

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Pathologisches Institut

Direktor: Prof. Dr. Guido Sauter

**Der Einfluss von p53 medierter genetischer Instabilität auf die
Entstehung von PIK3CA-Amplifikationen in malignen
Ovarialtumoren**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Marie Sewing
aus Bonn

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.07.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. F. Jänicke

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Das Ovarialkarzinom.....	7
1.1.1	Arbeitshypothese und Fragestellung	7
1.1.2	Klassifikation und Pathologie maligner Ovarialtumore	8
1.1.3	Epidemiologie des Ovarialkarzinoms.....	14
1.1.4	Risikofaktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms.....	15
1.1.5	Prognostische Faktoren	17
1.1.6	Therapie des Ovarialkarzinoms.....	17
1.1.6.1	Primärtherapie des Ovarialkarzinoms	17
1.1.6.2	Zukunftsaussichten in der Therapie.....	18
1.2	Häufige molekulare Veränderungen beim Ovarialkarzinom.....	20
1.2.1	Hereditäres Ovarialkarzinom	20
1.2.2	Sporadisches Ovarialkarzinom.....	20
1.3	p53.....	22
1.3.1	Struktureller Aufbau des p53-Proteins	22
1.3.2	Funktion des p53-Proteins.....	23
1.3.2.1	Aktivierungswege von p53.....	24
1.3.2.2	Effekte einer p53-Aktivierung.....	25
1.3.2.3	p53 und genetische Stabilität.....	26
1.3.3	Mutiertes p53.....	27
1.3.4	p53 und Ovarialkarzinome	29
1.4	PIK3CA	30
1.4.1	Klassifizierung, Funktion und Aufbau	30
1.4.2	Das onkogene Potential des PIK3CA.....	33
1.4.3	PIK3CA und Ovarialkarzinome	33
2	Material und Methoden	35
2.1	Material.....	35
2.1.1	Untersuchungsmaterial	35
2.1.2	Patientenkollektiv	35

2.2	Methoden	38
2.2.1	Herstellung des Tissue Micro Arrays (TMA).....	38
2.2.2	Immunhistochemie (IHC).....	39
2.2.3	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	41
2.2.4	Statistik	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Allgemeine Ergebnisse	46
3.2	Nukleäre p53-Anreicherung	47
3.2.1	Immunhistochemie (IHC).....	47
3.2.2	Prognoserelevanz der p53-Positivität	49
3.3	PIK3CA-Amplifikation	50
3.3.1	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	50
3.3.2	Prognoserelevanz der PIK3CA-Amplifikation.....	52
3.4	Assoziation zwischen dem p53-Status und der PIK3CA-Amplifikation	53
3.4.1	Überlebenszeiten in Abhängigkeit des p53- und des PIK3CA-Status ...	53
3.4.2	Multivariate Analyse	54
4	Diskussion.....	56
5	Zusammenfassung	75
6	Abkürzungsverzeichnis	77
7	Literaturverzeichnis	79
8	Danksagung.....	94
9	Eidesstattliche Versicherung	95

1 Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist aus diagnostischer und therapeutischer Sicht eine der herausforderndsten Erkrankungen des weiblichen Genitale. Durch fehlende Symptome in der Frühphase und nur unzureichende Möglichkeiten der Vorsorge (Tavassoli und Devilee, 2003) ist der Tumor bei Diagnosestellung häufig schon weit fortgeschritten (Cannistra, 2004). Bei der Operation findet man meist Tumormanifestationen im gesamten Bauchraum (Tavassoli und Devilee, 2003). Die durchschnittliche Lebenserwartung ist in diesem Stadium (FIGO III/IV; Tab. 1) ausgesprochen schlecht, sodass die Patientinnen häufig nach wenigen Monaten an ihrer Erkrankung versterben (Heintz et al., 2006).

Trotz großer wissenschaftlicher Bemühungen bleiben Ätiologie und Pathogenese des Ovarialkarzinoms noch weitgehend unklar. Diese künftig besser zu verstehen birgt die Hoffnung, das Ovarialkarzinom früher zu erkennen und durch das Verständnis der molekularen Tumorgenese gezielter und damit effektiver therapieren zu können. Auf diese Weise könnten die Überlebenschancen der betroffenen Patientinnen verbessert werden.

1.1.1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Für das Verständnis von Entstehung und Progression karzinomatöser Erkrankungen ist die Akkumulation genetischer Veränderungen innerhalb einer Zelle von entscheidender Bedeutung (Loeb, 1991). Zu den häufigsten genetischen Veränderungen in humanen Ovarialkarzinomen zählen *p53*-Mutationen und *PIK3CA*-Amplifikationen (Deligdisch et al., 1995; Frank et al., 1994; Kohler et al., 1993; Kupryjanczyk et al., 1993; McManus et al., 1994; Milner et al., 1993; Okamoto et al., 1991; Schlosshauer et al., 2003; Shayesteh et al., 1999). Das *p53*-Gen ist in seiner Funktion als Tumorsuppressorgen ein Schlüsselgen zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität (Lane, 1992). Die Entstehung von Genamplifikationen wird im Zusammenhang mit einem Verlust der normalen *p53*-Funktion gesehen (Livingstone et al., 1992; Yin et al., 1992). In Plattenepithel-Karzinomen der Kopf- und Hals-Region wird das Vorkommen von *PIK3CA*-Amplifikationen als unabhängiger Prognosefaktor beschrieben, von dem

auf Tumoraggressivität und Langzeitüberleben geschlossen werden kann (Singh et al., 2002b). Ziel dieser Arbeit war es, an einem Kollektiv von über 400 Patientinnen zu untersuchen, ob eine *p53*-vermittelte genetische Instabilität für die hohe Rate der *PIK3CA*-Amplifikationen in Ovarialkarzinomen verantwortlich ist. Daneben sollten weitere Daten zum Zusammenhang zwischen *p53*-Alterationen, *PIK3CA*-Amplifikationen, Tumorphänotyp und Patientenprognose gewonnen werden. Die Ergebnisse sollen zum weiteren Verständnis der Entstehung und Progression von Ovarialtumoren beitragen, womit nicht nur die Grundlage zur Entwicklung innovativer Therapien geschaffen wird, sondern auch die Basis für die Identifizierung neuer Marker im Hinblick auf Diagnose, Screening und der Einschätzung der Patientenprognose.

1.1.2 Klassifikation und Pathologie maligner Ovarialtumore

Das Ovar besteht histopathologisch aus drei unterschiedlichen Komponenten: Dem Oberflächenepithel (Keimepithel, paramesonephrisches Zölom oder Müller-Gang-Epithel), dem Stroma (sexuell differenziertes Gonadenmesenchym mit Theka- und Granulosazellen, luteinisierten und enzymaktiven Stromazellen, sowie Leydig- und Sertolizellen) und den Keimzellen (Eizellen) (Koonings et al., 1989). Da alle drei Gewebearten Ausgangsort von Tumoren sein können (Koonings et al., 1989), unterteilt die WHO die Ovarialtumore in die drei Hauptgruppen der epithelialen Tumore (Ovarialkarzinome), der Keimstrang-Stroma-Tumore und der Keimzelltumore (Tab. 2) (Scully und Sobin, 1999; Tavassoli und Devilee, 2003). Die weitere Einteilung innerhalb der Hauptgruppen erfolgt unter Berücksichtigung der Zelldifferenzierung (serös, muzinös, endometroid, klarzellig, transitionalzellige, plattenepitheliale und gemischte Typen) und des jeweiligen Wachstumsmusters. Ergänzt werden die Hauptgruppen durch einige seltene Tumortypen und durch Metastasen extraovarieller Herkunft (Tab. 3) (Scully und Sobin, 1999; Tavassoli und Devilee, 2003).

Da die Gruppe der epithelialen Neoplasien sowohl in der vorliegenden Arbeit, als auch allgemein mit einem Anteil von etwa 65% unter allen Ovarialtumoren und bis zu 90% unter den primär bösartigen Ovarialtumoren die größte Gruppe darstellt (Scully und Sobin, 1999; Tavassoli und Devilee, 2003), soll auf diese Tumorgruppe gesondert eingegangen werden.

Es wird davon ausgegangen, dass die epithelialen Tumore aufgrund maligner Transformationen des Oberflächenepithels entstehen (Tavassoli und Devilee, 2003). Während der Ovulation kommt es zu Invaginationen des Epithels, die als Inklusionszysten imponieren und vermutlich den Ursprungsort dieser Art von Karzinomen darstellen (Saigo, 1993; Tavassoli und Devilee, 2003). Es ist nicht vollends geklärt, ob die Transformation zum invasiven Karzinom direkt (*de novo*) erfolgt (Chan et al., 2000; Seidman und Kurman, 2003; Singer et al., 2003; Teneriello et al., 1993), oder ob benigne Tumore und die Borderline-Tumore (Tumore mit geringem Malignitätspotenzial) etwaige Zwischenstufen darstellen (Evans et al., 1999; Matias-Guiu und Prat, 1998; Vang et al., 2009). Borderline-Tumore zeigen im Gegensatz zu Karzinomen als charakteristisches Merkmal kein invasives und destruktives Wachstum (Kommoss et al., 2001).

Die serösen Tumore bilden mit 30-40% in der westlichen Welt die größte Gruppe unter allen Ovarialtumoren. Darunter sind etwa 70% benigne, weitere 5-10% sind als Borderline-Tumore zu klassifizieren und 20-25% stellen invasive Karzinome dar. Das mittlere Erkrankungsalter der Frauen mit serösem Ovarialkarzinom liegt bei 56 Jahren (Scully et al., 1998). In 50-80% der Fälle sind beide Ovarien betroffen. Im Stadium I zeigt nur ein Drittel der Fälle einen bilateralen Befall (Tavassoli und Devilee, 2003). Makroskopisch erkennt man zystisch-papilläre Tumore mit teils soliden, bröckeligen, multinodulären Anteilen. Nicht selten findet man in entdifferenzierten Tumoren Nekroseherde und Einblutungen (Tavassoli und Devilee, 2003). Bei unversehrter Kapsel erscheint die ovarielle Oberfläche glatt (Saigo, 1993). Die Histologie zeigt eine eindeutige Stromainvasion. Die Gewebsarchitektur variiert zwischen drüsenartigen, papillären und soliden Anteilen. Die Drüsenanteile sind typischerweise schlitzartig und irregulär angeordnet, die papillären Strukturen weisen häufig abnorme Verzweigungen auf. Vereinzelt finden sich Psammomkörperchen. Das Stroma erscheint häufig nur noch spärlich oder ist bereits desmoplastisch (Tavassoli und Devilee, 2003).

Die muzinösen Tumore sind unter allen Ovarialtumoren mit etwa 10-15% vertreten. Davon sind etwa 75% benigne, 10% Borderline-Tumore und 15% invasive Karzinome (Koonings et al., 1989). Überwiegend sind Frauen in der fünften Lebensdekade betroffen. Der Tumor manifestiert sich häufig nur einseitig. In 5% sind beide Ovarien betroffen. Er ist durch sein hochprismatisches, Schleim bildendes Epithel charakterisiert. Der makroskopische Befund weist solide schwammige Schnittflächen

auf, mitunter auch mikrozystische Bezirke neben großen gekammerten Hohlräumen, die mit visköser Flüssigkeit gefüllt sind (Tavassoli und Devilee, 2003). Entdifferenzierten Karzinomen geht die Fähigkeit zur Schleimbildung verloren. Das mikroskopische Bild zeigt jedoch meist gut differenzierte Tumore mit charakteristischem dem endozervikalen Gewebe ähnelndem Zellbild (Saigo, 1993), welches durch irreguläre atypische Drüsenschläuche sowie solide Komplexe gekennzeichnet ist (Tavassoli und Devilee, 2003). Die Differenzierung zu Metastasen interstitieller Herkunft, meist von Tumoren aus Kolon und Pankreas, stellt eine Herausforderung dar (Prat, 2005; Tavassoli und Devilee, 2003).

Endometroide Tumore machen etwa 2-4% aller Ovarialtumore aus. Benigne endometroide Ovarialtumore - meistens Adenofibrome - sind unter den benignen Ovarialtumoren mit weniger als 1% vertreten, unter den Borderline-Tumoren sind etwa 2-3% endometroid und unter den Ovarialkarzinomen finden sich 10-20% endometroide Tumore. Ihr Häufigkeitsgipfel liegt in der peri- bzw. postmenopausalen Phase bei einem mittleren Erkrankungsalter von etwa 51 bis 56 Jahren (Scully et al., 1998). Etwa 17% der Fälle zeigen im Stadium I einen bilateralen Befall. Das makroskopische Erscheinungsbild zeigt Tumore mit bröckelig-soliden, zum Teil auch zystischen Anteilen, häufig durchsetzt von Nekrosen und Einblutungen (Tavassoli und Devilee, 2003). Eine Assoziation zur Endometriose ist anzunehmen, deren Entartungsrate bei etwa 2% liegt (Saigo, 1993). In etwa 42% finden sich Endometrioseherde am selben Ovar oder an anderen Stellen im Bereich des Beckens (DePriest et al., 1992; Fukunaga et al., 1997; Heaps et al., 1990; Mostoufizadeh und Scully, 1980). In 15-20% der Fälle beobachtet man eine Assoziation zu Karzinomen oder atypischen Hyperplasien des Endometriums (Eifel et al., 1982; Falkenberry et al., 1996; Kline et al., 1990; Ulbright und Roth, 1985; Zaino et al., 1984). Die Differenzierung zwischen einem primären endometroiden Ovarialkarzinom und einer Ovarialmetastase, bedingt durch ein Endometriumkarzinom, gestaltet sich mitunter schwierig (Saigo, 1993).

Klarzellige Tumore bestehen aus verschiedenartigen epithelialen Zelltypen. Sie enthalten große polygonale Tumorzellen mit klarem bis eosinophilem Zytoplasma, ähnlich den Zellen des Nierenzellkarzinoms, sowie zytoplasmaarme Zellen mit großen, luminal vorspringenden Kernen. Die Zellen sind in soliden Nestern angeordnet oder bilden tubozystische Drüsen oder Mikropapillen. Unter den epithelialen Ovarialtumoren sind die klarzelligen Karzinome mit 6% vertreten (Scully et al., 1998). Die meisten

klarzelligen Karzinome werden zwischen der fünften und siebten Lebensdekade diagnostiziert (Crozier et al., 1989; Komiyama et al., 1999; Montag et al., 1989). Benigne Tumore und Borderline-Tumore sind selten und häufig Adenofibrome (Tavassoli und Devilee, 2003). Klarzellige Karzinome weisen ebenfalls eine hohe Assoziation zur Endometriose auf. In 20-25% besteht eine Assoziation zum Endometriumkarzinom (Brescia et al., 1989; Scully und Barlow, 1967; Scully et al., 1998).

