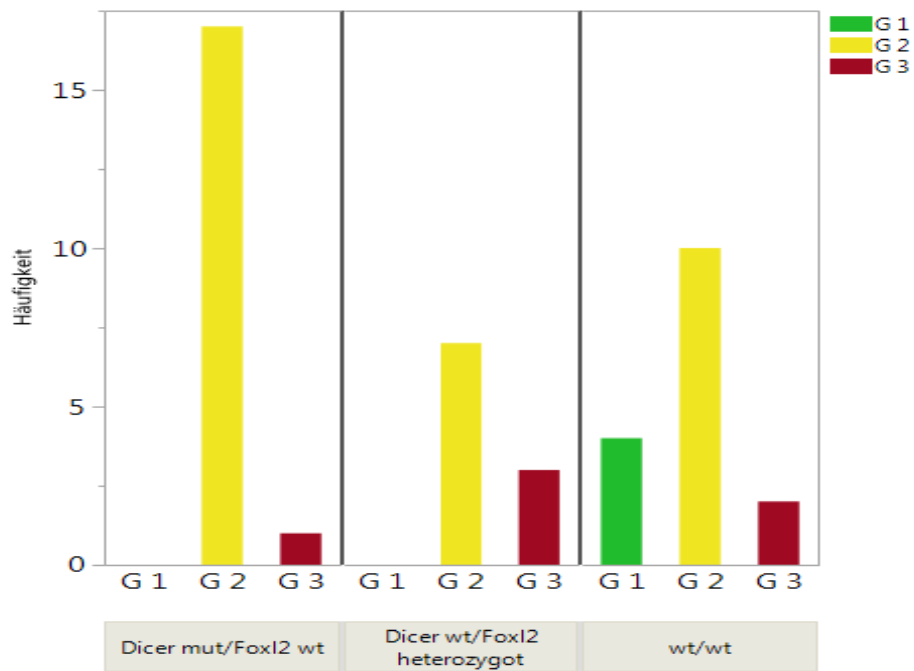
Im Schnitt waren die Patientinnen 48 Jahre alt. Je nach Mutationsstatus unterscheidet sich allerdings wie in Abbildung 25 ersichtlich der mittlere Altersdurchschnitt ebenso wie die Altersverteilung. Patientinnen mit einer Dicer1 – Hotspot – Mutation waren im Durchschnitt Mitte zwanzig, während sich die Patientinnen mit einem Foxl2 – mutierten SLCT alle in der Postmenopause befanden. Lag

keine der beiden Mutationen vor, so zeigte sich im Median ein Alter von 48,9 Jahren.



**Abbildung 25: Altersverteilung in Abhängigkeit vom Mutationsstatus
(Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])**

Wirft man einen Blick auf die histologischen Merkmale der SLCT, so zeigten sich im Gesamtkollektiv in der Mehrheit Tumoren intermediärer Differenzierung. Insgesamt war nur in fünf Fällen ein SLCT Grad 1 klassifiziert worden. Von diesen fünf Tumoren konnten vier sowohl für die Foxl2 – als auch Dicer1 – Mutationen erfolgreich getestet werden. Abbildung 26 zeigt, dass bei keinem gut differenzierten SLCT eine der beiden Mutationen vorlag ($p = 0,013$). Histologische Zusatzmerkmale fanden sich in zehn SLCT wieder. Diese gehörten alle zu der Gruppe der SLCT mit einer Dicer1 – Mutation ($p < 0,001$).



**Abbildung 26: Differenzierungsgrade in Abhängigkeit vom Mutationsstatus
(Daten veröffentlicht in: Karnezis et al. 2019 [48])**

Bei 50% der Patientinnen wurden präoperativ spezifische Veränderungen im Blut festgestellt. In den meisten Fällen handelte es sich hierbei um eine Erhöhung der Androgene. Wie in Abbildung 27 gezeigt, fand sich in der Gruppe der Dicer1 – mutierten Fälle bei 69% der Patientinnen auffällige Laborparameter. In allen Fällen handelte es sich um erhöhte Androgenwerte. Auch bei den Wildtyp – Fällen war der Androgenwert bei vier von fünf Patientinnen erhöht. Bei der Gruppe der Foxl2 – mutierten Tumoren fanden sich dagegen nur bei einer Patientin eine Auffälligkeit im Sinne von erhöhten Tumormarkern.

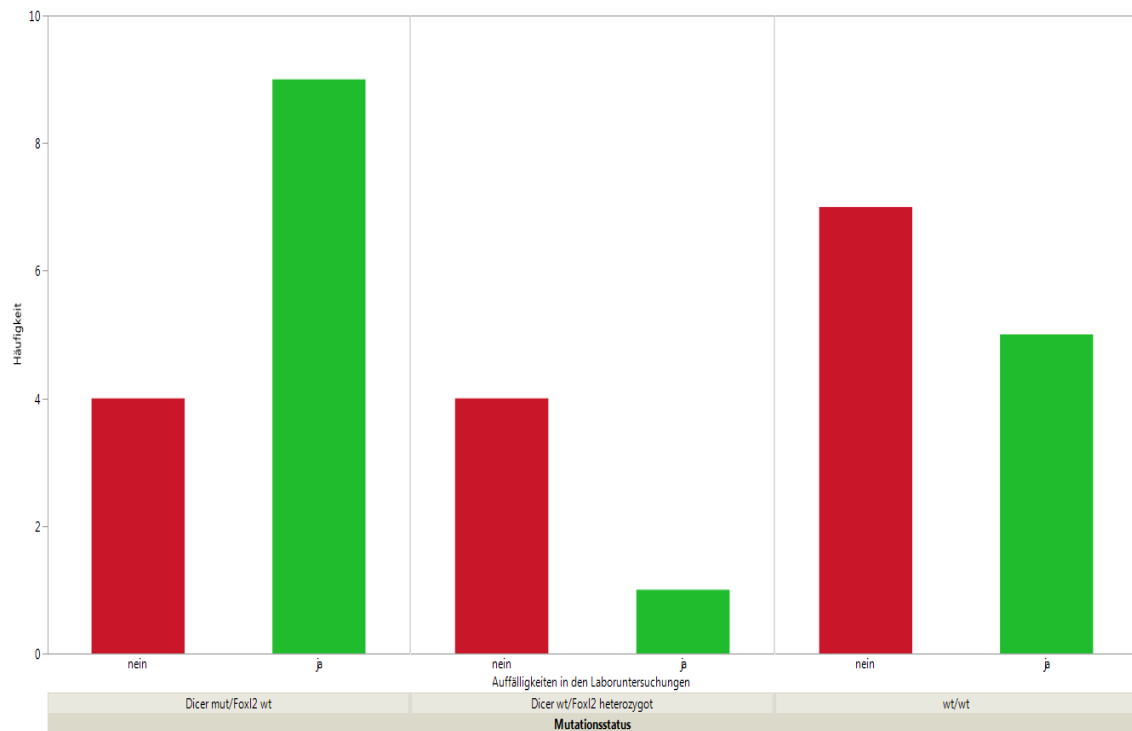


Abbildung 27: Laborauffälligkeiten in Abhängigkeit vom Mutationsstatus (Quelle: eigene Darstellung)

Nicht nur laborchemisch sondern auch klinisch manifestierte sich die Tumorerkrankung, so waren knapp drei Viertel der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung symptomatisch. Die Symptome reichten von abdominellen Beschwerden (27,5%) über abnormale Blutungen (22,5%) bis hin zu einem klinischen Hyperandrogenismus (45%). Deren Verteilung ist in Abbildung 28 grafisch dargestellt. Patientinnen mit einem Dicer1 – mutierten SLCT präsentierten in zwei Drittel der Fälle androgene Symptome. Bei Vorliegen einer Foxl2 – Mutation fielen die Patientinnen in 80% durch abnormale Blutungen auf. Handelte es sich um einen Wildtyp – SLCT, waren 50% der Frauen klinisch auffällig, auch hier vor allem durch einen Hyperandrogenismus.

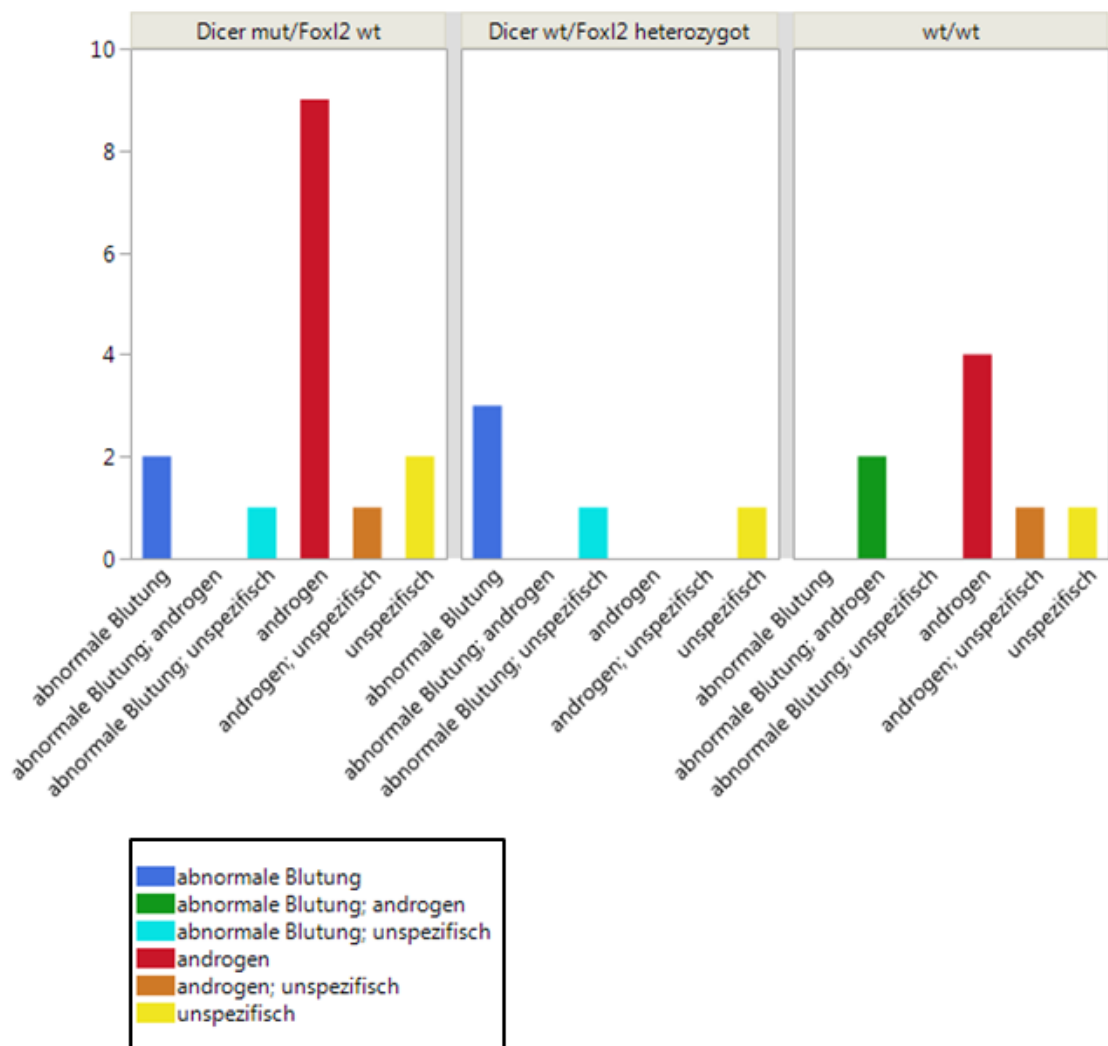


Abbildung 28: Klinik in Abhängigkeit vom Mutationsstatus (Quelle: eigene Darstellung)

4. Diskussion

4.1 Allgemeine Analyse des Kollektivs

In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei den SLCT um seltene, oftmals schwer zu diagnostizierende Vertreter der Ovarialtumoren handelt, war es das Ziel dieser Arbeit, vor dem Hintergrund aktueller Forschungsergebnisse einen Beitrag zur molekularen Charakterisierung dieser sowohl aus histologischer als auch klinischer Sicht vielfältigen Tumorentität zu leisten.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde zunächst eine spezialisierte histopathologische Zweitbegutachtung durchgeführt, da bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass gerade bei Ovarialtumoren gehäuft Fehldiagnosen auftreten können und diese durch das Einholen einer spezialisierten Zweitbegutachtung reduziert werden können [49, 50]. So lag bei einer von uns durchgeführten Studie bei zwei von vier SLCT eine Diskrepanz zwischen Originaldiagnose und Zweitbegutachtung vor [49]. Die Diagnosestellung ist oft schwierig. Zum einen stellen diese Tumoren durchaus eine Rarität dar, sodass für eine sichere histopathologische Diagnosestellung oft die Erfahrung fehlt und ein spezialisierter Konsilpathologe zu Rate gezogen wird. Außerdem können vor allem SLCT mit retiformen Strukturen stark den serösen Borderline – Tumoren ähneln. Auch bei dieser Arbeit zeigte sich, dass in fünf Fällen die Diagnose der zweitbegutachtenden Pathologen von der Ursprungsdiagnose abwich. In acht weiteren Fällen war keine klare Diagnose möglich, sodass diese nicht sicher bestätigten SLCT ebenfalls von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden. Es wurden also nur SLCT in diese Arbeit aufgenommen, die eindeutig histologisch als solche diagnostiziert werden konnten, um eine möglichst hohe Aussagekraft zu erlangen.

Vergleicht man dieses Kollektiv ganz allgemein mit denen der bislang verfügbaren Literatur, so fällt bereits zu Beginn die Tatsache auf, dass in bisherigen Studien das Kollektiv im Durchschnitt deutlich jünger war als in dieser Arbeit. Bei den Autoren um Young et al., welche die bislang weltweit größte Kohorte von 207 SLCT publiziert haben, sind die Patientinnen im Schnitt 25 Jahre (2 –

75 Jahre) alt [12]. Auch Gui et al. kamen mit einem Durchschnittsalter von 28 Jahren (9 – 62 Jahre) zu einem ähnlichen Ergebnis, welches sich deutlich von dem hier errechneten Median von 48 Jahren (15 – 90 Jahre) unterscheidet [9]. Ebenso liegt in dieser Arbeit der Anteil postmenopausaler Patientinnen mit knapp 47% deutlich über dem von bisherigen Studien (Young 10%; Gui 27,5%). Es fiel auf, dass in 16 von insgesamt 21 Fällen postmenopausaler Patientinnen diese vom MVZ Mannheim zur Verfügung gestellt wurden. Dieser hohe Anteil an älteren Patientinnen lässt sich am ehesten mit der konsiliarischen Funktion des MVZ erklären, da dort mit Prof. Dr. med., Kommos und Prof. Dr. med. Schmidt zwei spezialisierte Gynäkopathologen arbeiteten. Da SLCT in der Literatur eher bei jüngeren Patientinnen beschrieben sind, könnte man sich vorstellen, dass bei älteren Betroffenen mit dieser Verdachtsdiagnose eher ein Konsil hinzugezogen wurde.