Tabelle 1: FIGO- und TNM-Klassifikation der Ovarialkarzinome (Wittekind und Wagner, 1997)

FIGO	Ovar	TNM
I	Tumor begrenzt auf Ovarien	T1
IA	Ein Ovar, Kapsel intakt	T1a
IB	Beide Ovarien, Kapsel intakt	T1b
IC	Kapselruptur, Tumor an der Oberfläche, maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung	T1c
II	Ausbreitung im Becken	T2
IIA	Uterus, Tube(n)	T2a
IIB	Andere Beckengewebe	T2b
IIC	maligne Zellen im Aszites oder positive Peritonealspülung	T2c
III	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen	T3 und/oder N1
IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastase(n)	T3a
IIIB	Makroskopische Peritonealmetastase(n) ≤ 2 cm	T3b
IIIC	Peritonealmetastase(n) > 2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen	T3c und/oder N1
IV	Fernmetastasen	M1

Tabelle 2: Histologische Klassifikation maligner Ovarialtumore - Hauptgruppen; nach WHO 2003, reduziert auf maligne und potenziell maligne Tumore des Ovars (Scully und Sobin, 1999; Tavassoli und Devilee, 2003)

Hauptgruppen	
Oberflächenepithel-Stromatumore (bis 90 %)	
Seröse Tumore	Borderline-Malignität Maligne Tumore - Adenokarzinom - oberflächliches papilläres Adenokarzinom - malignes Adenofibrom
Muzinöse Tumore, endozervikale und intestinale Typen	Borderline-Malignität - intestinaler Typ - endozervikaler Typ Maligne Tumore - Adenokarzinom - malignes Adenofibrom
Endometroide Tumore (mit oder ohne plattenepithelialer Differenzierung)	Borderline-Malignität Maligne Tumore - Adenokarzinom - malignes Adenofibrom - Müller-Mischtumor (Karzinosarkom) - Adenosarkom
Klarzellige Tumore	Borderline-Malignität Maligne Tumore - Adenokarzinom - malignes Adenofibrom
Transitionalzellige Tumore	Borderline-Malignität - Borderline Brenner-Tumor (proliferierend) Maligne Tumore - maligner Brenner-Tumor - Transitionalzellkarzinom (nicht Brenner-Typ)
Plattenepithelkarzinome	
Epitheliale Mischtumore (Formen spezifiziert)	Borderline-Malignität Maligne Tumore
Undifferenzierte und unklassifizierte Karzinome	
Keimstrang-Stromatumore (5 bis 8 %)	
Granulosa-Stromazelltumore	Granulosazelltumore Thekom-Fibrom-Gruppe
Sertoli-Stromazelltumore	Androblastome: gut-, intermediär-, schlecht-differenziert (sarkomatös), Retiform Sertolizelltumor Sertoli-Leydigzelltumor
Keimstrang-Stromatumore (gemischt, unklassifiziert)	Keimstrang-Stromatumore mit annulären Tubuli Gynandroblastom unklassifiziert
Steroid - (Lipid -) Zelltumore	Leydigzelltumor unklassifiziert
Keimzelltumore (2 bis 5 %)	
Dysgerminom	Variante – mit Synzytiotrophoblastzellen
Dottersacktumor (Endodermaler Sinustumor)	Variante – polyvesikulärer vitelliner Tumor Variante – glandulär Variante – hepatoid
Embryonales Karzinom	
Polyembryom	
Chorionkarzinom	
Teratom	
Gemischte Keimzelltumore	

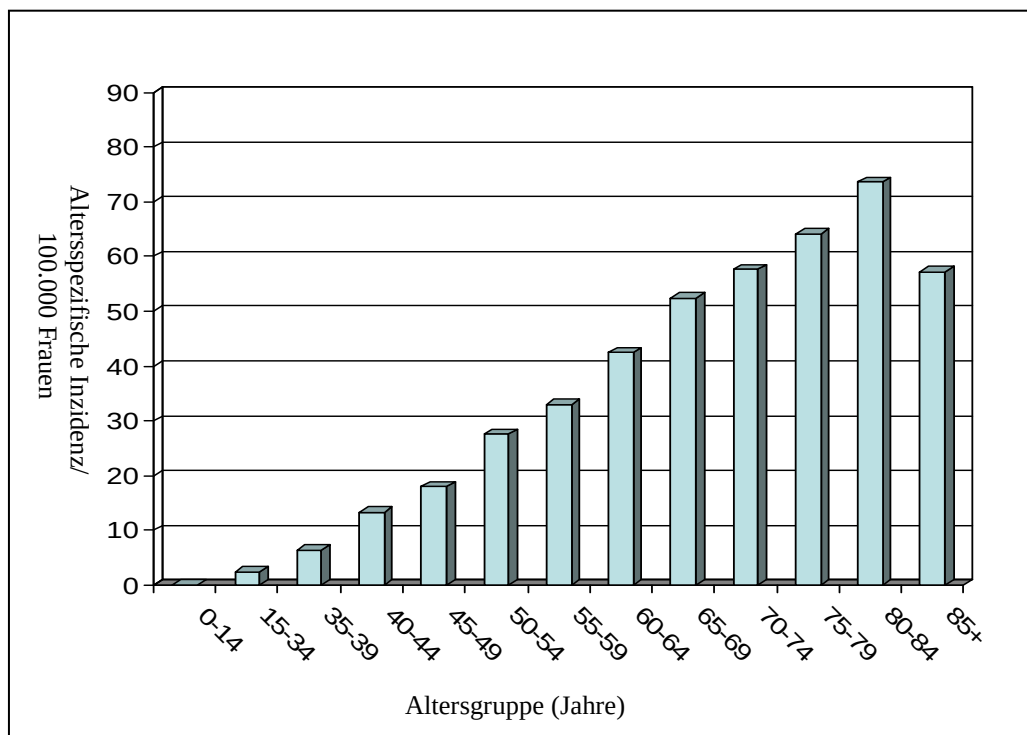
Tabelle 3: Histologische Klassifikation maligner Ovarialtumore - Seltene Tumorgruppen; nach WHO 2003, reduziert auf maligne und potenziell maligne Tumore des Ovars (Scully und Sobin, 1999; Tavassoli und Devilee, 2003)

Seltene Tumorgruppen
Gonadoblastom
Variante – mit Dysgerminom oder anderem Keimzelltumor
Keimzell-Keimstrangstroma-Tumor
Variante – mit Dysgerminom oder anderem Keimzelltumor
Tumoren des Rete ovarii
Adenokarzinom
Sonstige Tumore
Kleinzelliges Karzinom Tumore Wolff'schen Ursprungs Hepatoides Karzinom Mesotheliom Wilms Tumor Weichgewebstumore, nicht ovarspezifisch Gestationale trophoblastische Erkrankungen
Maligne Lymphome, Leukämien und Plasmozytome
Unklassifizierbare Tumore
Metastasen

1.1.3 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom ist nach dem Endometriumkarzinom die zweithäufigste maligne Neoplasie unter den weiblichen Genitaltumoren. Nach den Daten der Krebsregistrierung des Robert-Koch-Institutes (RKI) bis 2006 steht diese Erkrankung unter allen Krebsneuerkrankungen der Frauen in Deutschland mit einem Anteil von 4,9% an fünfter Stelle hinter bösartigen Neubildungen der Brust, des Darms, der Lunge und des Gebärmutterkörpers (Robert-Koch-Institut, 2010b). Die Diagnose des Ovarialkarzinoms wurde 2006 in Deutschland bei 9.670 Frauen gestellt, 5.636 Patientinnen sind an dieser Erkrankung verstorben. Mit einem Anteil von 5,7% an allen Krebssterbefällen der Frauen in Deutschland hat das Ovarialkarzinom die höchste Mortalität unter den gynäkologischen Tumoren und ist die fünfthäufigste Krebstodesursache nach Brustkrebs, Darmkrebs, dem Bronchial- und dem Pankreaskarzinom (Robert-Koch-Institut, 2010b).

Abbildung 1: Altersspezifische Inzidenzraten in Deutschland 2006, Krebserkrankungen der Eierstöcke



Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen unterteilt in Altersgruppen (Robert-Koch-Institut, 2010a)

Eine Übersicht der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland im Jahre 2006 gibt Abbildung 1. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken und erreicht zwischen dem 80ten und 84ten Lebensjahr seinen Gipfel, bei

einem mittleren Erkrankungsalter bei Diagnosestellung von 68 Jahren (Robert-Koch-Institut, 2010b). Das hereditäre Ovarialkarzinom tritt im Schnitt etwa 10 Jahre früher auf (Boyd und Rubin, 1997). Rund 5-10% aller Ovarialkrebserkrankungen betreffen Frauen unter 45 Jahren und sind vorwiegend vom Typ des Keimzelltumors. Das Lebenszeitrisko für eine Frau an einen malignen Ovarialtumor zu erkranken liegt bei etwa 1,4% (Cramer, 2000). Während in Nordeuropa, Israel und den USA hohe Inzidenzraten auftreten, weisen Japan und die Entwicklungsländer niedrigere Fallzahlen auf. Auch unter einzelnen ethnischen Gruppen existieren signifikante Unterschiede. In den USA sind die Inzidenzen unter der weißen Bevölkerung am höchsten, gefolgt von Afroamerikanerinnen, Hispanierinnen und Amerikanerinnen asiatischer Herkunft. Am niedrigsten ist die Erkrankungsrate bei amerikanischen Ureinwohnern (Runnebaum und Stickeler, 2001). Im internationalen Vergleich liegen die Inzidenzen in England, Dänemark, Tschechien und Norwegen am höchsten, wohingegen Australien, die Niederlande, Frankreich und die Schweiz niedrigere Inzidenzraten aufweisen. Die Erkrankungsraten in Deutschland liegen verglichen mit denen anderer EU-Länder in der oberen Hälfte (Robert-Koch-Institut, 2010b). Im Trendverlauf zeigt sich, dass die Anzahl der Neuerkrankungen in den letzten drei Jahrzehnten leicht angestiegen ist, die Mortalitätsraten seit den 1980er Jahren jedoch signifikant abnehmen (Robert-Koch-Institut, 2010c).

1.1.4 Risikofaktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Einige Risikofaktoren sind jedoch bekannt. Mit zunehmendem Lebensalter steigt wie bei vielen anderen Malignomen auch beim Ovarialkarzinom die Erkrankungshäufigkeit an (AGO, 2007). Umweltfaktoren (z.B. Asbest, Talkpuder) und Ernährungseinflüsse (z.B. Fleisch, tierische Fette) scheinen ebenfalls Einfluss auf das Erkrankungsrisiko zu nehmen. Auch die geographische und demographische Herkunft ist in das individuelle Risikoprofil mit einzubeziehen (Runnebaum und Stickeler, 2001).

Besonders aber scheint die Entstehung des Ovarialkarzinoms von langjährigen hormonellen Einflüssen abhängig zu sein (Robert-Koch-Institut, 2010b). Die Anzahl der ovulatorischen Zyklen spielt hierbei eine gesonderte Rolle. *Fathalla* beschrieb 1971 erstmals den Zusammenhang zwischen dem immer wiederkehrenden Ereignis der Ovulation ("Incessant Ovulation") und dem Auftreten von Ovarialkarzinomen.

Demnach entstehen durch die Ovulationsprozesse Mikrotraumen im Oberflächenepithel des Ovars. Durch fehlerhafte Reparaturprozesse kann es auf der Basis spontaner Mutationen infolge zur Karzinomentwicklung kommen (Fathalla, 1971). Nulliparität (Hankinson et al., 1995; Risch et al., 1994), fehlende Stillzeiten, eine frühe Menarche und eine späte Menopause (Robert-Koch-Institut, 2010b), ungeklärte Unfruchtbarkeit (Bristow und Karlan, 1996) sowie die längere Einnahme ovulationsauslösender Medikamente bei unerfülltem Kinderwunsch werden dementsprechend aufgrund der damit assoziierten gesteigerten Anzahl an Ovulationen (bezogen auf die gesamte Lebensspanne) mit einem erhöhten Risiko in Zusammenhang gebracht. Im Gegensatz dazu werden eine vermehrte Anzahl ausgetragener Schwangerschaften (Hankinson et al., 1995; Risch et al., 1994) und die Einnahme von hormonellen Ovulationshemmern (auch beim hereditären Ovarialkarzinom) als protektive Faktoren angesehen (Holschneider und Berek, 2000). Die protektive Wirkung der "Pille" ist dabei vermutlich nicht nur auf die Unterdrückung der Ovulation, sondern auch auf eine durch das in Ovulationshemmern enthaltene Progestin zurückzuführen, welches eine erhöhte Apoptoserate einschließlich mutierter Epithelzellen induziert (Wenham et al., 2002).

Die familiäre Vorbelastung spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Über 90% der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf. 5-10% sind jedoch familiär und vorwiegend auf Mutationen der *BRCA1* und/oder *BRCA2* Gene zurückzuführen (AGO, 2007; Holschneider und Berek, 2000). Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht für Frauen, deren Verwandte an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt sind sowie für Frauen, die selbst bereits an Brust-, Gebärmutterkörper- oder Darmkrebs erkrankt sind (Robert-Koch-Institut, 2010b). Während das allgemeine Lebenszeitrisko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken bei etwa 1,4% liegt, steigt das Risiko bei Frauen mit erkrankten Verwandten ersten Grades schon auf 5%. Sind sogar zwei Verwandte ersten Grades erkrankt, liegt das Lebenszeitrisko bereits bei 7% (Werness und Eltabbakh, 2001). Ein generelles Screening zur Früherkennung des Ovarialkarzinoms bei Hochrisikopatientinnen wird von der *Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.* (AGO) momentan jedoch nicht empfohlen. Nach derzeitiger Datenlage kann eine erfolgreiche Früherkennung durch routinemäßig durchgeführte Vaginalsonographie und der regelmäßigen Bestimmung des Tumormarkers *CA 125* nicht erreicht werden und folglich die Mortalität nicht senken (AGO, 2007). Patientinnen mit einem hohen Risiko für ein hereditäres Ovarialkarzinom sollte nach abgeschlossener Familienplanung zur primären Prävention eine prophylaktische beidseitige Salpingo-Ovarektomie empfohlen

werden, da hiermit die effektivste Risikosenkung erreicht werden kann (Rosen et al., 2004).

1.1.5 Prognostische Faktoren

Die Prognose von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen wird in erster Linie anhand klinischer Parameter ermittelt. Allgemein anerkannte multivariat signifikante Parameter für eine schlechte Prognose sind fortgeschrittenes Tumorstadium, erhöhtes Tumorgrading, klarzelliger oder muzinöser histologischer Tumortyp sowie erhöhtes Alter (>60 Jahre), ein schlechter Allgemeinzustand (Karnofky-Index < 70%) und jeglicher postoperativ verbleibender Tumorrest (AGO, 2007).