Histologisch scheint im Gegensatz zu Gui et. al. der Anteil intermediär differenzierter SLCT in dieser Arbeit höher zu liegen (75,6% vs.35%) [9]. Wird allerdings die von Young et al. genutzte Einteilung in gut, intermediär und gering differenzierte SLCT sowie SLCT mit heterologen Elementen angewendet [12], so lassen sich Parallelen hinsichtlich aller Prozentwerte feststellen: Die SLCT Grad 1 machen sowohl hier als auch bei Young 11,1% aus. Die SLCT Grad 2 stellen etwas mehr als die Hälfte aller SLCT dar (hier 57,8%; Young 54%), während die gering differenzierten SLCT in beiden Studien in 13% der Fälle auftreten. SLCT mit heterologen Elementen fanden sich hier in 17,7% der Fälle und lagen damit nur knapp unter den 22%, die Young et al. 1985 festhielten.

Knapp die Hälfte der Patientinnen zeigte vor der Operation Auffälligkeiten in den durchgeführten Laboruntersuchungen, davon im Großteil der Fälle eine Erhöhung der Androgene wie zum Beispiel Testosteron oder Androstendion. Diese Ergebnisse entsprechen bereits publizierten Zahlen, so konnten Gui et al. bei 19 von 20 präoperativ getesteten Patientinnen ein erhöhten Testosteronspiegel im Blut nachweisen [9].

Klinisch kann es wie zu Beginn erläutert zu androgenen Symptomen bei den Patientinnen kommen. In der aktuellen Literatur schwankt die Häufigkeit dieser

Symptomgruppe zwischen 33 [12] bis 63% [9]. Auch in dieser Arbeit fielen circa 40% der Frauen mit einem klinischen Hyperandrogenismus auf. Allerdings zeigte sich im Vergleich zu anderen Studien [9] ein etwas größerer Prozentsatz an Patientinnen mit abnormalen, meist postmenopausalen Blutungen (22,5% vs. 15%). Dies könnte mit dem hier vorliegenden höheren Anteil an postmenopausalen Frauen, bei denen eine vaginale Blutung oftmals als erstes Warnsymptom auf einen gynäkologischen Tumor hindeutet, zusammenhängen.

Laut aktueller Leitlinie [13] ist im Falle eines benignen SLCT (G1) eine Entfernung des Tumors im Sinne einer einseitigen Salpingo – Oophorektomie ausreichend. Alle Patientinnen mit einem G1 – Tumor wurden auf diese Weise therapiert, nur bei einer postmenopausalen Patientin wurde zusätzlich eine Hysterektomie durchgeführt. Tumoren geringer Differenzierung weisen durchaus ein malignes Potenzial auf [12], so zeigte bei Young et al. 11% der G2 – SLCT und 59% der G3 – SLCT ein malignes Verhalten. Dies spiegelt sich in der Empfehlung der Leitlinie wieder, dass in einem solchen Fall analog der operativen Therapie des Ovarialkarzinoms vorgegangen werden soll [13]. Zudem sollte gerade bei jungen Patientinnen ein fertilitätserhaltendes Vorgehen besprochen werden. Lag bei den Patientinnen ein SLCT Grad 2 oder 3 vor, so wurde in 15 Fällen eine unilaterale und in 20 Fällen eine bilaterale Salpingo – Oophorektomie durchgeführt. Die Patientinnen mit einem G2 – oder G3 – Tumor, die eine USO erhielten, waren bis auf eine alle prämenopausal. Bei dieser einzigen Ausnahme jener Subgruppe handelt es sich um die mit 90 Jahren älteste Patientin des Kollektivs. Warum sie eine USO und keine BSO erhielt, ist nicht bekannt. In der besagten Gruppe erhielt ebenfalls nur die 90 – jährige Patientin eine Hysterektomie.

Demzufolge wurden alle prämenopausalen Patientinnen mit einem mäßig oder gering differenzierten Tumor fertilitätserhaltend operiert. Im Gegensatz dazu erhielten die älteren Patientinnen meist eine operative Therapie größeren Ausmaßes. In der Patientengruppe, die mit einer BSO operativ versorgt wurde, waren alle Frauen bis auf drei (27, 44 und 48 Jahre) über 50 Jahre alt.

4.2 Bedeutung der Dicer1 – Mutationsanalysen

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen lässt sich bereits eine Häufung bestimmter Merkmale in Bezug auf den Dicer1 – Mutationsstatus erkennen. Der Nachweis einer Dicer1 – Mutation korreliert mit einer intermediären oder geringen Differenzierung und mit dem Auftreten von heterologen oder retiformen Strukturen. Es handelt sich um junge Patientinnen, welche meist einen laborchemischen und/oder klinischen Hyperandrogenismus aufweisen.

Schon vor einigen Jahren wurde beschrieben, dass somatische Hotspotmutationen im Dicer1 – Gen gehäuft bei SLCT auftreten [27]. Die Häufigkeit schwankt zwischen den verschiedenen Studien allerdings sehr stark, von 32% [51] bis 97% [52]. In dieser Arbeit liegt der Anteil der Dicer1 – mutierten SLCT mit 41% eher im unteren Bereich. Das könnte mitunter an einem größeren Anteil an gut differenzierten SLCT in dieser Arbeit im Vergleich zu anderen liegen, da in dieser histologischen Gruppe bisher nie Dicer1 – Mutationen auftraten. Allerdings liegt auch in anderen Kollektiven der Prozentsatz von G1 – Tumoren zwischen 7% [52] und 12% [53]. Eine weitere mögliche Ursache wären Fehler in der Methodik. Aufgrund von Fehldiagnosen könnte die Rate an Dicer1 – Mutationen fälschlicherweise mit zu niedrigen Werten angegeben werden. Es wurde versucht, diesen Fehler mit Hilfe der durchgeführten spezialisierten Zweitbegutachtung durch drei international anerkannte Gynäkopathologen bereits zu Beginn der Studie zu minimieren, indem Fälle mit diskrepanter Zweitbegutachtung ausgeschlossen wurden. Die Methoden zur Mutationstestungen, Sequenzierung nach Sanger und Next generation sequencing, wurden auch in bereits publizierten Studien verwendet [52, 53] und erscheinen somit hinreichend validiert. Zudem gab es eine hohe Konkordanz zwischen den beiden verwendeten Methoden. Nur zwei Fälle wurden nicht in der Sequenzierung nach Sanger detektiert, aber dafür in beiden Bibliotheken der Next generation Sequenzierung gefunden. Eine dritte mögliche Erklärung, die auch als am wahrscheinlichsten zu betrachten ist, ist die Tatsache, dass dieses Kollektiv im Schnitt älter ist als in anderen Studien. Da die Dicer1 – Mutation gehäuft bei jüngeren Patientinnen auftritt und genau diese Subgruppe einen geringeren Anteil am Gesamtkollektiv ausmacht, könnte dadurch der prozentuale Anteil der Dicer1 – mutierten SLCT geringer

ausfallen. Bereits in anderen Studien wurde festgestellt, dass Patientinnen mit Dicer1 – mutierten SLCT im Vergleich zu Patientinnen mit Dicer1 – Wildtyp – Tumoren im Schnitt deutlich jünger waren [51, 54]. Diese Aussage lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit weiter bekräftigen. In der Gruppe mit einer Dicer1 – Mutation lag der Altersmedian bei 24,5 Jahren, während Patientinnen mit einem Dicer1 – Wildtyp – SLCT im Schnitt 61 Jahre ($p < 0,001$) alt waren. Ein möglicher Erklärungsansatz ist eventuell die Tatsache, dass bei 69% der Patientinnen mit einer somatischen Mutation auch eine Keimbahnmutation nachweisbar ist [53], welche ein früheres Auftreten von Erkrankungen bedingen kann. Inwieweit sich dies tatsächlich auf den Erkrankungsbeginn auswirkt, sollte allerdings noch weiter erforscht werden.

Histologisch zeigte sich genau wie in vorherigen Arbeiten [51–53], dass es sich bei Dicer1 – mutierten SLCT nie um gut differenzierte Tumore handelt. Zudem konnte festgestellt werden, dass sich in dieser Gruppe alle Fälle mit heterologen und retiformen Elementen wiederfanden. Diese Assoziation zwischen Dicer1 – Mutationsstatus und Auftreten histologischer Sonderformen wurde auch bei Kato et al. bereits beschrieben [54]. Ob diese wirklich so eindeutig ist, sollte aber noch in weiteren Kollektiven untersucht werden. Bislang scheint es nur einen Fall bei Goulvent et al. zu geben, bei dem heterologe und retiforme Komponenten bei einem Dicer1 – Wildtyp – SLCT beschrieben wurden [51].

Bei Korrelation der klinischen Präsentation der Patientinnen bei Erstdiagnose mit dem Mutationsstatus zeigte sich, dass bei Vorliegen einer Dicer1 – Hot-spotmutation knapp zwei Drittel der Frauen über Beschwerden androgener Art klagten. Erst im September 2016 postulierten Kato et al., einen klinisch manifesten Zusammenhang zwischen dem Nachweis einer Dicer1 – Mutation und dem Auftreten androgener Symptome [54]. Auf molekularer Ebene ist schon länger bekannt, dass Mutationen im Dicer1 – Gen mit einem veränderten Genexpressionsprofil einhergehen. So wird bei Dicer1 – mutierten SLCT vermehrt der Transkriptionsfaktor Sox9 exprimiert, der beim Mann für die Entwicklung des männlichen Phänotyps eine entscheidende Rolle spielt, während gleichzeitig die Expression der Östrogen – produzierenden Aromatase CYP19A1 ver-

mindert ist [29]. Dadurch wird die Ausbildung eines männlichen Phänotyps gefördert.

4.3 Bedeutung der Foxl2 – Mutationsanalyse

Ein weiteres, auf den ersten Blick widersprüchliches Ergebnis dieser Arbeit ist ein relativ großer Anteil an Foxl2 – mutierten SLCT von zehn Fällen, da Foxl2 als spezifisch für die adulten Granulosazelltumoren gilt und nur in wenigen Studien wie zum Beispiel von Al Agha et al. oder von Goulvent einige wenige Fälle von SLCT mit einer Foxl2 – C134W – Mutation beschrieben wurden [31, 51]. In den eben genannten Studien wurden diese seltenen Fälle von Foxl2 – mutierten SLCT weder genauer histopathologisch charakterisiert noch wurden klinische Daten in deren Analyse miteinbezogen, sodass bislang keine konkreten Informationen zu dieser Subgruppe vorliegen. In Fachkreisen wird zum Teil davon ausgegangen, dass es sich bei Foxl2 – positiven SLCT um fehldiagnostizierte aGCT handelt [55]. Diese Meinung lässt sich mit dieser Arbeit nicht bekräftigen. Erstens wurde alle Fälle auch in der Zweitbegutachtung als reine SLCT eingestuft, da in allen Fällen eine SLCT – typische Morphologie vorlag. Von einer guten Qualität der Zweitbegutachtung ist auszugehen, da die beiden international anerkannten Gynäkopathologen eine hohe Konkordanzrate in bereits publizierten Studien aufweisen können [56]. Zudem wurde die Mutationsanalyse für alle positiv getesteten Fälle erneut durchgeführt, um eine mögliche Kontamination auszuschließen. Bezieht man bisherige Studien mit Foxl2 – mutierten SLCT in diese Überlegungen mit ein, so kann man feststellen, dass in den oben bereits erwähnten Publikationen ebenfalls renommierte Gynäkopathologen die Zweitbegutachtungen durchgeführt haben, so wie zum Beispiel in der Studie von Al Agha et al der international anerkannte Robert E. Scully, der als „Altmeister der Gynäkopathologen“ [57] gilt und unter anderem die histologische Beschreibung der SLCT mitgeprägt hat. Bemerkenswert bei den Foxl2 – mutierten SLCT dieser Arbeit ist die Tatsache, dass sich alle Patientinnen in der Postmenopause befanden. Klinisch fielen diese meist durch postmenopausal auftretende Blutungen auf wie man sie auch von anderen Ovarialtumoren wie

beispielsweise dem adulten Granulosazelltumor kennt. Diese Klinik könnte durch die verstärkte Induktion der Aromatase CYP19A1 erklärt werden, welche bei adulten Granulosazelltumoren mit C134W – Mutation beschrieben wurde [42]. Der daraus resultierende Überschuss an Östrogen führt daraufhin zur der postmenopausalen Blutung.

4.4 Bedeutung dieser Arbeit für die Klassifikation der SLCT

Zusammenfassend erlauben die Ergebnisse dieser Arbeit die Unterteilung des Studienkollektives in drei molekulare Subgruppen anhand des Dicer1 – und Foxl2 – Mutationsstatus, welche eine Korrelation mit dem histologischen Bild und der klinischen Präsentation der Patientinnen aufweisen. Diese Ergebnisse könnten somit einen Beitrag zu einer zukünftigen, molekular basierten Klassifikation dieser seltenen Tumorentität leisten. Die erste Untergruppe besteht aus SLCT mit einer Dicer1 – Hotspotmutation und einem Foxl2 – Wildtyp – Allel. Es handelt sich um intermediär oder gering differenzierte Tumore, die eventuell auch heterologe Elemente oder retiforme Strukturen aufweisen. Die Patientinnen sind eher jünger und zeigen meist einen Hyperandrogenismus in den Blutuntersuchungen und/oder durch einen Hyperandrogenismus bedingte Symptome. SLCT der zweiten Subgruppe weisen keine Dicer1 – Mutation, aber dafür eine Foxl2 – Mutation auf. Auch hier sind es Tumoren von Grad 2 oder 3, die aber in keinem Fall heterologe oder retiforme Elemente zeigten. Die betroffenen Frauen waren alle über 50 Jahre alt und postmenopausal. Sie fielen vermehrt durch abnormale Blutungen auf. Die letzte Gruppe der SLCT trägt keine der beiden hier untersuchten Mutationen. Neben intermediär und gering differenzierten Tumoren finden sich in dieser Gruppe auch alle gut differenzierten SLCT wieder, bei denen eine Mutationstestung für beide Gene erfolgreich durchgeführt werden konnte. Auch hier wurden keine histologischen Zusatzmerkmale gefunden. Die Patientinnen sind eher mittleren Alters und haben im Großteil der Fälle auch Symptome androgener Art.