Der nach initialer Operation verbleibende Tumorrest ist einer der stärksten prognostischen Faktoren und der einzige, der durch das Team der behandelnden Ärzte aktiv zu beeinflussen ist. Maximale zytoreduktive Operationen durch einen erfahrenen Operateur korrelieren mit einem erheblich besseren Langzeitüberleben (Bristow et al., 2002). Zusatzinformationen ergeben sich aus verschiedenen tumorbiologischen Eigenschaften, die Informationen über Proliferation, Invasion und Metastasierung liefern. Dazu gehören unter anderem der DNA-Gehalt/-Ploidie (Silvestrini et al., 1998; Vergote et al., 1993), der postoperative CA 125-Verlauf (Fraci et al., 1996; Riedinger et al., 2007), sowie die *Kallikreine 6, 8, 10, 11 und 13* (Diamandis et al., 2004; Scorilas et al., 2004; Shigemasa et al., 2004; UICC, 2006), der Proliferationsmarker *Ki-67* und die *S-Phase-Fraktion* (Rohlke et al., 1997; UICC, 2006). Die prognostische Wirksamkeit dieser Faktoren konnte in einzelnen Untersuchungen gezeigt werden, die Bestätigung an großen Kollektiven fehlt jedoch. Die Genomanalyse zur Einschätzung der Prognose oder zur Vorhersage des Therapieansprechens findet in der klinischen Routine derzeit noch keine Anwendung (AGO, 2007).

1.1.6 Therapie des Ovarialkarzinoms

1.1.6.1 Primärtherapie des Ovarialkarzinoms

Die Therapie umfasst die chirurgische Entfernung des Tumors mit weitestmöglicher Reduktion der Tumormassen einschließlich der Lymphknotenmetastasen und anschließend eine systemische Therapie mit insgesamt sechs Zyklen einer kombinierten

Chemotherapie im Abstand von drei Wochen. Als Goldstandard gilt derzeit eine Kombination aus Paclitaxel und Carboplatin (AGO, 2007). Etwa 70% der Tumore sprechen initial auf diese Kombination an (Spentzos et al., 2004). In einer Studie aus dem Jahre 1996 zeigte sich eine Kombination aus Cisplatin und Paclitaxel der bis dahin gängigen gemeinsamen Verabreichung von Cisplatin und Cyclophosphamid deutlich überlegen (McGuire et al., 1996). Seit Mitte der 1980er Jahre wurde Cisplatin durch das äquieffektive Carboplatin aufgrund seines günstigeren Nebenwirkungsprofils ersetzt. Es kommt seltener zu schwerer Emesis, gleichzeitig besteht weniger Nephro-, Oto- und Neurotoxizität (Colombo et al., 1994).

1.1.6.2 Zukunftsaussichten in der Therapie

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchen derzeit neuere Substanzen hinsichtlich ihrer Effektivität in der Therapie des Ovarialkarzinoms. Von besonderem Interesse sind molekulare Veränderungen, die entweder Ziele für neue Therapien darstellen oder prädiktiv für existierende Tumorthapien sind. Ein Beispiel ist der bereits in vielen verschiedenen Tumoren erfolgreich getestete monoklonale *VEGF*-Antikörper *Bevacizumab* (Byrne et al., 2003). *VEGF*-Rezeptoren sind Transmembran-Tyrosinkinaserzeptoren, an die Wachstumsfaktoren binden und molekulare Signalkaskaden, unter anderem auch den *PI3K/AKT*-Signalweg, aktivieren. Infolge werden Angiogenese sowie Wachstum und Überleben der Zelle gefördert. *Bevacizumab* hemmt als antiangiogenetischer Wirkstoff die Neovaskularisierung und hat auf diese Weise einen hemmenden Einfluss auf das Tumorwachstum (Ledermann und Raja, 2010). Hohe *VEGF*-Level wurden auch in Ovarialtumoren nachgewiesen (Boss et al., 2001) und waren mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Duncan et al., 2008). Verschiedene Studien (ICON 7, GOG 218) untersuchen derzeit *Bevacizumab* in seiner Wirksamkeit in Kombination mit der Standard Primärtherapie an Ovarialkarzinomen (Ledermann und Raja, 2010). Die Ergebnisse dieser Studien sind Ende 2010 zu erwarten.

Zu den bekanntesten beim Ovarialkarzinom aktivierten Therapiezielen gehören auch *EGFR* und *Her-2/neu*. Substanzen, die gegen diese Faktoren gerichtet sind, konnten bereits erfolgreich in der Therapie von Mamma- und Kolonkarzinomen sowie in der Therapie von Lungentumoren eingesetzt werden (Ledermann und Raja, 2010). Die Substanzen befinden sich in Bezug auf ihre Wirksamkeit in Ovarialkarzinomen derzeit

noch in klinischer Erprobung (Dinh et al., 2008; Ledermann und Raja, 2010). Für *EGFR* wurde eine gesteigerte Expression in 35-70% der Ovarialkarzinome nachgewiesen (Schilder et al., 2005). Der Ligand dieses Rezeptors, *EGF*, stimuliert normalerweise, unter anderem auch über die Aktivierung des *PI3K/AKT*-Signalweges, die Proliferation nicht maligner Epithelzellen. Ob eine vermehrte Expression von *EGFR* in ovariellen Tumorzellen mit einer schlechteren Prognose einhergeht ist umstritten (de Graeff et al., 2009). Verschiedene gegen *EGFR* gerichtete monoklonale Antikörper (*Trastuzumab*, *Cetuximab*, *Pertuzumab* und *Panitumumab*) sowie einige kompetitive niedermolekulare *EGFR*-Inhibitoren (*Erlotinib* und *Gefitinib*) sind bereits in Ovarialtumoren untersucht worden (Ledermann und Raja, 2010). In einigen Studien konnte nach Applikation eines *EGFR*-Inhibitors ein verlängertes progressionsfreies Intervall beobachtet werden (Ledermann und Raja, 2010). Studien, die den kompetitiven *EGFR*-Inhibitor *Gefitinib* (*ZD1839*, *Iressa*) untersuchten, beobachteten in Einzelfällen potentiell *Gefitinib* sensitive *EGFR*-Mutationen (Rosano et al., 2007; Schilder et al., 2005). Eine signifikante Wirksamkeit dieses Inhibitors konnte in Ovarialtumoren jedoch noch nicht nachgewiesen werden (Ledermann und Raja, 2010).

Das *Her-2/neu* Proto-Onkogen kodiert für einen Wachstumsfaktorrezeptor, welcher das Angriffsziel des bereits in der Tumorthherapie gebräuchlichen Anti-*Her-2/neu*-Antikörpers *Trastuzumab* (*Herceptin*) ist. *Pertuzumab* ist ein rekombinanter humaner monoklonaler *EGFR*-Antikörper, der die Dimerisierung von *HER-2/neu* und somit die Aktivierung sich anschließender Signalwege hemmt. Unter der Therapie mit *Pertuzumab* in Kombination mit *Gemcitabin* konnten in Ovarialkarzinomen tendenziell verlängerte Remissionszeiten beobachtet werden (Ledermann und Raja, 2010).

Weitere derzeit an Ovarialkarzinomen intensiv untersuchten molekularen Therapieziele sind die Thyrosinkinase *Src*, *PARP*, *α-FR* sowie *IGF1* (Ledermann und Raja, 2010). Auch *PI3-Kinase*-Inhibitoren sind in der Erprobung und zeigen *in vitro* bereits einen wachstumshemmenden Effekt (Folkes et al., 2008; Garlich et al., 2008; Maira et al., 2008; Prevo et al., 2008; Schnell et al., 2008; Shayesteh et al., 1999; Zhang et al., 2009).

1.2 Häufige molekulare Veränderungen beim Ovarialkarzinom

Als Tumor bezeichnet man eine Gruppe von Zellen, die nicht mehr der Wachstumskontrolle unterliegen. Durch die Anhäufung verschiedener genetischer Veränderungen wird die maligne Entartung einer Zelle begünstigt (Loeb, 1991). In Ovarialtumoren sind häufig Genabschnitte betroffen, deren Genprodukte an der normalen Zellproliferation, der Apoptose, der Zellalterung (Seneszenz) oder der DNA-Reparaturprozesse beteiligt sind (Wenham et al., 2002).

1.2.1 Hereditäres Ovarialkarzinom

Eine positive Familiengeschichte zählt zu den wichtigsten Risikofaktoren des Ovarialkarzinoms. Bei etwa 10% der Patientinnen mit Ovarialkarzinomen ist eine autosomal-dominant vererbte genetische Prädisposition für die Erkrankung ausschlaggebend (Wenham et al., 2002). Es werden bisher zwei bekannte Mutationsmuster unterschieden: In bis zu 90% tritt das hereditäre Karzinom im Rahmen des *Mamma-Ovarialkarzinomsyndroms* mit Mutationen der *BRCA1*- (Chromosom 17q) und *BRCA2*- (Chromosom 13q) Gene auf. Etwa 10% sind mit dem *Hereditären nicht polypösen Kolonkarzinom-Syndrom* mit Mutationen der *DNA-Mismatch-Reparaturgene hMSH2* oder *hMLH1*, seltener *hPMS1* oder *hPMS2*, assoziiert (Boyd, 2003; Runnebaum und Stickeler, 2001). Ob ein spezifisches *Ovarialkarzinom-Syndrom* existiert, ist fraglich. Bei Familien, die ausschließlich an Ovarialkarzinomen erkrankten, wurden regelmäßig *BRCA1*-Mutationen nachgewiesen. Diese gehen jedoch auch mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Brustkrebs einher (Liede et al., 1998) und sind deswegen nicht ovarspezifisch.

1.2.2 Sporadisches Ovarialkarzinom

Die abnorme Aktivierung von Onkogenen (Proliferationsgene) und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Antiproliferationsgene), die unter normalen Bedingungen für ein ausgeglichenes Zellwachstum sorgen, spielen auch bei der ovariellen Tumorgenese eine entscheidende Rolle. Onkogene stimulieren normalerweise die Proliferation verschiedener Zelltypen. Zu den zahlenmäßig am häufigsten aktivierten Onkogenen beim Ovarialkarzinom gehören *Her-2/neu*, *MYC*, *KRAS* und *PIK3CA* (Aunoble et al., 2000; Havrilesky et al., 2003; Verri et al., 2005). Eine weitere wichtige

Rolle bei der Krebsentstehung spielen die Tumorsuppressorgene, die normalerweise der Kontrolle der Zellproliferation dienen. Durch Mutationen verlieren betroffene Genabschnitte ihre biochemische Funktion und damit ihren hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum. Zu den im Zusammenhang mit Ovarialkarzinomen am häufigsten erwähnten Tumorsuppressorgenen gehören *p53*, *p16* (Wenham et al., 2002), *PTEN* und *CTNNB1* (Bell, 2005).

Nicht nur die Entstehung, sondern auch die histologische Differenzierung der epithelialen Ovarialtumore (serös, muzinös, endometroid, klarzellig) scheint einer unterschiedlichen molekularen Pathogenese zu unterliegen (Aunoble et al., 2000; Feeley und Wells, 2001). So zeigen die histologischen Subtypen jeweils andere klinische sowie biologische Eigenschaften und teilweise ein unterschiedliches Ansprechen auf bestimmte Chemotherapien (Gomez-Raposo et al., 2010). Diese Beobachtung ist wohlmöglich auf unterschiedliche genetische Abberationsmuster zurückzuführen. So weisen endometroide und klarzellige Karzinome häufig *PTEN*- und *CTNNB1*-Mutationen auf (Moreno-Bueno et al., 2001; Palacios und Gamallo, 1998), wohingegen *KRAS*-Mutationen eher die muzinöse Differenzierung eines Ovarialtumors zu beeinflussen scheinen (Cuatrecasas et al., 1997; Cuatrecasas et al., 1998; Fujita et al., 2003). Wenig differenzierte seröse Karzinome sind durch häufige *p53*-Mutationen gekennzeichnet und weisen einen hohen Grad an genetischer Instabilität auf (Kuo et al., 2009b). Sie entstehen vermutlich zum großen Teil *de novo* aus den ovariellen Epithelzellen (Bell und Scully, 1994; Pothuri et al., 2010). Gut differenzierte seröse Karzinome weisen im Gegensatz dazu eher *KRAS*-Mutationen und seltener *p53*-Mutationen auf und entstehen vermutlich vorwiegend auf dem Boden von Borderline-Tumoren (Caduff et al., 1999; Singer et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Alterationen des Tumorsuppressorgenes *p53* sowie "Zugewinnen" und Amplifikationen des *PIK3CA*-Genes untersucht. Im folgenden Abschnitt soll auf diese beiden wichtigen Gene gesondert eingegangen werden.

1.3 p53

Die Weitergabe der genetischen Information von der Mutterzelle auf die Tochterzelle ist für die Integrität des Organismus von entscheidender Bedeutung. Im Verlauf der Zellteilung gibt es verschiedene Kontrollpunkte, die die Unversehrtheit der DNA überprüfen. Sie kontrollieren, ob vorangegangene Schritte regelrecht abgelaufen sind und sorgen über komplexe Regulationsmechanismen dafür, dass sich eine Zelle nur dann weiter teilen kann, wenn ihre DNA korrekt repliziert wurde und intakt ist.