Aktuell ist diese Unterteilung eher von diagnostischer Bedeutung. Liegt ein SLCT Grad 1 vor, ist eine Dicer1 – und Foxl2 – Mutationstestung nicht erforder-

lich, da diese gemäß den oben erläuterten Ergebnissen negativ ausfallen sollten. Wenn sich dagegen heterologe oder retiforme Elemente unter dem Mikroskop nachweisen lassen, so kann von einer Dicer1 – Mutation ausgegangen werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch keine Aussage über die prognostische Relevanz dieser Subgruppe möglich, da die geringe Fallzahl von 45 SLCT dies nicht zulässt. Rezidive traten in allen Subgruppen auf, wobei der ungünstigste Verlauf bei einem Dicer1 – mutierten SLCT G2 mit retiformen Elementen auftrat. Neben einem sehr kurzen rezidivfreien Intervall von zehn Monaten kam es innerhalb von zwei Jahren zweimal zu einem Rückfall trotz radikaler Therapie und schlussendlich verstarb die Patientin an ihrem Tumor. Dieser Verlauf deutet eventuell auf eine ungünstigere Prognose bei Dicer1 – Mutationen hin. Zudem wurde diese These auch in vorherigen Studien aufgestellt [51]. Es bedarf aber noch weiterer Studien mit größeren Kohorten, um diese zu verifizieren. Andererseits fand sich das längste rezidivfreie Intervall auch bei einem Dicer1 – mutierten Fall, der allerdings keine histologischen Zusatzmerkmale aufwies. Das könnte ein Anhalt dafür sein, dass auch noch sehr spät Rezidive möglich sind und auch noch Jahre nach einem SLCT dies als Differentialdiagnose bei einer unklaren Raumforderung in Betracht gezogen werden sollte.

5. Zusammenfassung

Bei den Sertoli – Leydigzelltumoren (SLCT) handelt es sich um eine sehr seltene Tumorentität des Ovars, die aus Sertoli – und Leydigzellen bestehen und vor allem junge Frauen betreffen. Trotz einer guten Prognose stellt dieser bislang noch wenig verstandene Subtyp der Ovarialtumoren sowohl klinisch als auch diagnostisch eine Herausforderung dar. Die Patientinnen leiden häufig unter den durch die ektope Hormonsekretion auftretenden Virilisierungserscheinungen und die histologische Diagnosestellung gestaltet sich aufgrund mangelnder Erfahrung und fehlender tumorspezifischer Marker oft schwierig. Seit kurzem ist bekannt, dass SLCT in bis zu 97% spezifische Hotspotmutationen im Dicer1 – Gen aufweisen können, welche über Veränderungen im miRNA – Profil der Zelle zu einer veränderten onkogenen Genexpression führen. Dagegen gilt die Foxl2 – C134W – Mutation als spezifischer Marker für adulte Granulosazelltumoren, die als weiterer Vertreter der Keimstrang – Stromatumoren eine wichtige Differentialdiagnose der SLCT darstellen. Ziel der Arbeit war es, die Erkenntnisse der aktuellen Forschung in einem großen Tumorkollektiv zu überprüfen und möglicherweise zu einer zukünftigen, gegebenenfalls molekularen Klassifikation dieser Entität beizutragen.

Hierzu wurde ein Kollektiv mit SLCT – Fällen aus drei verschiedenen Zentren erstellt und einer spezialisierten histopathologischen Zweitbegutachtung zugeführt. Anschließend wurden bei allen bestätigten SLCT molekulare Mutationsanalysen hinsichtlich des Dicer1 – (Next Generation Sequencing) und Foxl2 – Mutationstatus (TaqMan allelic discrimination assay) durchgeführt sowie die klinischen Daten inklusive eines Follow – up erhoben.

Bei der Auswertung der Mutationsanalysen zeigte sich, dass bei keinem der 45 bestätigten SLCT beide Mutationen gleichzeitig nachweisbar waren, sodass auf molekularer Ebene die Bildung drei verschiedener SLCT – Subgruppen möglich war. Um die Frage zu beantworten, ob diese Unterteilung in Foxl2 – mutierte, Dicer1 – mutierte und Wildtyp – SLCT auch mit histologischen und klinischen Charakteristika korreliert, wurden Ergebnisse der Mutationsanalysen mit den

klinischen Parameter abgeglichen. Dabei zeigten sich zum Teil ausgeprägte Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die 18 SLCT mit einer Dicer1 – Mutation waren intermediär oder gering differenziert und wiesen als einzige Gruppe in zehn Fällen prognostisch ungünstige Zusatzmerkmale wie heterologe oder retiforme Strukturen auf. Die Patientinnen sind im Vergleich zum Altersdurchschnitt der gesamten Kohorte (Φ 48 Jahre) auffallend jung (Φ 24,5 Jahre) und haben meist androgene Symptome (66,7%). Die Foxl2 – Mutation, welche in der Literatur primär den adulten Granulosazelltumoren zugeschrieben wird, trat bei zehn SLCT auf, allerdings nur bei älteren postmenopausalen Patientinnen (Φ 78,5 Jahre). Es handelte sich dabei um mittelgradig bis schlecht differenzierte Tumoren ohne histologische Zusatzmerkmale. Klinisch präsentierten sich die Betroffenen vor allem mit abnormalen Blutungen (80%). Die letzte Gruppe (n =16) wies weder eine Dicer1 – noch eine Foxl2 – Mutation auf. Hier fanden sich neben G2 und G3 auch alle gut differenzierten SLCT wieder und wie bei der Foxl2 – mutierten Gruppe traten keine heterologen oder retiformen Elemente auf. Die Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im mittleren Alter (Φ 48,9 Jahre) und hatten, sofern klinische Beschwerden bestanden, in der Mehrzahl androgene Symptome (88%).

Auf Grundlage der durchgeführten Untersuchungen und beschriebenen Korrelationen dieser Arbeit scheint die Bildung dreier, bislang noch wenig erforschter, molekularer Subgruppen möglich, welche sowohl histologisch und auch klinisch unterschiedliche Charakteristika aufweisen. Dies deutet auf das Bestehen verschiedener genetischer Pathomechanismen hin, welche in der Ausbildung des SLCT – Phänotyps münden. Aufgrund der geringen Fallzahl kann in dieser Arbeit keine Aussage zu der prognostischen Bedeutung dieser Klassifikation gemacht werden, sodass weitere Studien zu diesem Thema durchgeführt werden sollten.

6. Tabellarischer Anhang

6.1 Verbrauchsmaterialien

Einweg – Biopsiestanzen	Integra Miltex
Eis	
Eppendorf Tubes® 3810X	Eppendorf
Eppendorf Tubes 5.0ml	Eppendorf
Mikropistill	
Snaplock Mikroröhrchen 1,5ml	Axygen™
Parafilm	
PCR – Platte 384 – well	
Rainin – BioClean – Pipettenspitzen blau(1000µl), grün (250µl), rot (20µl)	Mettler Toledo
MultiPLY® – µStrip Pro 8er Kette	Starstedt
Trockeneis	
Qubit Assay Tubes	Invitrogen™
Versiegelungsfolie („Optical Adhesive Film“)	
Wiegepapier	

6.2 Chemikalien und Enzyme

Agarose	
10X Blue Juice Gel Loading Buffer	ThermoFisher Scientific (Invitrogen™)
Destilliertes Wasser (RNase/DNase – frei)	ThermoFisher Scientific (Invitrogen™)
Ethanol 70%	
Ethanol 100%	
Gel Star Nucleide Acid Gel Stain	Lonza
10X TBE Buffer	ThermoFisher Scientific (Invitrogen™)

Xylene	
RNase Zap	Ambion
RNase A Solution	Quiagen
GD 100bp DNA Ladder	Froggabio
ExoSAP – IT PCR Product Cleanup reagent	ThermoFisher Scientific

6.3 Kommerziell erwerbliche Kits

miRNeasy FFPE Tissue Kit (50)	QIAGEN
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	QIAGEN
Qubit dsDNA BR Assay Kit	ThermoFisher Scientific (Invitrogen™)
Qubit dsDNA HS Assay kit	ThermoFisher Scientific (Invitrogen™)
Taqman Genotyping Master Mix	ThermoFisher Scientific (applied biosystems™)
Foxl2 TaqMan Assay mix	ThermoFisher Scientific (applied biosystems™)
PCR Supermix High Fidelity	Invitrogen™
P2 – und TM – Primer für Dicer1 – Analyse	Integrated DNA Technologies Inc. (IDT)

6.4 Geräte

Mini Vortexer MV1	VWR by IKA®
Galaxy Mini Centrifuge	VWR by IKA®
Centrifuge 5415D	Eppendorf
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Scientific
Vacufuge™	Eppendorf
Verschluss – Deckel für Tubes	

Manuelle Einkanal – /Mehrkanalpipette Lite XLS+ Rainin Pipetten 0,1 – 2µl, 2 – 20µl, 20 – 200µl	Mettler Toledo
Digital/Analog Heizblock	VWR by IKA®
Isotemp 205 – Wasserbad	Fisher Scientific
Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen
NanoDrop® Spectrophotometer ND – 1000	NanoDrop Technologies
P.C.R. Kammer	PLAS LABS
QuantStudio™ 6 Flex System	Applied Biosystems™
DNA Engine Tetrad® 2 Peltier Thermal Cycler	Biorad
Horizontale Elektrophorese – System	Biorad
Mikrowelle	
Kolben	
PCR – Platten – Halter	
Optical Adhesive Film Applicator	

6.5 Computer – Software

QuantStudio Real – Time PCR Software v1.2	
Software DNA Engine Tetrad® 2	Biorad
Alphamager v3.4.0	Alpha Innotech

6.6 Fragebogen zur Erhebung klinischer Daten



A N T W O R T F A X **Fax: 07071 – 2925198**

Dicer mutations in ovarian Sertoli Leydig Cell Tumors & Adult Granulosa Cell Tumors
– Erhebungsbogen klinische Daten –

Studienzentrale Universitätsfrauenklinik Tübingen
z.Hd. Herrn PD Dr. med. Stefan Kommos

Betreff: Patientenname, Vorname, Geburtsdatum

Krankheitsverlauf

1. Patient zuletzt gesehen am _____
2. Aktueller Status lebt
 verstorben, Datum _____
 unbekannt

Erkrankung - Erstdiagnose

1. Datum Erstdiagnose _____
2. Größe _____ cm unbekannt
3. Gewicht _____ kg unbekannt
4. Auffällige Laborwerte ja nein unbekannt
falls ja, welche: _____

OP - Erstdiagnose

1. Datum OP _____
2. Art / Umfang der OP _____

Symptome - Erstdiagnose

1. Abnormale Blutung ja nein unbekannt
2. Klitorishypertrophie ja nein unbekannt
3. Tiefe Stimme ja nein unbekannt
4. Bartwuchs ja nein unbekannt
5. Akne ja nein unbekannt
6. Andere _____

Adjuvante Therapie

1. Adjuvante Chemotherapie ja von _____ bis _____
Medikament _____
 nein
 unbekannt
2. Adjuvante Radiotherapie ja von _____ bis _____
 nein
 unbekannt

Rezidiv

1. Rezidiv ja nein unbekannt

2. Datum Rezidiv _____

3. 2nd line Operation ja, Datum _____
Art/Umfang _____

nein

unbekannt

3. Adjuvante Chemotherapie ja von _____ bis _____
Medikament _____

nein

unbekannt

4. Adjuvante Radiotherapie ja von _____ bis _____

nein

unbekannt

Weitere Kommentare

7. Liste der Veröffentlichungen

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

Original Papers:

Karnezis, A. N.; Wang, Y.; Keul, J.; Cloutier, B.T.; Magrill, J.; Kommoss, S. et al. (2019): DICER1 and FOXL2 Mutation Status Correlates With Clinicopathologic Features in Ovarian Sertoli-Leydig Cell Tumors. In: *The American Journal of Surgical Pathology* 43 (5), S. 628 – 638.

Abstracts:

Keul J.; Kommoss S.; Karnezis A.; Wang Y.; Magrill J.; Cloutier B.T. et al. (2018): Analysis of FOXL2 - mutation status in 41 cases of ovarian. In: *Oncol Res Treat* 41(suppl 1) (Suppl. 1), S. 12.

Keul J.; Kommoss S.; Karnezis A.; Wang Y.; Magrill J.; Cloutier B.T. et al. (2018): Dicer1 and Foxl2 mutation analysis correlates with clinicopathological features in ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. In: *Pathologie* 2018 · 39 (Suppl 1), S. 79.

Keul, J.; Kommoss, F.; Karnezis, A.; Wang, Y.; Pasternak, J.; Hartkopf, A. et al. (2018): Sertoli-Leydigzelltumoren (SLCT) des Ovars. Dicer1- und Foxl2-Mutationsstatus als Beitrag zur Etablierung einer neuartigen, klinisch und histopathologisch relevanten Klassifikation. In: *Geburtshilfe Frauenheilkd* 78 (10), P 155.

Weitere Veröffentlichungen:

Keul, J.; Taran, A.; Kommoss, F.; Hartkopf, A.; Wallwiener, D.; Brucker, S. et al. (2016): Maligne Keimzell- und Keimstrang-Stromatumoren des Ovars. Systematische Erfassung und Durchführung einer spezialisierten histopathologischen Zweitbegutachtung. In: *Geburtshilfe Frauenheilkunde* 76 (10), P035.

Keul J.; Kommoss F.; Gilks B.; Taran A.; Hartkopf A.; Kraemer B. et al. (2018): Second opinion expert pathology in ovarian malignant germ cell and sex cord – stromal tumors (SCST). In: *Oncol Res Treat* 41(suppl 1) (Suppl. 1), S. 91–92.

Pilsworth, J.A.; Cochrane, D.R.; Xia, Z.; Aubert, G.; Färkkilä, A.E.M.; Horlings, H.M. et al. (2018): TERT promoter mutation in adult granulosa cell tumor of the ovary. In: *Modern Pathology*.