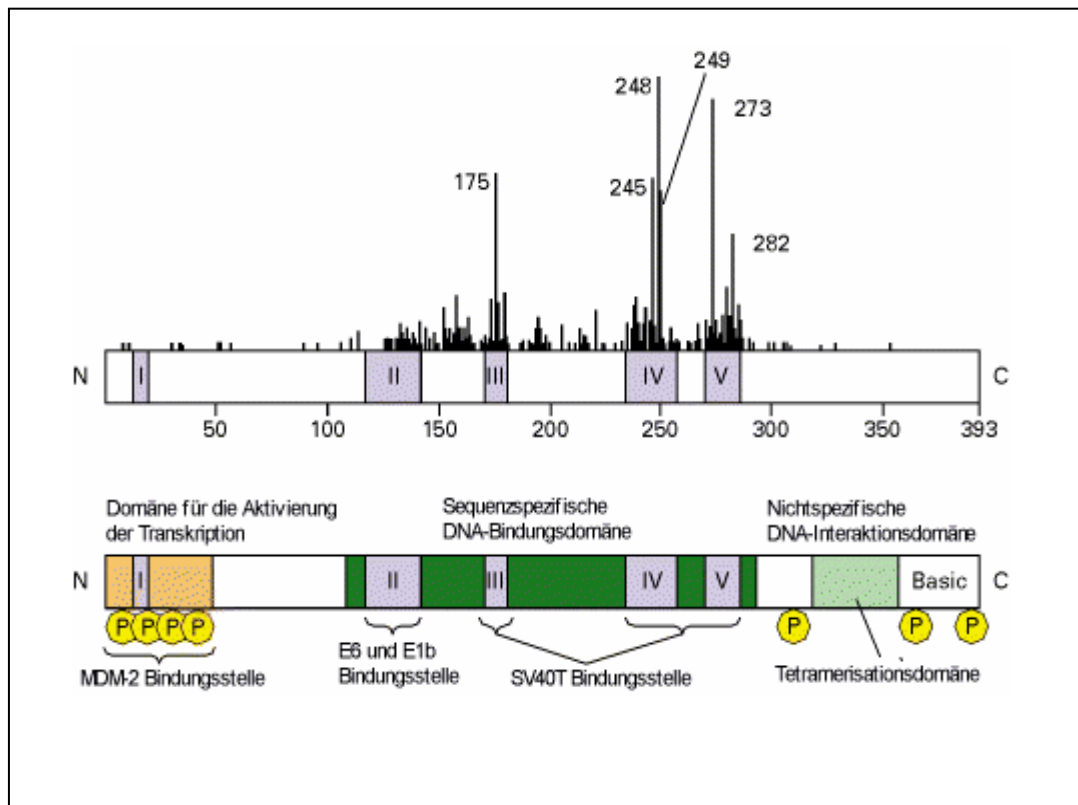
Eine wichtige Aufgabe innerhalb dieses Kontrollsystems übernehmen die Tumorsuppressorgene. Das zuerst beschriebene Gen dieser Gruppe ist das Tumorsuppressorgen *p53* auf Chromosom 17p13.1 (Benchimol et al., 1985; Isobe et al., 1986; McBride et al., 1986). Es kodiert für das gleichnamige *p53*-Protein bestehend aus 393 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 53 kDa. Im Jahre 1979 entdeckten David Lane und Arnold Levine unabhängig voneinander erstmalig dieses im Zellkern lokalisierte Phosphorprotein als Bindungsprotein der *SV40*-Tumoviren (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Das Gen besitzt neben der Bindungsstelle für das große T-Antigen der *SV40*-Viren weitere Bindungsstellen, unter anderem für das *E1B*-Onkoprotein der Adenoviren (Sarnow et al., 1982) und das *E6*-Onkoprotein der Papillomaviren. Aufgrund seiner protektiven und antikarzinogenen Eigenschaften wurde *p53* bereits im Jahre 1992 von David Lane der Titel „Wächter des Genoms“ verliehen (Lane, 1992).

1.3.1 Struktureller Aufbau des p53-Proteins

Funktionell lassen sich im *p53*-Protein drei Domänen unterscheiden (Abb. 2) (Bertheau et al., 2008; Lane und Crawford, 1979; Lane, 1992). Gekennzeichnet durch eine hohe Dichte an sauren Aminosäuren befindet sich am N-terminalen Ende eine transkriptionelle Aktivator-Domäne zur Interaktion mit dem Transkriptionsapparat (Vogelstein und Kinzler, 1994; Vousden und Lane, 2007). Hier bindet auch das den *p53*-Abbau induzierende *MDM2*-Protein (Liu et al., 2001). Mittelständig befindet sich eine sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne (Vogelstein und Kinzler, 1994; Vousden und Lane, 2007). Innerhalb dieser DNA-Bindungsdomäne werden in malignen Tumoren die meisten Mutationen gefunden (Abb. 2) (Liu et al., 2001; Selivanova und Wiman, 2007). Am C-terminalen Ende folgt die Tetramerisierungsdomäne, die die

Oligomerisierung von *p53*-Monomeren vermittelt. Sie ist durch eine Sequenz überwiegend basischer Aminosäuren charakterisiert, die eine amphipathische helikale Struktur bilden (Vogelstein und Kinzler, 1994; Vousden und Lane, 2007). Mit der Transaktivierungsdomäne und der spezifischen DNA-Bindungsdomäne besitzt *p53* die funktionellen und strukturellen Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors.

Abbildung 2: Struktureller *p53*-Aufbau



Oben: *p53*-Mutationen (Aminosäurepositionen) in menschlichen Krebszelllinien. Die grauen Boxen repräsentieren die evolutionär hochkonservierten Regionen. Die vertikalen Striche die Häufigkeit der einzelnen Mutationen. Die Mutationen liegen dicht nebeneinander in den konservierten Regionen II-V. Die einzelnen "hotspots" sind mit gesonderten Ziffern bezeichnet (175, 245, 248, 249, 273, 282). Unten: Funktionelle Regionen des *p53*-Proteins. Lokalisation der Phosphorylierungsstellen mit P gekennzeichnet. Das *MDM2*-Protein bindet zur Hemmung der Transkriptionsaktivität als Teil der normalen Regulierung der *p53*-Aktivität am N-terminalen Ende. Virale Proteine wie das *E1B*-Onkoprotein der Adenoviren und das *E6*-Onkoprotein der Papillomaviren sowie das große T-Antigen der *SV40*-Viren inaktivieren ebenfalls die *p53*-Aktivität. Am c-terminalen Ende befindet sich die Tetramerisierungsdomäne zur Interaktion mit weiteren *p53*-Monomeren (Harris, 1993; Ko und Prives, 1996).

1.3.2 Funktion des *p53*-Proteins

p53 hat über verschiedene Wege einen hemmenden Einfluss auf die Tumorgenese. Es reguliert als Transkriptionsfaktor in zellulären Stresssituationen sowie nach Zellschädigung die Expression von Genen, die am Zellzyklus-Arrest, der DNA-Reparatur und der Zellalterung beteiligt sind. *p53* interagiert zusätzlich mit zahlreichen

zellulären Proteinen, die im Zusammenhang mit der Wachstumshemmung und der Kontrolle des programmierten Zelltods (Apoptose) stehen (Whibley et al., 2009). Nach neueren Erkenntnissen beeinflusst *p53* ferner verschiedene Stoffwechselwege, darunter die Regulierung der Glykolyse, die Hemmung der Angiogenese, die Zellinvasion und Zellmotilität sowie die Autophagozytose. Die Effekte der *p53*-Aktivierung variieren je nach Zelltyp und Umgebung und werden auf zellulärer Ebene, unter anderem durch Phosphorylierung und Azetylierung, gesteuert (Vousden und Lane, 2007). Zusätzlich bestimmen verschiedene Isoformen das biochemische Wirkungsspektrum dieses Moleküls, welches innerhalb der einzelnen Zellen in unterschiedlichen Expressionsmustern vorliegt (Bourdon et al., 2005; Muller et al., 2006).

1.3.2.1 Aktivierungswege von p53

Viele verschiedene physiologische Stressfaktoren können *p53* als Tumorsuppressorgen aktivieren mit dem Ziel, die zelluläre Integrität zu bewahren (Lane und Hupp, 2003). *Vogelstein et al.* beschreiben mindestens drei unabhängige Signalwege, über die das *p53*-System aktiviert wird. Alle drei Signalwege führen zu einem gehemmten *p53*-Abbau, wodurch die *p53*-Konzentration in der Zelle steigt (Vogelstein et al., 2000). Unter diesen Bedingungen entfaltet *p53* seine bedeutende Funktion als Transkriptionsfaktor (Lane, 1992). Es bindet durch biochemische Modifikationen in seiner Konformation geändert an spezifische DNA-Sequenzen (Bargonetti et al., 1991; Kern et al., 1991) und stimuliert die Expression nachfolgender Gene (Bose und Ghosh, 2007). Die Expression dieser Gene führt direkt oder indirekt zur Hemmung der Zellteilung oder zum Zelltod.

Ein Signalweg ist abhängig von zwei phosphorylierenden Proteinkinasen: *ATM* und *Chk2*. *ATM* wird durch Doppelstrangbrüche, welche beispielsweise durch die Einwirkung ionisierender Strahlung entstehen, aktiviert. Konsekutiv wird *Chk2* aktiviert. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren das *p53*-Protein und inhibieren dadurch seine Interaktion mit *MDM2*, ein den *p53*-Abbau induzierendes Protein. Die beobachtete Konzentrationserhöhung an *p53*-Molekülen als Reaktion auf DNA-Schäden ohne den Weg über die Phosphorylierung, ist noch nicht vollends geklärt (Vogelstein et al., 2000).

Der zweite Signalweg wird durch veränderte Wachstumssignale getriggert, welche beispielsweise aus der Expression des *RAS*- oder *MYC*-Onkogens resultieren. In diesem Fall verläuft die Aktivierung über das *p14^{ARF}*-Protein, welches infolge ebenfalls *MDM2* hemmt (Vogelstein et al., 2000).

Eine weitere Aktivierung erfolgt durch bestimmte Chemotherapeutika sowie durch UV-Strahlung und Proteinkinase-Inhibitoren. Dieser Signalweg ist deswegen zu unterscheiden, da er unabhängig von *ATM*, *Chk2* und *p14^{ARF}* verläuft. Vermutlich spielen die *ATR-Kinase* und die *Casein-Kinase II* eine Rolle (Vogelstein et al., 2000).

1.3.2.2 Effekte einer p53-Aktivierung

Zellzyklus-Arrest. Ein Effekt der *p53*-Aktivierung ist der Zellzyklus-Arrest, wodurch eine ausgedehnte DNA-Reparatur ermöglicht wird. Aktiviertes *p53* stimuliert direkt die Expression von *p21^{WAF1/CIP1}*, einem universellen Inhibitor von *Cyclin-abhängigen-Kinasen* (CDKs). CDKs bilden mit ihren regulatorischen Cyclinen einen Zellzyklusregulator-Komplex, der unter normalen Bedingungen an bestimmten Zellzyklus-Übergängen aktiviert wird und für einen gesicherten Übertritt von der *G₁*-Phase in die *S*-Phase (über *Cyclin D* und *E*) sowie von der *G₂*-Phase in die Mitose (über *Cyclin B*) sorgt. Bei einer *p53*-Aktivierung bewirkt der anschließende inhibierende Einfluss des *p21^{WAF1/CIP1}* auf die CDKs den Zellzyklusstopp in der *G₁*-Phase (Hemmung des *CyclinD/CDK4/6* Komplexes) sowie eine Hemmung des Übergangs von der *G₂*-Phase in die Mitose (Hemmung des *CyclinB/CDK1* Komplexes). Durch einen Verlust des *G₁/S-Phasen-Checkpunkts* nach funktioneller Inaktivierung von *p53* und den daraus resultierenden Ausfall des Zellzyklus-Arrests können DNA-Schäden akkumulieren, wodurch die maligne Entartung der Zelle begünstigt wird (Vogelstein et al., 2000).

Apoptose. In einigen Zellen wird nach *p53*-Aktivierung unter bestimmten Bedingungen, wenn die Reparatur der DNA nicht möglich oder fehlerhaft verlaufen ist, die Apoptose ausgelöst, um die Weitergabe geschädigten Erbgutes zu verhindern (Bates und Vousden, 1996; Vogelstein et al., 2000). Es gibt verschiedene potentielle Mediatoren, die diesen Ablauf vermitteln. Eines ist das *bax*-Protein, ein Apoptose einleitendes Protein der *bcl2*-Familie. Die zugehörige Genregion wird in humanen Zellen zum Teil auf direktem Wege durch *p53* aktiviert (Vogelstein et al., 2000). Es wurden zwei weitere im Mitochondrium lokalisierte Gene entdeckt, *NOXA* und *P53AIP1*, die durch

p53 aktiviert ebenfalls den Zelltod induzieren. Andere mit *p53* im Zusammenhang stehende Mediatoren, z.B. *PIDD*, haben Ähnlichkeiten mit dem *TNF*-Rezeptor und *Fas*, den klassischen „death-signal“-Rezeptoren. Ein weiterer Mechanismus über den *p53* in der Lage ist den Zelltod einzuleiten ist die direkte Stimulation der Mitochondrien und die konsekutive Absonderung zelltoxischer Substanzen (Vogelstein et al., 2000).

Inhibition der Vaskularisierung. Die Neubildung von Blutgefäßen ist für das Tumorwachstum essentiell. *p53* hemmt unter normalen Bedingungen diesen Prozess. Zellen in denen *p53* inaktiviert vorliegt geht diese Fähigkeit verloren. Die Vaskularisierung des Tumors unterliegt in diesem Fall keiner Kontrolle mehr und ein wachstumslimitierender Faktor ist ausgeschaltet (Vogelstein et al., 2000).

1.3.2.3 p53 und genetische Stabilität

Für das Verständnis von Entstehung und Progression karzinomatöser Erkrankungen ist eine zunehmende genetische Instabilität von zentraler Bedeutung (Loeb, 1991). Der Begriff genetische Instabilität umfasst eine Vielzahl genomischer Veränderungen, wie etwa den Verlust oder die Vermehrung von Chromosomen sowie genetische Veränderungen auf der Ebene einzelner Gene. Darunter befinden sich Rearrangements, Translokationen, Amplifikationen, Deletionen und Punktmutationen (Nowell, 1976; Pienta et al., 1989; Solomon et al., 1991; Temin, 1988). *p53* spielt aufgrund seiner regulatorischen Funktion eine wichtige Rolle im Erhalt der genomischen Stabilität. Defekte dieses Gens begünstigen durch die konsekutive Anhäufung von DNA-Schäden auf indirektem Wege die Tumorentstehung (Vogelstein et al., 2000). Da ein Gendefekt innerhalb des Zellzykluskontrollsystems bei jeder Zellteilung zum tragen kommt, werden die genetischen Veränderungen zusätzlich zum bestehenden Defekt in die nächste Zellgeneration übertragen und die genetische Information wird zunehmend instabil (Xu, 2008). Desweiteren wird die *p53*-vermittelte genomische Stabilität möglicherweise durch die Induktion bestimmter Gene garantiert, die das Nukleotid-Exzisions-Reparatursystem, die chromosomale Rekombination und die Chromosomentrennung in der Mitose regulieren (Vogelstein et al., 2000).

Anhand von zwei Studien aus den 1990er Jahren wurde der Zusammenhang zwischen fehlerhaftem *p53* und der Entstehung von Genamplifikationen deutlich (Livingstone et al., 1992; Yin et al., 1992). Unter experimentellen Bedingungen wurden Zellen mit dem

Biosynthesehemmer *N*-(Phosphonoacetyl)-*L*-Aspartat (PALA) beimpft. PALA hemmt ein Enzym des Proteinkomplexes für die Uridin-Biosynthese und stört auf diese Weise die DNA-Biosynthese. Sein kodierendes Gen wird als *CAD*-Gen bezeichnet. Die Behandlung von Fibroblasten mit PALA bewirkte in Zellen mit intaktem *p53* einen reversiblen Stopp in der G₁-Phase. *p53*-defiziente Fibroblasten (von Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom oder murine *p53*-defiziente Fibroblasten) zeigten hingegen keine Unterbrechung des Zellzyklus. Stattdessen wurden *CAD*-Amplifikationen gefunden und bei weiterer Passagierung kam es zur Aneuploidie (Livingstone et al., 1992; Yin et al., 1992). Demnach ist es möglich, dass Amplifikationen in *p53*-defizienten Zellen infolge einer DNA-Synthesestörung entstehen und die Genbereiche betreffen, deren Genprodukte im Versuch gehemmt oder blockiert werden.

1.3.3 Mutiertes *p53*

p53 ist von besonderer medizinischer Bedeutung, da es in etwa 50% aller malignen Tumore mutiert vorliegt (Soussi und Beroud, 2001; Vogelstein et al., 2000). Es ist die in Tumoren am häufigsten beschriebene tumorgenetische Veränderung (Joerger und Fersht, 2008; Soussi et al., 2005). In Tumoren sind Veränderungen der *p53*-Aktivität entweder durch Mutationen des *p53*-Gens oder durch Veränderungen der mit *p53* in Zusammenhang stehenden Signalwege bedingt (Bourdon, 2007; Toledo und Wahl, 2006; Vousden und Lane, 2007).

Normales *p53* hat mit maximal 20 Minuten eine relativ kurze Halbwertszeit und seine Konzentration wird durch die *MDM2* vermittelte Proteolyse innerhalb einer normalen Zelle auf konstant niedrigem Niveau gehalten (Levine, 1989). Die *p53*-Level liegen in normalen Zellen häufig unterhalb der Nachweisgrenze (DeLeo et al., 1979; Kress et al., 1979; Lane und Crawford, 1979; Linzer et al., 1979; Rotter et al., 1980). Anders als bei den meisten anderen Tumorsuppressorgenen, bei denen Mutationen in der Regel zu einer Inaktivierung der Proteinsynthese führen, ist *p53* als Genprodukt häufig in erhöhter Konzentration im Tumor nachweisbar (Iggo et al., 1990). Ursächlich hierfür sind in der Mehrzahl der Fälle Punktmutationen innerhalb des *p53*-Genlocus (Hollstein et al., 1991; Lane, 1992; Levine et al., 1991), die meist funktionell bedeutsame Regionen betreffen (Soussi et al., 2006b). In etwa 80% der Fälle liegt der Mutation der Austausch eine Aminosäure (Missense-Mutation) zu Grunde (Soussi et al., 2006a). Infolge werden stabilere Genprodukte mit komplett oder partiell veränderter

Proteinstruktur kodiert, die mit einer verlängerten Halbwertszeit einhergehen (Iggo et al., 1990; Reich et al., 1983; Soussi und Beroud, 2001). Daraus resultiert eine Akkumulation des Proteins im Zellkern (Oren et al., 1981; Wu und El-Diery, 1996), die immunhistochemisch nachweisbar wird.

Die ersten Untersuchungen zu *p53* zeigten, dass mutantes *p53* zur Transformation und Tumorentstehung beiträgt, selbst wenn noch Wildtyp-*p53* in der Zelle vorhanden ist (Finlay et al., 1989; Lane und Benchimol, 1990; Martinez et al., 1991; Michalovitz et al., 1990). Diese Beobachtungen führten zunächst dazu, dass *p53* zu den dominanten Tumorgenen gezählt wurde (Lane und Benchimol, 1990; Wolf et al., 1984), welche durch Mutationen kodierender oder regulatorischer Sequenzen den malignen Phänotyp aktiv beeinflussen. In weiteren Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass der Verlust beider *p53*-Allele ebenfalls das Tumorstadium begünstigt (Lane und Benchimol, 1990). Dieser scheinbare Widerspruch konnte dadurch erklärt werden, dass die Oligomerisierung von *p53*-Monomeren die Voraussetzung für ihre biochemische Wirksamkeit ist (Lane, 1992; Sturzbecher et al., 1992). Wildtyp-*p53*-Monomere bilden nicht nur untereinander, sondern auch mit mutantern *p53* Tetramere, wobei die Wildtyp-Monomere in eine mutante Konformation gezwungen werden (Milner und Medcalf, 1991). Auf diese Weise wird die Interaktion von Wildtyp-*p53* mit der DNA gestört und somit auch die Funktion des intakten *p53* gehemmt (Caron de Fromentel und Soussi, 1992; Hollstein et al., 1991; Lane, 1992). Solche Mutationen werden als „dominant-negativ“ bezeichnet. In diesem Fall reicht die Mutation eines der beiden Allele aus, um *p53* vollständig zu inaktivieren. Heute geht man davon aus, dass neben dem Funktionsverlust auch ein „gain-of-function“ durch *p53*-Mutationen ausgelöst werden kann (Strano et al., 2007; Xu, 2008), der zu einer genomischen Instabilität beispielsweise mittels Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *ATM* führt (Xu, 2008). Somit ist *p53* nicht nur ein Tumorsuppressorgen, sondern gleichzeitig ein dominantes Onkogen, welches durch die Mutation eines der beiden Allele die Zelle aktiv zur Transformation bringen kann.

1.3.4 p53 und Ovarialkarzinome

Alterationen des *p53*-Tumorsuppressorgens gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen in epithelialen Ovarialtumoren (Frank et al., 1994; Kohler et al., 1993; McManus et al., 1994; Milner et al., 1993; Okamoto et al., 1991). Ovarialkarzinome weisen im Mittel in etwa 51% der Fälle erhöhte *p53*-Proteinspiegel auf (Kmet et al., 2003). Ein negativer Einfluss auf die Patientenprognose ist nachgewiesen, die klinische Relevanz als prognostischer Marker ist jedoch unklar (de Graeff et al., 2009). In Bezug auf den Tumorphänotyp finden sich gesteigerte nukleäre *p53*-Anreicherungen häufiger in serösen, als in allen anderen histologischen Subtypen. Zudem ist *p53* mit fortgeschrittenen und entdifferenzierten Tumoren assoziiert (Kmet et al., 2003).

Man geht derzeit von einem zweiteiligen Model aus, welches die Ovarialtumore in zwei Gruppen unterteilt. Zu den Typ I Tumoren gehören die gut differenzierten serösen Ovarialkarzinome (Vang et al., 2009), die muzinösen, endometroiden und klarzelligen Ovarialkarzinome sowie die malignen Brenner-Tumore (Boyd, 2008). Die entdifferenzierten serösen Ovarialkarzinome (Vang et al., 2009) sowie die Karzinosarkome und die undifferenzierten Tumore stellen die Gruppe der Typ II Tumore dar (Boyd, 2008). Gut differenzierte seröse Tumore gehen meist aus Adenofibromen und Borderline-Tumoren hervor. Diese Tumorgruppe weist selten *p53*-Mutationen auf, ist durch ein weniger aggressives Wachstumsverhalten gekennzeichnet und ist mit einem besseren Patientenüberleben assoziiert. Entdifferenzierte Tumore hingegen entstehen meist *de novo*. Diese Tumore wachsen schnell, zeigen häufig *p53*-Mutationen und sind mit einem hohen Level an genetischer Instabilität assoziiert (Kuo et al., 2009a; Shih Ie und Kurman, 2004; Vang et al., 2009).

p53-Mutationen finden sich in etwa 45% der epithelialen Ovarialtumore, in 5% der Borderline-Tumore und in 1% der benignen Ovarialtumore. Der Grossteil der Mutationen betreffen die Exons 5-8, in nur 7% wurden Mutationen außerhalb dieses Bereichs beschrieben. Zu etwa 86% sind die Mutationen durch den Austausch einer Aminosäure bedingt. Am häufigsten sind Missense-Mutationen, gefolgt von Nonsense-Mutationen und Silent-Mutationen. Bei einigen Mutationen liegt der Austausch einer Aminosäure im Bereich eines Introns. Desweiteren finden sich Deletionen und Insertionen (Kmet et al., 2003). Die verschiedenen Mutationstypen zeigen keine Assoziation zu den einzelnen histologischen Tumorsubtypen (Kmet et al., 2003).

1.4 PIK3CA

Das *Phosphatidylinositol-3-Kinase-p110 α* -Gen (PIK3CA) kodiert für die katalytische Untereinheit *p110 α* der *Phosphatidylinositol-3-Kinase* (PI3K, PI3-Kinasen), ein Enzym, welches an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt ist (Huang et al., 2007). Es vermittelt über *Phosphatidylinositol(3,4,5)-Trisphosphat* (PIP₃) und AKT unter anderem die Hemmung der Apoptose (Cui et al., 2009). Das Gen liegt in der Chromosomenregion 3q26.3 (Volinia et al., 1994).

Amplifikationen dieser Genregion sind ein häufiges und frühes Ereignis in unterschiedlichen epithelialen Tumoren, unter anderem der Zervix (Sugita et al., 2000), des Ösophagus (Imoto et al., 2001; Imoto et al., 2003), der Lunge (Sugita et al., 2000), der Kopf-Hals-Region (Riazimand et al., 2002), der Prostata (Sattler et al., 1999; Sattler et al., 2000), der Mamma (Weber-Mangal et al., 2003; Wessels et al., 2002), des Nasopharynx (Or et al., 2005) und bei der chronisch myeloischen Leukämie (Casas et al., 2004).

In Ovarialkarzinomen liegt diese Genregion häufig amplifiziert vor (Nanjundan et al., 2007; Press et al., 2008; Shayesteh et al., 1999). Neben *PIK3CA* sind in epithelialen Tumoren innerhalb der 3q26-Genregion weitere genetische Veränderungen identifiziert worden, die möglicherweise Einfluss auf die Entstehung bzw. Progression der Tumore haben (Shayesteh et al., 1999). Darunter befinden sich der *eukaryotic initiation factor* (Guan et al., 2004), *ZASC1* (Imoto et al., 2003), *SnoN* (Imoto et al., 2001), *SCC-related Oncogene* (Estilo et al., 2003) und *TERC* (Yokoi et al., 2003).

1.4.1 Klassifizierung, Funktion und Aufbau

Für die Weiterleitung von Signalen in die Zelle sind membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen von entscheidender Bedeutung. Die durch einen extrazellulären Liganden induzierte Dimerisierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen führt in der Regel zur Phosphorylierung von Tyrosylresten auf der zytoplasmatischen Seite und somit zur Aktivierung der zytoplasmatischen Rezeptordomäne. Die dabei entstandenen phosphorylierten Tyrosinreste sind spezifische Bindungsstellen für verschiedene Signalproteine (Baselga, 2006; Dibb et al., 2004; Sebolt-Leopold und English, 2006). Eines dieser Bindungsproteine ist die *Phosphatidylinositol-3-Kinase*. PI3-Kinasen

bilden eine Familie verwandter Lipid-Kinasen, die inositolhaltige Phosphatide in der Zellmembran phosphorylieren (Huang et al., 2007). Ihr Name beschreibt die Eigenschaft, den Inositolring von *Phosphatidylinositol* an der Position D3 zu phosphorylieren (Rameh und Cantley, 1999).

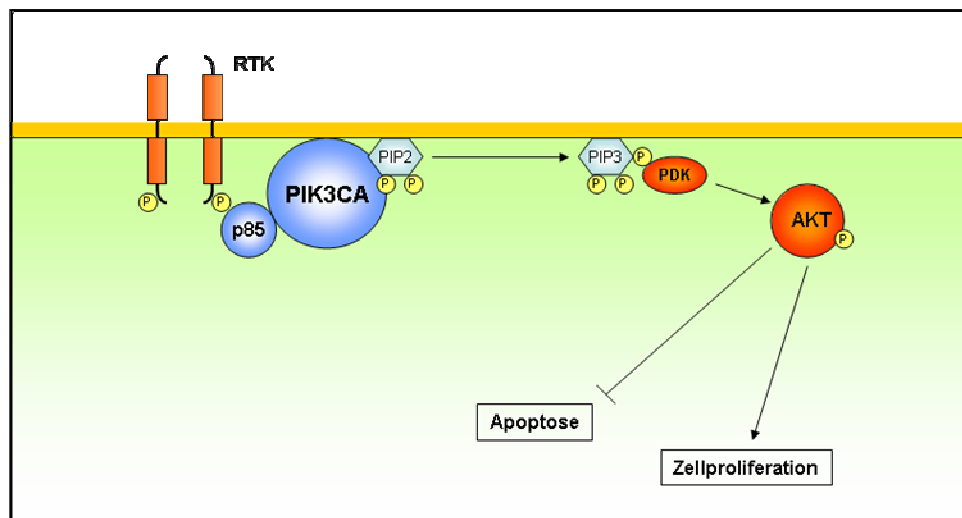
Die PI3-Kinasen lassen sich nach ihrem jeweilig bevorzugten Substrat in drei Klassen unterteilen. Für die Enzyme der Klasse I kommen *Phosphatidylinositol*, *Phosphatidylinositol(4)-Phosphat* und *Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat* als Substrate in Frage (Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999). In diese Gruppe gehören die zuerst entdeckte *PI3-Kinase* und die homologe *PI3-Kinase-γ*. Klasse II Enzyme sind vor allem in der Lage *Phosphatidylinositol* und *Phosphatidylinositol(4)-Phosphat* zu phosphorylieren (Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999). Zu dieser Klasse gehört die sogenannte *Kreatinphosphokinase*. Als Klasse III Enzym wird eine in Hefen entdeckte PI3-Kinase bezeichnet, die ausschließlich *Phosphatidylinositol* phosphoryliert (Toker und Cantley, 1997; Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999).

Die Konstellation der Phosphatgruppen hat einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion des Lipidprodukts. Auf diese Weise werden verschiedene Stoffwechselwege sowie Zellproliferation und Zelltod beeinflusst (Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999). Besonders die *PI3-Kinasen* der Gruppe I sind in die Tumorgenese involviert (Vivanco und Sawyers, 2002) und sollen deswegen gesondert besprochen werden.

Die *PI3-Kinasen* der Klasse I liegen unter normalen Bedingungen als Heterodimer inaktiv im Zytoplasma vor (Pitt und Chen, 2008). Sie bestehen aus einer katalytischen Einheit von 110 kDa und einer zweiten Einheit von 85 kDa mit regulatorischer Funktion (Huang et al., 2007; Pitt und Chen, 2008; Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999). Die katalytische Untereinheit existiert in 3 Isoformen *p110α*, *β* und *δ* (Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999), die alle die gleiche Grundstruktur aufweisen (Vivanco und Sawyers, 2002). Die regulatorische Untereinheit besitzt drei *SH2*-Domänen und eine *SH3*-Domäne. Über ihre *SH2*-Domäne ist die *PI3-Kinase* in der Lage, an die Phosphotyrosinreste aktivierter Tyrosin-Rezeptoren anzudocken (Miled et al., 2007). Bindet die regulatorische Untereinheit der *PI3-Kinase* beispielsweise an aktivierte *PDGF*-Rezeptoren führt dies zu dem, dass die *PI3-Kinase* in unmittelbare Nachbarschaft zu ihrem Substrat, dem *Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat* (PIP₂), in der Zellmembran gelangt, andererseits bewirkt die Bindung an den Rezeptor eine

Konformationsänderung der regulatorischen 85 kDa Untereinheit, wodurch infolge die katalytische Untereinheit aktiviert wird. Es folgt die Phosphorylierung des PIP_2 in Position 3, wodurch *Phosphatidylinositol(3,4,5)-Trisphosphat* (PIP_3) entsteht (Abb.3). PIP_3 ist ein Membranlipid mit Second-Messenger-Funktion (Vivanco und Sawyers, 2002).