8. Literaturverzeichnis

1. (2017) Krebs in Deutschland für 2013/2014, 11. Ausgabe, Berlin
2. Young RH (2018) Ovarian sex cord-stromal tumours and their mimics. *Pathology* 50(1): 5–15. doi: 10.1016/j.pathol.2017.09.007
3. Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM (eds) (2011) *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Springer US, Boston, MA
4. Peres LC, Cushing-Haugen KL, Anglesio M et al. (2018) Histotype classification of ovarian carcinoma: A comparison of approaches. *Gynecol Oncol* 151(1): 53–60. doi: 10.1016/j.ygyno.2018.08.016
5. Young RH (2011) Sex Cord-Stromal, Steroid Cell, and Other Ovarian Tumors with Endocrine, Paraendocrine, and Paraneoplastic Manifestations. In: Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM (eds) *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Springer US, Boston, MA, pp 785–846
6. Serov SF, Scully RE, Sobin LH et al. (1973) Histological typing of ovarian tumours: S. F. Serov, R. E. Scully, in collaboration with L. H. Sobin and pathologists in ten countries. *International Classification of Tumours No. 9*. World Health Organization
7. Lüllmann-Rauch R (2012) *Taschenlehrbuch Histologie : 10 Tabellen / Renate Lüllmann-Rauch*. Unter Mitarb. von Friedrich Paulsen, 4., vollst. überarb. Aufl. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
8. Karnezis AN, Cho KR, Gilks CB et al. (2017) The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies. *Nat Rev Cancer* 17(1): 65–74. doi: 10.1038/nrc.2016.113
9. Gui T, Cao D, Shen K et al. (2012) A clinicopathological analysis of 40 cases of ovarian Sertoli–Leydig cell tumors. *Gynecologic Oncology* 127(2): 384–389. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.07.114
10. Roth LM, Anderson MC, Govan ADT et al. (1981) Sertoli-leydig cell tumors: A clinicopathologic study of 34 cases. *Cancer* 48(1): 187–197. doi: 10.1002/1097-0142(19810701)48:1<187:AID-CNCR2820480130>3.0.CO;2-1
11. Outwater EK, Wagner BJ, Mannion C et al. (1998) Sex cord-stromal and steroid cell tumors of the ovary. *RadioGraphics* 18(6): 1523–1546. doi: 10.1148/radiographics.18.6.9821198
12. Young RH, Scully RE (1985) Ovarian Sertoli - Leydig cell tumors: A clinicopathological analysis of 207 cases. *The American Journal of Surgical Pathology* 9(8): 543–569
13. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (2016) S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Ovarialkarzinom.61.0.html>. Accessed 04 Apr 2018
14. Talerma A (1987) Ovarian Sertoli–Leydig cell tumor (androblastoma) with retiform pattern. A clinicopathologic study. *Cancer* 60(12): 3056–3064. doi: 10.1002/1097-0142(19871215)60:12<3056:AID-CNCR2820601233>3.0.CO;2-R
15. Kommos S, Anglesio MS, Mackenzie R et al. (2013) FOXL2 molecular testing in ovarian neoplasms: Diagnostic approach and procedural guidelines. *Modern Pathology* 26(6): 860–867. doi: 10.1038/modpathol.2012.226

16. McCluggage WG, Young RH (2005) Immunohistochemistry as a diagnostic aid in the evaluation of ovarian tumors. *Seminars in Diagnostic Pathology* 22(1): 3–32. doi: 10.1053/j.semmp.2005.11.002
17. Hill DA, Ivanovich J, Priest JR et al. (2009) DICER1 Mutations in Familial Pleuropulmonary Blastoma. *Science* 325(5943): 965. doi: 10.1126/science.1174334
18. Bahubeshi A, Bal N, Rio Frio T et al. (2010) Germline DICER1 mutations and familial cystic nephroma. *Journal of Medical Genetics* 47(12): 863–866. doi: 10.1136/jmg.2010.081216
19. Frio TR, Bahubeshi A, Kanellopoulou C et al. (2011) DICER1 mutations in Familial Multi-Nodular Goiter with and without Ovarian Sertoli-Leydig Cell Tumors. *Jama* 305(1): 68–77. doi: 10.1001/jama.2010.1910
20. Schultz KAP, Pacheco MC, Yang J et al. (2011) Ovarian sex cord -stromal tumors, pleuropulmonary blastoma and DICER1 mutations: A report from the International Pleuropulmonary blastoma Registry. *Gynecologic Oncology* 122(2): 246–250. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.03.024
21. U.S. National Library of Medicine (2016) Dicer 1 syndrome. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/dicer1-syndrome>. Accessed 03 Mar 2019
22. Song M-S, Rossi JJ (2017) Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochemical Journal* 474(10): 1603–1618. doi: 10.1042/BCJ20160759
23. Lau P-W, Guiley KZ, De N et al. (2012) The Molecular Architecture of Human Dicer. *Nature structural & molecular biology* 19(4): 436–440. doi: 10.1038/nsmb.2268
24. Ma J-B, Ye K, Patel DJ (2004) Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429(6989): 318–322. doi: 10.1038/nature02519
25. Gurtan AM, Lu V, Bhutkar A et al. (2012) In vivo structure–function analysis of human Dicer reveals directional processing of precursor miRNAs. *RNA* 18(6): 1116–1122. doi: 10.1261/rna.032680.112
26. Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116(2): 281–297. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5
27. Heravi-Moussavi A, Anglesio MS, Cheng S-WG et al. (2012) Recurrent Somatic DICER1 Mutations in Nonepithelial Ovarian Cancers. *New England Journal of Medicine* 366(3): 234–242. doi: 10.1056/NEJMoa1102903
28. Anglesio MS, Wang Y, Yang W et al. (2013) Cancer-associated somatic DICER1 hotspot mutations cause defective miRNA processing and reverse-strand expression bias to predominantly mature 3p strands through loss of 5p strand cleavage. *The Journal of Pathology* 229(3): 400–409. doi: 10.1002/path.4135
29. Wang Y, Chen J, Yang W et al. (2015) The Oncogenic Roles of DICER1 RNase IIIb Domain Mutations in Ovarian Sertoli-Leydig Cell Tumors. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 17(8): 650–660. doi: 10.1016/j.neo.2015.08.003
30. Shah SP, Köbel M, Senz J et al. (2009) Mutation of FOXL2 in Granulosa-Cell Tumors of the Ovary. *New England Journal of Medicine* 360(26): 2719–2729. doi: 10.1056/NEJMoa0902542
31. Al-Agha OM, Huwait HF, Chow C et al. (2011) FOXL2 Is a Sensitive and Specific Marker for Sex Cord-Stromal Tumors of the Ovary. *The American Journal of Surgical Pathology* 35(4): 484–494. doi: 10.1097/PAS.0b013e31820a406c

32. Crisponi L, Deiana M, Loi A et al. (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics* 27: 159-166. doi: 10.1038/84781
33. Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F et al. (2002) Evolution and expression of FOXL2. *Journal of Medical Genetics* 39(12): 916–921. doi: 10.1136/jmg.39.12.916
34. Ellsworth BS, Burns AT, Escudero KW et al. (2003) The gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor activating sequence (GRAS) is a composite regulatory element that interacts with multiple classes of transcription factors including Smads, AP-1 and a forkhead DNA binding protein. *Molecular and Cellular Endocrinology* 206(1): 93–111. doi: 10.1016/S0303-7207(03)00235-1
35. Pisarska MD, Bae J, Klein C et al. (2004) Forkhead L2 Is Expressed in the Ovary and Represses the Promoter Activity of the Steroidogenic Acute Regulatory Gene. *Endocrinology* 145(7): 3424–3433. doi: 10.1210/en.2003-1141
36. Benayoun BA, Georges AB, L'Hôte D et al. (2011) Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Human Molecular Genetics* 20(9): 1673–1686. doi: 10.1093/hmg/ddr042
37. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K et al. (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131(4): 933–942
38. Rosario R, Araki H, Print CG et al. (2012) The Transcriptional Targets of Mutant FOXL2 in Granulosa Cell Tumours. *PLoS ONE* 7(9): e46270. doi: 10.1371/journal.pone.0046270
39. Garcia-Ortiz JE, Pelosi E, Omari S et al. (2009) Foxl2 functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development. *BMC Developmental Biology* 9(36). doi: 10.1186/1471-213X-9-36
40. Batista F, Vaiman D, Dausset J et al. (2006) Potential targets of FOXL2, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development, identified by transcriptomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(9): 3330–3335. doi: 10.1073/pnas.0611326104
41. Kim JH, Yoon S, Park M et al. (2011) Differential apoptotic activities of wild-type FOXL2 and the adult-type granulosa cell tumor-associated mutant FOXL2 (C134W). *Oncogene* 30(14): 1653–1663
42. Fleming NI, Knowler KC, Lazarus KA et al. (2010) Aromatase Is a Direct Target of FOXL2: C134W in Granulosa Cell Tumors via a Single Highly Conserved Binding Site in the Ovarian Specific Promoter. *PLoS ONE* 5(12): e14389. doi: 10.1371/journal.pone.0014389
43. Leung DTH, Fuller PJ, Chu S (2016) Impact of FOXL2 mutations on signaling in ovarian granulosa cell tumors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 72(Supplement C): 51–54. doi: 10.1016/j.biocel.2016.01.003
44. QIAGEN (2014) RNeasy® FFPE Handbook: For purification of total RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=7b8ed707-c2d6-4b9e-a1ba-8893935622f9&lang=en>. Accessed 04 Apr 2018
45. QIAGEN (2012) QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook: For purification of genomic DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