Abbildung 3: PIK3CA-Signalweg



Die über transmembranständige Rezeptortyrosinkinasen (RTK) aktivierte regulatorische Untereinheit (p85) der *Phosphatidylinositol-3-Kinase* aktiviert die katalytische 110α -Einheit (PIK3CA). Darüber wird die Phosphorylierung des membranständigen *Phosphatidylinositol-Bisphosphats* (PIP_2) zum *Phosphatidylinositol-Trisphosphat* (PIP_3) induziert. Über die an die neue Phosphatgruppe (P) bindende *Pyruvatdehydrogenasen-Kinasen* (PDK) wird AKT aktiviert, welche zytoplasmatische Proteine, die die Apoptose begünstigen, hemmt und weitere Proteine aktiviert, die unter anderem die Zellproliferation fördern.

An die neue Phosphatgruppe in Position 3 können nun Effektormoleküle binden. Eines davon ist die *Protein-Kinase-B*, auch AKT genannt. AKT ist eine Seronin/Threonin-Kinase, die durch PIP_3 katalysiert von zwei weiteren Pyruvatdehydrogenasen-Kinasen, $PDK1$ und $PDK2$, an ihren Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert wird. Das aktivierte Enzym diffundiert daraufhin ins Zytoplasma und in den Zellkern, um dort selbst wieder eine Reihe weiterer Proteine, wie die proapoptotischen Proteine *bcl-2* und *p53*, zu phosphorylieren (Huang et al., 2007). Die Aktivierung des $PI3K/AKT$ -Signalweges hat auf die Zelle folglich eine antiapoptotische Auswirkung und fördert zugleich über unterschiedliche Signalwege Zellwachstum und Überleben. Das regulatorische Tumorsuppressorgen *PTEN* ist in der Lage PIP_3 zu dephosphorylieren und somit hemmend auf das Zellwachstum einzuwirken (Furnari et al., 1998). Ein *PTEN*-Verlust führt zu einer deregulierten Aktivität des $PI3K/AKT$ -Signalweges und zu

einem unkontrollierten Zellwachstum. Unreguliert kann *AKT* folglich die Tumorgenese fördern (Pitt und Chen, 2008). Ein Zusammenhang zwischen einem *PTEN*-Verlust und einer schlechteren Patientenprognose ist beim Ovarialkarzinom beschrieben (Qiao et al., 2007).

1.4.2 Das onkogene Potential des PIK3CA

Tumorzellen erweisen sich vielfach als apoptoseresistent und haben oft unverhältnismäßig hohe Zellproliferationsraten. Ein Grund könnte die in Tumoren häufig zu findende gesteigerte Aktivität des *PI3K/AKT*-Signalwegs sein. Das onkogene Potential der katalytischen Untereinheit *p110α* der *PI3-Kinase* wurde anhand von zwei Studien deutlich (Aoki et al., 2000; Chang et al., 1997). *Chang* et al. fanden im Genom des *Vögel-Sarkom-Virus 16* (Avian Sarcoma Virus 16, ASV 16) das retrovirale Onkogen *v-p3k*, dessen Genprodukt homolog zur katalytischen Untereinheit der *PI3-Kinase* ist. In Hühnern steht das ASV 16 im Zusammenhang mit der Entstehung von Hämangiosarkomen. Untersuchungen an Hühnerembryofibroblasten zeigten, dass das identifizierte Onkogen die maligne Transformation der Zellen induziert und dass sich erhöhte *PI3-Kinase* Aktivitäten in den transformierten Zellen nachweisen lassen (Chang et al., 1997). Untersuchungen von *Aoki* et al. bestätigten, dass die onkogene Eigenschaft des *v-p3k* von der Lipid-Kinasen-Aktivität abhängig zu sein scheint (Aoki et al., 2000). Der *PI3K/AKT*-Signalweg liegt in multiplen Krebsarten aktiviert vor und wird dort mit der malignen Transformation in Zusammenhang gebracht (Cantley, 2002; Vivanco und Sawyers, 2002). Amplifikationen des *PIK3CA*-Gens werden in vielen verschiedenen Tumortypen beschrieben (Nakayama et al., 2007). In Plattenepithel-Karzinomen der Kopf- und Hals-Region wird das Vorkommen von *PIK3CA*-Amplifikationen bereits als unabhängiger Prognosefaktor beschrieben, von dem auf Tumoraggressivität und Langzeitüberleben geschlossen werden kann (Singh et al., 2002b).

1.4.3 PIK3CA und Ovarialkarzinome

PIK3CA-Amplifikationen gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen in humanen Ovarialkarzinomen (Shayesteh et al., 1999). Der Zusammenhang von *PIK3CA*-Amplifikationen zu Tumorphänotyp und Prognose ist in Ovarialkarzinomen zum großen Teil noch unerforscht. Es wird jedoch vermutet, dass die Aktivierung des *PI3K/AKT*-Signalwegs durch Amplifikationen oder somatische Punktmutationen auch

an der Tumorentstehung im Ovar beteiligt ist (Campbell et al., 2004; Nakayama et al., 2007; Shayesteh et al., 1999; Willner et al., 2007; Woenckhaus et al., 2007; Zhang et al., 2007). Die prognostische Relevanz von *PIK3CA*-Amplifikationen in Ovarialkarzinomen ist unklar (Campbell et al., 2004). Bezüglich der Korrelation von *PIK3CA*-Amplifikationen mit dem histologischen Tumortyp, dem FIGO-Stadium und dem Malignitätsgrad finden sich in der Literatur keine einheitlichen Angaben (Abubaker et al., 2009; Kolasa et al., 2009; Mayr et al., 2006; Nakayama et al., 2007; Woenckhaus et al., 2007). Es scheint, dass *PIK3CA*-Amplifikationen eher mit serösen Tumoren assoziiert sind, wohingegen *PIK3CA*-Mutationen in endometroiden und klarzelligen Tumoren häufiger vorkommen (Campbell et al., 2004; Willner et al., 2007). In Tumoren mit *PIK3CA*-Amplifikationen ließen sich in einzelnen Studien Resistenzen gegenüber platin- und taxanhaltigen Chemotherapien nachweisen (Kolasa et al., 2009). Die Behandlung von ovariellen Zellkulturen mit *PI3-Kinase*-Inhibitoren reduziert *in vitro* die Zellproliferation und fördert die Apoptose (Shayesteh et al., 1999; Zhang et al., 2009). Aufgrund dieser Beobachtungen liegt die Vermutung nahe, dass die Aktivierung der *PI3-Kinase* möglicherweise einen bedeutsamen Einfluss auf das Tumorwachstum hat und in diesem Fall auch ein effektives molekulares Therapieziel darstellen würde (Andrew, 1999).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Alle 121 Patientinnen des Hamburger Patientenkollektivs für den Ovarialtumor-Tissue-Micro-Array (TMA) wurden zwischen 1984 und 2001 in der gynäkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) oder am Albertinen Krankenhaus Hamburg behandelt. Die Operationspräparate wurden am Institut für Pathologie des UKE nach Formalinfixierung in Paraffin eingebettet. Die Diagnosestellung erfolgte an Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Präparaten. Die für diese Untersuchung aus dem pathologischen Archiv des UKE herausgesuchten mikroskopischen Schnitte wurden von einem Pathologen (A. Lübke) auf Verwertbarkeit gesichtet. Auf den HE-Schnitten wurden die für die Herstellung des Tissue-Micro-Arrays zu stanzenden Tumoreale markiert (A. Lübke). Dabei wurde jeweils ein repräsentativer Schnitt mit zugehörigem Block pro Patient, bei wenig vorhandenem Tumormaterial zusätzlich ein zweiter entsprechendes Tumorgewebe enthaltener Block, für den Tumor-Array ausgewählt. Alle Präparate wurden von einer Pathologin (R. Issa) histologisch der WHO-Klassifikation entsprechend nachbefundet.

Zusätzlich stand ein weiterer Ovarialtumor-TMA (Issa et al., 2009) zur Verfügung. Er umfasst 297 weitere Gewebeproben von Patientinnen aus dem Kantonsspital Basel, Schweiz.

2.1.2 Patientenkollektiv

Das Baseler Patientenkollektiv ist in Tabelle 4 zusammengefasst. Eine Übersicht über das Hamburger Patientenkollektiv gibt Tabelle 5. Das Gesamtkollektiv ist in Tabelle 6 dargestellt. 384 Ovarialtumore konnten histologisch klassifiziert werden. Im Gesamtkollektiv befinden sich 200 seröse, 68 endometroide, 44 muzinöse und 27 klarzellige Karzinome sowie 45 andere seltenere Tumore, darunter 10 Keimstrang-Stroma-Tumore, 5 maligne Brenner-Tumore, 15 Müller-Mischtumore sowie 15 undifferenzierte Tumore. Um ein Kollektiv ausschließlich invasiver Ovarialtumore vorliegen zu haben, wurden 4 Borderline-Tumore in der statistischen Ausarbeitung nicht mit berücksichtigt.

Tabelle 4: Baseler Patientenkollektiv

Baseler Ovarialtumor-TMA		n
Histotyp	serös	109
	endometroid	67
	muzinös	38
	klarzellig	24
	undifferenziert	15
	Müller-Mischumore	15
	maligne Brenner	5
	Keimstrang-Stroma-Tumore	10
Summe		283
FIGO-Stadium	I	58
	II	36
	III	98
	IV	1
Summe		193
Malignitätsgrad nach <i>Silverberg</i>	1	81
	2	91
	3	91
Summe		263
n auf TMA		297

Tabelle 5: Hamburger Patientenkollektiv

Hamburger Ovarialtumor-TMA		n
Histotyp	serös	91
	endometroid	1
	muzinös	6
	klarzellig	3
	Borderline	4
Summe		105
FIGO-Stadium	I	6
	II	5
	III	62
	IV	36
Summe		109
n auf TMA		121

Im Gesamtkollektiv wurden gemäß der FIGO-Klassifikation 64 der 302 ausgewerteten Tumore als Stadium I, 41 Fälle als Stadium II, 160 Fälle als Stadium III und 37 als Stadium IV eingestuft. In 116 der 418 Tumoren konnte auf Grund fehlender klinischer Daten keine Aussage zum FIGO-Stadium gemacht werden.

Das mittlere Alter der Patientinnen betrug 57,9 Jahre (24 bis 84 Jahre). Klinische Verlaufsdaten waren von 290 Patientinnen vorhanden. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 34,5 Monate (1 bis 210 Monate).

Tabelle 6: Gesamtkollektiv

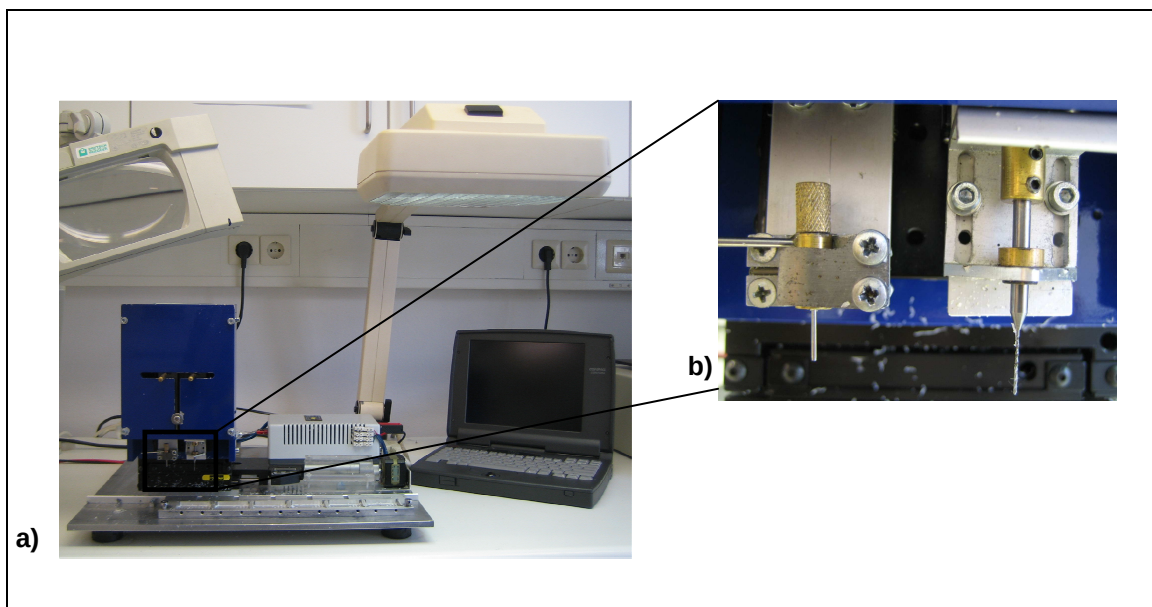
Patientenkollektiv (Basel und Hamburg)		n
Histotyp	serös	200
	endometroid	68
	muzinös	44
	klarzellig	27
	undifferenziert	15
	Müller-Mischtumore	15
	maligne Brenner	5
	Keimstrang-Stroma-Tumore	10
Summe		384
FIGO-Stadium	I	64
	II	41
	III	160
	IV	37
Summe		302
Malignitätsgrad nach <i>Silverberg</i>	1	81
	2	91
	3	91
Summe		263
n insgesamt auf TMA		418

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung des Tissue Micro Arrays (TMA)

Durch das TMA-Verfahren besteht die Möglichkeit bis zu tausend Gewebeproben verschiedener Tumore in einem einzelnen Paraffinblock nebeneinander aufzureihen. Aus den zuvor markierten Tumorarealen werden Gewebszylinder herausgestanzt und in einen leeren Paraffinblock eingebracht. Das TMA-Stanzgerät (Abb. 4) besteht aus einem Bohrer und einer an der Spitze geschärften Hohlneedle (Abb. 4b). Mit dem Bohrer werden zunächst 0,6 mm messende Löcher in einen leeren Paraffinblock gebohrt. Mit der Hohlneedle werden entsprechend grosse Tumorgewebestücke aus den Spenderblöcken gestanzt und in den Empfängerblock eingebracht.

Abbildung 4: Tissue-Micro-Array-Stanzgerät



a) Übersicht Arbeitsbereich, b) Detailansicht, Hohlneedle (links) und Bohrer (rechts)

Die TMA-Technik erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von hunderten von Geweben auf einem einzigen Objektträger und damit eine hochstandardisierte molekulare Untersuchung sämtlicher in eine Studie eingeschlossener Präparate (Simon und Sauter, 2003). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass trotz der Kleinheit der verwendeten Gewebeprobe (0,6 mm pro Tumor) an Tissue-Micro-Arrays repräsentative Forschungsergebnisse erzielt werden können (Nocito et al., 2001; Torhorst et al., 2001).