- <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=63a84dc7-d904-418e-b71a-1521cf318e82&lang=en>. Accessed 04 Apr 2018
46. Life Technologies (2015) Qubit® dsDNA BR Assay Kits: For use with the Qubit® Fluorometer (all models). <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32850>. Accessed 04 Apr 2018
 47. Applied Biosystems (2010) Allelic Discrimination Getting Started Guide: Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_042114.pdf. Accessed 12 Mar 2019
 48. Karnezis AN, Wang Y, Keul J et al. (2019) DICER1 and FOXL2 Mutation Status Correlates With Clinicopathologic Features in Ovarian Sertoli-Leydig Cell Tumors. *The American Journal of Surgical Pathology* 43(5)
 49. Keul J., Kommos F., Gilks B. et al. (2018) Second opinion expert pathology in ovarian malignant germ cell and sex cord – stromal tumors (SCST). *Oncol Res Treat* 41(suppl 1)(Suppl. 1): 91–92. doi: 10.1159/000487109
 50. Kommos S, Pfisterer J, Du Bois A et al. (2014) Spezialisierte histopathologische Zweitbegutachtung fortgeschrittener Ovarialkarzinome. *Der Pathologe* 35(4): 355–360. doi: 10.1007/s00292-014-1911-5
 51. Goulvent Thibault, Ray-Coquard Isabelle, Borel Stéphane et al. (2015) DICER1 and FOXL2 mutations in ovarian sex cord–stromal tumours: A GINECO Group study. *Histopathology* 68(2): 279–285. doi: 10.1111/his.12747
 52. Schultz KAP, Harris AK, Finch M et al. (2017) *DICER1*-related Sertoli-Leydig cell tumor and gynandroblastoma: Clinical and genetic findings from the International Ovarian and Testicular Stromal Tumor Registry. *Gynecologic Oncology* 147(3): 521–527. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.09.034
 53. Kock L de, Terzic T, McCluggage WG et al. (2017) DICER1 Mutations Are Consistently Present in Moderately and Poorly Differentiated Sertoli-Leydig Cell Tumors. *The American Journal of Surgical Pathology* 41(9)
 54. Kato N, Kusumi T, Kamataki A et al. (2017) *DICER1* hotspot mutations in ovarian Sertoli-Leydig cell tumors: A potential association with androgenic effects. *Human Pathology* 59: 41–47. doi: 10.1016/j.humpath.2016.09.005
 55. Stewart CJR, Alexiadis M, Crook ML et al. (2013) An immunohistochemical and molecular analysis of problematic and unclassified ovarian sex cord–stromal tumors. *Human Pathology* 44(12): 2774–2781. doi: 10.1016/j.humpath.2013.07.028
 56. Kommos S, Gilks CB, Du Bois A et al. (2016) Ovarian carcinoma diagnosis: The clinical impact of 15 years of change. *British Journal of Cancer* 115(8): 993–999. doi: 10.1038/bjc.2016.273
 57. Mark EJ, Oliva E, Young RH (2013) Robert E. Scully, MD. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 137(5): 599–600. doi: 10.5858/arpa.2012-0724-IM

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Universitätsfrauenklinik Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Stefan Kommoss durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. med. Friedrich Kommoss und Prof. Dr. med. Stefan Kommoss.

Folgende Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Jamie Magrill, Winnie Yang und Amy Lum von mir persönlich durchgeführt:

- Entnahme der Tumorblockproben mittels Stanzbiopsie
- Extraktion von DNA/RNA mit dem DNA FFPE Kit bzw. miRNeasy FFPE Kit
- TaqMan allelic discrimination assay für die Foxl2 – Mutationsanalyse
- Vorbereitung der Sequenzierung nach Sanger für die Dicer1 – Mutationstestung mit Polymerasekettenreaktion (PCR), Gelelektrophorese, Reinigung der Proben mit ExoSap, Konzentrationsmessung und Vorbereiten der Sequenzierungsplatten zum Versenden

Die eigentliche Sequenzierung nach Sanger wurde durch Source Bioscience durchgeführt. Die Next Generation Sequenzierung wurde durch Mitarbeiter des BC Cancer Research Centre durchgeführt.

Die Erstellung des Fragebogens und die aufwändige Erhebung der klinischen Daten der Fälle aus Mannheim und Tübingen erfolgte eigenständig durch mich. Die klinischen Daten der kanadischen Fälle wurden vom General Hospital Vancouver zur Verfügung gestellt. Die Zusammenführung der Daten sowie die statistische Auswertung wurde eigenständig von mir durchgeführt.

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

Tübingen, den _____

10. Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Dr. med. Stefan Kommos, Universitätsfrauenklinik Tübingen, für das Angebot dieses Themas, die Möglichkeit eines Forschungsaufenthaltes im Ausland und für die exzellente Betreuung über den gesamten Zeitraum.

Ich möchte mich weiterhin herzlichst bei Prof. Dr. med. Friedrich Kommos für die Bereitstellung der Fälle, die Betreuung während meines Forschungsaufenthaltes in Vancouver und die lehrreichen Vorbereitungstreffen für die Kongresspräsentationen sowie die Möglichkeit vor dem Qualitätszirkel Bodensee zu sprechen bedanken.

Für die Ermöglichung und Unterstützung meines Forschungsaufenthaltes am BC Cancer Research Centre, Vancouver, bedanke ich mich bei Dr. David Huntsman als Direktor des Ovarian Cancer Research Teams sowie Yemin Wang als Projektleiter.

Für die gute und kompetente Einarbeitung im Labor sowie die schöne Zeit in Vancouver mit hilfreichen Insidertipps und leckeren Arbeitsessen möchte ich mich bei Jamie Magrill, Basile Tessier-Cloutier, Jessica Pilsworth, Amy Lum und Wynnie Yang bedanken.

Herausragende Unterstützung in Form von Bereitstellung der Tumorblöcke und der histologischen Befunde habe ich durch das pathologische Institut Tübingen erhalten, hier gilt mein Dank vor allem PD Dr. med. Annette Stäbler und Karen Greif.

Für die freundliche Überlassung von Tumorblöcken und die Möglichkeit, die histologischen Befunde zu sichten, möchte ich stellvertretend für das SYNLAB MVZ Pathologie Mannheim Dr. med. Marcus Trunk und Nadine Schmahl meinen Dank aussprechen.

Dr. med. Katharina Zaby und Frau Friederike Grevenkamp haben mich dankenswerterweise mit ihren Vorarbeiten in der CORSETT – Studie und durch das Heraussuchen von Tumorblöcke unterstützt.

Ich möchte mich auch herzlich bei meinen fleißigen Korrekturlesern, insbesondere Wolfram Kobes, bedanken.

Meinen geliebten Eltern Lisa und Dr. med. Hans Georg Keul möchte ich von ganzem Herzen für ihre ständige Unterstützung nicht nur im Medizinstudium sondern auch in allen anderen Lebenslagen danken.

Während der gesamten Zeit als Doktorandin hat Jannik mich verständnisvoll unterstützt und alle meine Entscheidungen mitgetragen, dafür gebührt ihm in großer Liebe mein besonderer Dank.