2.2.2 Immunhistochemie (IHC)

Die immunhistochemischen Färbemethoden basieren auf der Reaktion spezifischer Antikörper mit einem bestimmtem im präparierten Gewebe zu detektierenden Antigen. Man ist damit in der Lage jegliche Strukturen, gegen die Antikörper generiert werden können, im Gewebe (*in situ*) nachzuweisen. In der häufig angewandten *zwei-Schritt indirekten Methode* wird in einer ersten Reaktion ein speziell hergestellter unkonjugierter (unmarkierter) Primärantikörper eingesetzt, der an das Gewebsantigen bindet. In einem zweiten Schritt wird mit einem Enzym-gekoppelten oder Farbstoff- (Fluoreszenz-) markierten Sekundärantikörper, der gegen die Antigene des Primärantikörpers gerichtet ist, der Ort der Zielstruktur im Gewebe sichtbar gemacht. Diese Methode ist ausgesprochen sensitiv, da mehrere Sekundärantikörper mit verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren und das Signal dadurch verstärken (Leitch et al., 1994).

Für die vorliegende Arbeit wurde der monoklonale murine Antikörper „anti p53“, Klon DO1 der Firma Merck (Cat. # OP43L) verwendet. Für die Untersuchung wurden 4 µm dicke Gewebeschnitte in Xylol entparaffiniert und in einem Autoklaven bei pH 7,8 zur Antigendemaskierung vorbehandelt. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:3600 (entsprechend einer Konzentration von 0,2 ng/µl) eingesetzt. Das vollständige Immunhistochemie-Protokoll ist nachstehend beschrieben:

Vorbereitung:

- Der TMA wurde für mind. 1 h in Xylol inkubiert, GFS 2 x 5 min Xylol
- Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.

Vorbehandlung:

- Autoklavieren bei pH 7,8 für 5 min
- TBS-Puffer, 1 x 5 min

Peroxidase-Block:

- 1% H₂O₂ in Methanol für 10 min
- TBS-Puffer 2 x 5 min

Antikörper-Inkubation:

- „anti p53“, Klon DO1, Merck, Verdünnung 1:3600 für 2 h bei 30°C
- TBS-Puffer, 2 x 5 min
- EnVision Polymer-HRP Maus (Dako K4001) für 30 min bei 30°C
- EnVision Polymer-HRP Rabbit (Dako K4003)
- TBS-Puffer, 2 x 5 min

Chromogen:

- DAB-Chromogen (Liquid DAB DAKO K3468) für 10 min bei Raumtemperatur
- Aqua dest., 1x
- Haemalaun, für 1 min
- bläuen (Leitungswasser), 1 x 5 min
- aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
- eindecken

Auswertung der p53-IHC:

Alle Immunfärbungen wurden von einer Pathologin (R. Issa) ausgewertet. Ausschließlich nukleäre Färbungen wurden als p53-spezifisch gewertet. Dabei wurde die Intensität der nukleären Färbung in einer 4-Schritt-Skala (0, 1+, 2+, 3+) quantifiziert. Zudem wurde der Anteil gefärbter Tumorzellen je Gewebespot notiert. Aus diesen beiden Parametern wurde gemäß den Kriterien in Tabelle 7 ein abschließendes p53-IHC Resultat erstellt.

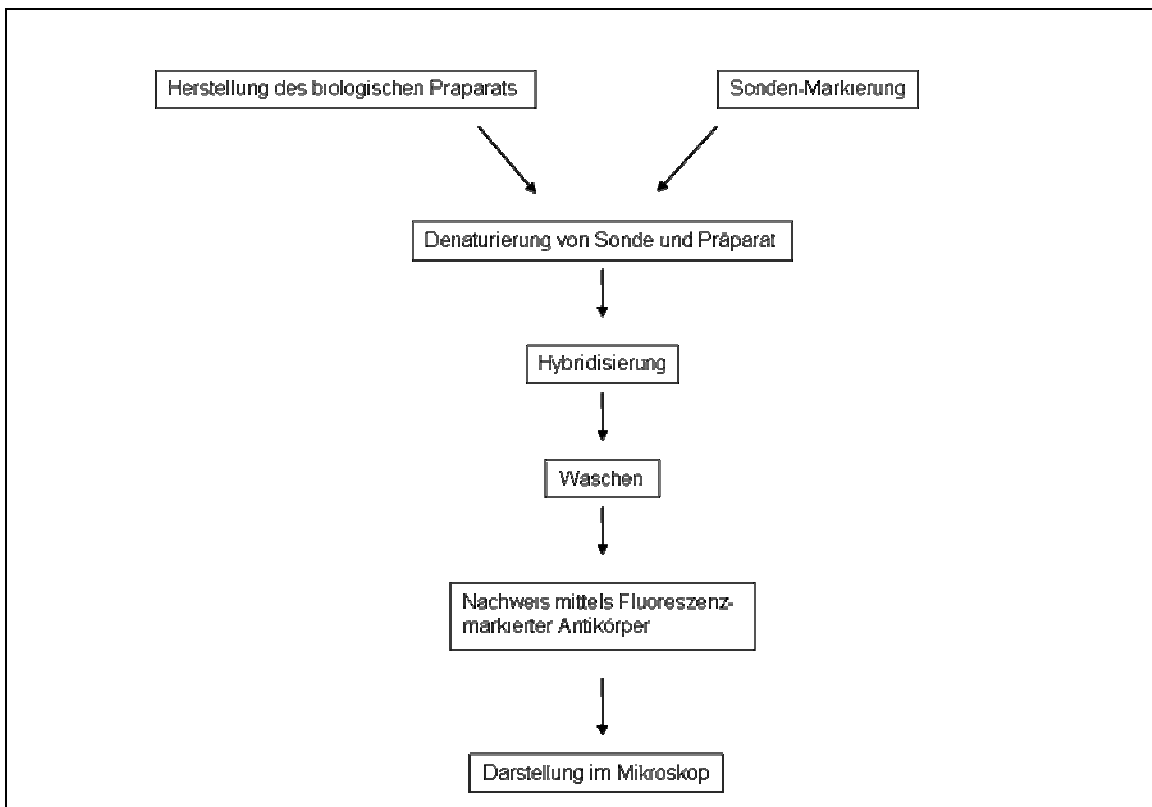
Tabelle 7: p53-Auswertung

IHC-Resultat	Kriterien
Negativ	Keine Färbung erkennbar (0)
Schwach	1+ Intensität in $\leq 70\%$ der Tumorzellen oder 2+ Intensität in $\leq 30\%$ der Tumorzellen
Moderat	1+ Intensität in $> 70\%$ der Tumorzellen oder 2+ Intensität in $> 30\%$ aber $\leq 70\%$ der Tumorzellen oder 3+ Intensität in $\leq 30\%$ der Tumorzellen
Stark	2+ Intensität in $> 70\%$ der Tumorzellen oder 3+ Intensität in $> 30\%$ der Tumorzellen

2.2.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist man in der Lage ausgewählte DNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen bis auf Chromosomenebene nachzuweisen. Die Methode basiert auf Biotin- oder Digoxigenin-markierten Nukleinsäure-Sonden, die zur gesuchten Sequenz komplementär sind und mit den DNA- beziehungsweise RNA-Abschnitten des biologischen Materials nach Denaturierung hybridisieren. Das neugebildete doppelsträngige Molekül ist aufgrund seiner Markierung direkt im Präparat (*in situ*) nachweisbar und mikroskopisch zu lokalisieren. Im Falle der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung erfolgt der Nachweis mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper oder anhand von Biotinmolekülen. Einen schematischen Überblick über die wichtigsten Abschnitte dieses analytischen Verfahrens gibt Abbildung 5.

Abbildung 5: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung



Überblick über den schematischen Ablauf der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Für die zweifarbige FISH-Analyse wurden 4 µm dicke TMA-Schnitte eingesetzt. Diese wurden vor der Hybridisierung entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Dies geschah gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis, Downers Grove, IL). Zur Hybridisierung wurde eine selbst hergestellte digoxigenierte BAC-

Sonde (3q26.3; BAC RP11-245C23, RZPD, Deutschland), welche das *PIK3CA*-Gen umfasst, eingesetzt. Als Referenz wurde eine kommerzielle Sonde für das Zentromer des Chromosom 3 (Spectrum orange, Vysis) verwendet. Die Markierung der selbst hergestellten DNA-Sonde mittels Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen) durchgeführt. Die Detektion der hybridisierten TMA-Schnitte wurde mit dem „Fluorescent Antibody Enhancer Set“ (Roche) durchgeführt. Im Folgenden werden einzelne Arbeitsschritte detaillierter beschrieben:

1) Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung

Die TMA-Schnitte wurden vor der Hybridisierung gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis) behandelt.

Verwendete Materialien:

- Destilliertes Wasser (dH₂O)
- Ethanol (70% / 80% / 95%)
- VP 2000 Pretreatment Reagent (Vysis)
- VP 2000 Protease Buffer (0,01N HCL) (Vysis)
- Xylol

Laborprotokoll: Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung

1. TMA-Schnitte 3 × 10 min ins Xylol stellen
2. TMA-Schnitte 2 × 5 min in Ethanol (95%) stellen
3. TMA-Schnitte 3 min auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen
4. TMA-Schnitte 15 min in 80°C warmer Pretreatmentlösung (Wasserbad) inkubieren
5. TMA-Schnitte 2 min in dH₂O waschen
6. TMA-Schnitte 150 min in 37°C warmer Proteaselösung (Wasserbad) inkubieren
7. TMA-Schnitte 2 min in dH₂O waschen
8. TMA-Schnitte 3 min in Ethanol (70%) stellen
9. TMA-Schnitte 3 min in Ethanol (80%) stellen
10. TMA-Schnitte 3 min in Ethanol (95%) stellen
11. TMA-Schnitte 3 min auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen

2) Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde mit einer selbst hergestellten genspezifischen Sonde (3q26.3, RZPD Nr.: RP11-245C23) und einer kommerziellen Sonde als Referenz für das Zentromer des Chromosoms 3 (Spectrum orange, Vysis) eingesetzt. Die kommerzielle Sonde wurde nicht in dem mitgelieferten Hybridisierungsmix verdünnt. Beide Sonden wurden gemeinsam in einem Gemisch mit humaner Cot-DNA (zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen/repetetiver Sequenzen) und einem Hybridisierungsmix (Master-Mix 1.0) auf die TMA-Schnitte gegeben, mit diesen für 10 min bei 72°C co-denaturiert und über Nacht bei 37°C hybridisiert. Sowohl Denaturierung, als auch Hybridisierung wurden im Hybrite (Vysis) durchgeführt.

Verwendete Materialien:

- 20 × SSC
- Cot - DNA
- Dextransulfat
- Formamid (deionisiert)

Laborprotokoll: Herstellen des Basis-Hybridisierungsmix

1. 5 ml deionisiertes Formamid, 1,5 ml 20 × SSC und 1 g Dextransulfat in ein kleines Becherglas geben
2. bei 60°C auf dem Heizrührer rühren, bis sich das Dextransulfat gelöst hat
3. Suspension mit HCl auf pH 7 einstellen
4. mit dH₂O auf 7 ml auffüllen
5. bei 4°C aufbewahren

Hybridisierungsmix (Master-mix 1.0)	Basis-Hybridisierungsmix	14 µl
	Cot-DNA	2 µl
	Sonden-DNA	4 µl
	Ansatz	20 µl

Laborprotokoll: Hybridisierung

1. Hybridisierungsmix auf den TMA geben
2. Eindeckeln mit einem 24 × 32 mm Deckgläschen
3. mit Rubbervement versiegeln
4. bei 75°C für 10 min im Hybrite denaturieren und dann über Nacht bei 37°C im Hybrite inkubieren

3) Waschen

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die TMA-Schnitte stringent gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu entfernen.

Verwendete Materialien

- 2 × SSC
- dH₂O
- NP40

Laborprotokoll: Waschen

1. TMA-Schnitte aus dem Hybrite nehmen und Rubbervement und Deckgläschen entfernen
2. Schnitte in Waschpuffer (2 × SSC; 0,3% NP40) bei Raumtemperatur stellen
3. Schnitte 2 min bei 72°C im Waschpuffer (2 × SSC; 0,3% NP40) waschen
4. Schnitte kurz in dH₂O waschen
5. Schnitte im Dunkeln lufttrocknen

4) Fluoreszenz-Detektion

Um möglichst deutliche Fluoreszenzsignale zu erhalten, wurden die Digoxigeninreste der selbst hergestellten Sonde über einen Komplex von drei Antikörpern detektiert, wobei der Tertiärantikörper fluoreszenzgekoppelt war. Hierzu wurde „Enhancer Detection Kit“ von Roche eingesetzt. Nach der Detektion wurden die Schnitte wieder im Dunkeln luftgetrocknet und dann mit DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI; H-1200 (Vector)) und einem 24 × 32 mm Deckgläschen eingedeckelt.

5) Auswertung

Für jeden Tumor wurde die Zahl von *Zentromer 3* (Zen3)- und *PIK3CA*-Signalen in den dominierenden Zellpopulationen geschätzt. Als Amplifikation wurde das Vorliegen von mindestens doppelt so vielen *PIK3CA*-Signalen wie *Zen3*-Signalen (Ratio $PIK3CA/Zen3 \geq 2,0$) definiert. Gewebeproben mit einer *PIK3CA/Zen3* Ratio zwischen 1,0 und 2,0 wurden als „Zugewinn“ bezeichnet. Alle anderen Gewebeproben wurden als normal definiert.

2.2.4 Statistik

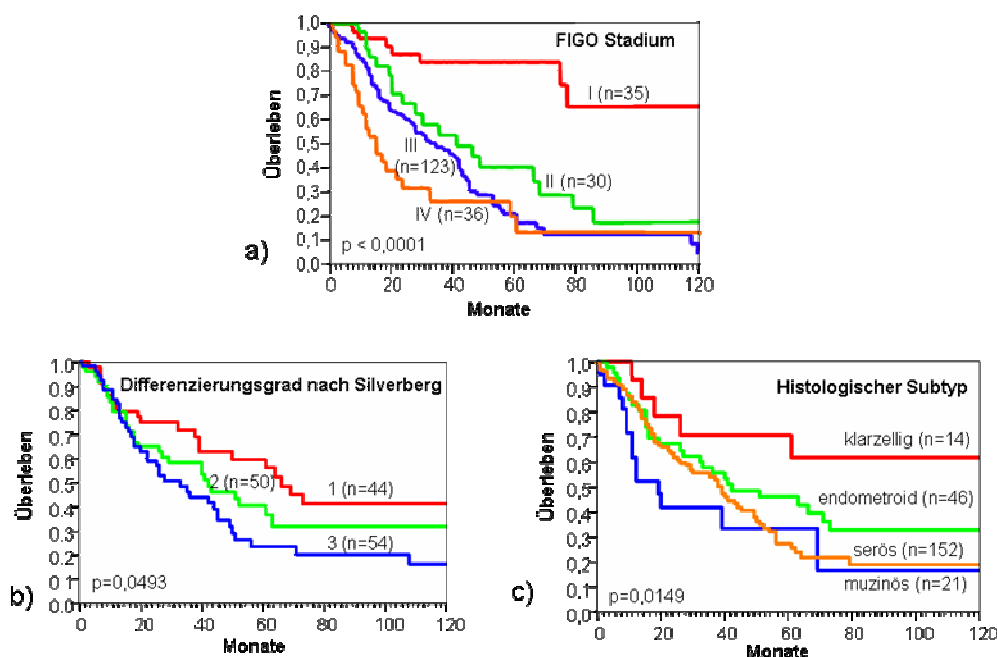
Um den Zusammenhang zwischen histologischem Tumortyp, Malignitätsgrad, Tumorstadium und Genamplifikationen darzustellen, wurden die „Contingency table analysis“ und der Chi-Quadrat-Test angewandt. Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte nach Kaplan-Meier. Der Log-rank-Test wurde angewandt, um den Zusammenhang zwischen Genamplifikationen und Patientenüberleben zu untersuchen. Mit Hilfe der Cox Regression (proportional hazards) wurden die Abhängigkeiten der analysierten Variablen untereinander in Relation zum Patientenüberleben gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Ergebnisse

Im dem vorliegenden Patientenkollektiv sind die klinischen Verlaufsdaten von 290 Patientinnen vorhanden. Anhand dieser Daten konnten die bekannten histopathologischen Prognoseparameter des Ovarialkarzinoms reproduziert werden. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit einem schlechteren Patientenüberleben zeigte sich für das FIGO-Stadium ($p < 0,0001$; Abb. 6a) und den Differenzierungsgrad nach *Silverberg* ($p = 0,0493$; Abb. 6b). Für die Auswertung des Differenzierungsgrads nach *Silverberg* waren nur von 148 Patientinnen sowohl Daten für den Differenzierungsgrad, als auch für das Patientenüberleben vorhanden. Ebenfalls konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zum histologischen Tumortyp nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein besseres Überleben für Patientinnen mit endometroidem oder serösem Tumortyp sowie für Patientinnen mit klarzelligem Tumortyp, als für Patientinnen mit Tumoren vom muzinösem Tumortyp ($p = 0,0149$; Abb. 6c). Sowohl die Fallzahl der muzinösen ($n = 21$), als auch der klarzelligen Tumore ($n = 14$) war gering.

Abbildung 6: Patientenüberleben in Abhängigkeit der bekannten Prognosemarker beim Ovarialkarzinom



a) Überleben in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium, b) Überleben in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad nach *Silverberg*, c) Überleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

3.2 Nukleäre p53-Anreicherung

3.2.1 Immunhistochemie (IHC)

Die immunhistochemische Bestimmung der nukleären p53-Anreicherung war in 357 der 418 Tumore des Gesamtkollektivs erfolgreich. Von insgesamt 61 Tumoren konnte kein IHC-Ergebnis gewonnen werden, weil entweder keine eindeutigen Tumorzellen im Gewebespot vorhanden waren, oder weil der Gewebespot während des Experimentes vom Objektträger abgeschwommen war. In 330 Fällen lagen sowohl immunhistochemische Daten für die nukleäre p53-Anreicherung, als auch Angaben zum histologischen Subtyp vor.

1. Unter den 357 erfolgreich analysierten Tumoren zeigten im Gesamtkollektiv 158 (44,3%) eine p53-Positivität; darunter 31 Tumore (8,7%) mit schwacher, 12 (3,4 %) mit mittelgradiger und 115 (32,2%) mit starker nukleärer p53-Anreicherung (Tab. 8). Unter den 330 analysierbaren Fällen mit vorliegenden Angaben zur Histologie (171 serös, 32 muzinös, 59 endometroid, 26 klarzellig und 42 andere seltenere Tumore, davon 14 Müller-Mischtumore, 9 Keimstrang-Stromatumore, 5 maligne Brennertumore und 14 undifferenzierte Tumore) fand sich eine p53-Positivität in 44,2% (146/330) der analysierten Tumore (Tab. 8). In der Gruppe der serösen Ovarialkarzinome zeigten 92 (53,8%) von 171 auswertbaren Tumoren eine p53-Positivität, darunter 12 (7,0%) mit schwacher, 6 (3,5%) mit mittelgradiger und 74 (43,3%) mit starker nukleärer p53-Anreicherung (Tab. 8). Die Ergebnisse innerhalb der anderen histologischen Subgruppen finden sich in Tabelle 8.

Eine mögliche Assoziation zwischen dem p53-Status und dem FIGO-Stadium bzw. dem Malignitätsgrad nach *Silverberg* wurde am Gesamtkollektiv und in der Gruppe mit ausschließlich serösen Tumoren überprüft.

2. Die p53-Positivität war signifikant mit einem hohen Malignitätsgrad (nach *Silverberg*) assoziiert ($p < 0,0001$; Tab. 8). Dies bestätigte sich auch in der Gruppe der serösen Ovarialkarzinome ($p = 0,0009$; Tab. 8).

3. Eine p53-Positivität konnte auch häufiger in fortgeschritteneren Stadien (FIGO III und IV) statistisch signifikant nachgewiesen werden ($p < 0,0001$; Tab. 8). In der Gruppe der serösen Karzinome kam dieses Ergebnis nicht zum Ausdruck ($p = 0,7392$; Tab. 8).

4. Unter den serösen Tumoren zeigte sich häufiger eine nukleäre *p53*-Anreicherung, als unter allen anderen histologischen Subtypen. Im Vergleich zu den muzinösen ($p=0,0053$; Tab. 8) sowie den klarzellig Karzinomen ($p=0,0005$, Tab. 8) war dieser Unterschied statistisch signifikant. Tendenziell zeigten seröse Tumore häufiger eine *p53*-Positivität als endometroide Karzinome ($p=0,0928$; Tab. 8). Alle Ergebnisse der *p53*-Immunhistochemie sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: p53-Immunhistochemie und Tumorphänotyp

p53-Analyse (IHC)								
		n	n analysierbar	negativ (%)	schwach (%)	mittel-gradig (%)	stark (%)	p-Wert
Gesamtkollektiv		418	357	55,7	8,7	3,4	32,2	
Fälle mit bekannter Histologie		384	330	55,8	8,8	3,0	32,4	
Histotyp	serös	200	171	46,2	7,0	3,5	43,3	
	muzinös	44	32	71,9	12,5	3,1	12,5	0,0053*
	endometroid	68	59	64,4	6,8	1,7	27,1	0,0928**
	klarzellig	27	26	84,6	7,7	0,0	7,7	0,0005***
	Müller-Mischtumore	15	14	50,0	14,3	0,0	35,7	
	maligne Brenner	5	5	20,0	40,0	20,0	20,0	
	Keimstrang-Stroma-Tumore	10	9	77,8	0,0	11,1	11,1	
	undifferenziert	15	14	50,0	21,4	0,0	28,6	
FIGO-Stadium	I	64	56	80,4	7,1	0,0	12,5	< 0,0001
	II	41	34	47,1	20,6	2,9	29,4	
	III	160	137	46,7	10,9	5,8	36,5	
	IV	37	33	33,3	6,1	3,0	57,6	
FIGO-Stadium, seröse Tumore	I	14	13	53,9	0,0	0,0	46,2	0,7392
	II	18	14	35,7	14,3	7,1	42,9	
	III	102	84	48,8	7,1	4,8	39,3	
	IV	26	25	36,0	8,0	4,0	52,0	
Malignitätsgrad nach Silverberg	1	81	65	87,7	3,1	3,1	6,2	< 0,0001
	2	91	79	60,8	11,4	2,5	25,3	
	3	91	82	43,9	8,5	2,4	45,1	
Silverberg, seröse Tumore	1	18	14	92,9	0,0	7,1	0,0	0,0009
	2	38	32	53,1	12,5	3,1	31,3	
	3	52	45	40,0	4,4	2,2	53,3	

* serös versus muzinös, ** serös versus endometroid, ***serös versus klarzellig

3.2.2 Prognoserelevanz der p53-Positivität

Für diese Analyse wurden die *p53*-IHC-Ergebnisse in zwei Gruppen (*p53* negativ versus *p53* positiv) eingeteilt. Zu den *p53*-positiven Tumoren zählten alle Karzinome mit mindestens schwacher *p53*-Positivität. Es lagen insgesamt für 248 Tumore des Gesamtkollektivs sowohl *p53*-IHC-Daten als auch Angaben zur Überlebenszeit vor.

Der *p53*-Status zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit der Patientenprognose. Eine *p53*-Positivität war mit einem kürzeren Langzeitüberleben assoziiert ($p < 0,0001$; Abb. 7a). Zudem wurde der *p53*-Status in der Gruppe der FIGO III-Tumore genauer untersucht, da diese Gruppe im vorliegenden Kollektiv die zahlenmäßig größte darstellt. Der Einfluss der *p53*-Positivität auf das Überleben war auch in dieser Gruppe nachweisbar ($p=0,0034$; Abb. 7b).

Innerhalb der Gruppe der serösen Tumore konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden ($p=0,5968$, Abb. 8)

Abbildung 7: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom p53-Status (p53 positiv versus p53 negativ)

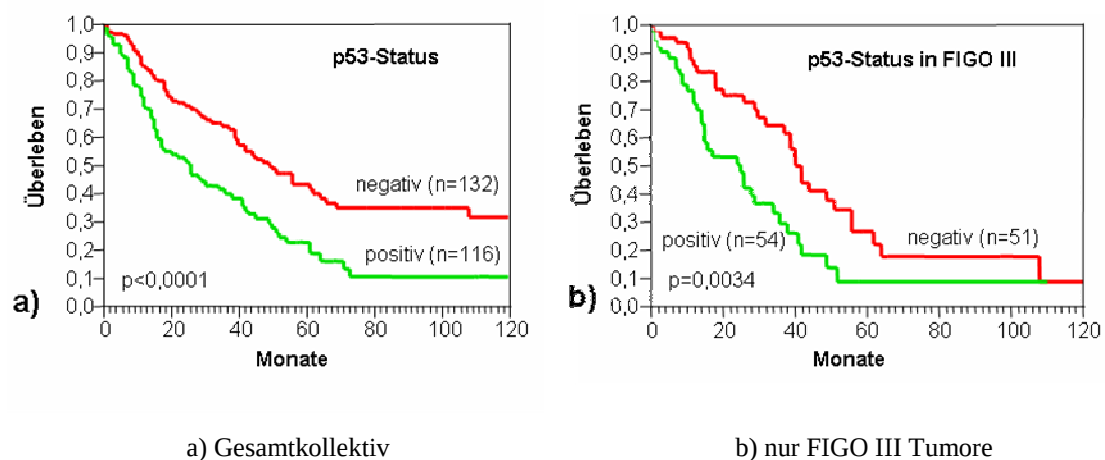
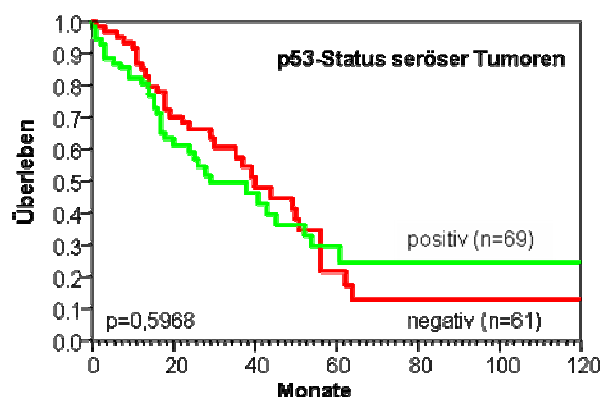


Abbildung 8: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom p53-Status seröser Tumore



3.3 PIK3CA-Amplifikation

3.3.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung war in 288 der 418 Tumore des Gesamtkollektivs erfolgreich. In 130 Tumoren konnte kein Ergebnis gewonnen werden, da entweder keine eindeutigen Tumorzellen im Gewebespot vorhanden waren, die Intensität des Hybridisierungssignals zu gering für eine Auswertung war, oder weil der Gewebespot während des Experimentes abgeschwommen war. In 264 Fällen lagen sowohl Daten zur Tumorphistologie, als auch FISH-Ergebnisse der *PIK3CA*-Analyse vor.

1. Von den 288 analysierbaren Tumoren zeigten im Gesamtkollektiv 22 (7,6%) eine *PIK3CA*-Amplifikation und weitere 22 (7,6%) einen *PIK3CA*-„Zugewinn“ (Genomvermehrung, welche die Kriterien einer Amplifikation nicht erfüllt). Die Amplifikation war in der Regel geringgradig mit weniger als 10 Gensignalen pro Tumorzelle. In zwei Fällen lag eine hochgradige Amplifikation mit mehr als 10 Gensignalen pro Tumorzelle vor. Unter den 264 Tumoren mit bekannter Histologie zeigten 19 (7,2%) Tumore eine *PIK3CA*-Amplifikation. In 22 Fällen (8,3%) lag ein „Zugewinn“ der *PIK3CA*-Region vor (Tab. 9). In der Gruppe der 148 serösen Tumore lagen in 10 Fällen (6,8%) *PIK3CA*-Amplifikationen vor, in 17 Fällen (11,5%) fanden sich „Zugewinne“ (Tab. 9).

Eine mögliche Assoziation zwischen dem Auftreten von *PIK3CA*-Amplifikationen und dem FIGO-Stadium bzw. dem Malignitätsgrad nach *Silverberg* wurde am Gesamtkollektiv und in der Gruppe mit ausschließlich serösen Tumoren überprüft.

2. Eine Korrelation der Amplifikations-/„Zugewinn“-Raten mit fortschreitendem FIGO-Stadium war weder im Gesamtkollektiv ($p=0,2596$, Tab. 9), noch in der Gruppe der serösen Tumore ersichtlich ($p=0,2500$; Tab. 9).

3. In beiden Kollektiven zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Malignitätsgrad nach *Silverberg* und dem Auftreten von *PIK3CA*-Amplifikationen (Gesamtkollektiv: $p=0,6369$, Kollektiv seröser Tumore: $p=0,5931$; Tab. 9).

4. *PIK3CA*-Amplifikationen wurden tendenziell häufiger in endometroiden (12%) als in serösen (6,8%) Tumoren gefunden. Allerdings war die Gesamtzahl aller *PIK3CA*-Veränderungen (Amplifikationen und "Zugewinne") in beiden Tumortypen nahezu identisch (endometroid: 18%; serös: 18,3%; $p=0,2581$; Tab 9). *PIK3CA*-Veränderungen fanden sich tendenziell häufiger in serösen (6,8% Amplifikationen), als in muzinösen Tumoren (0,0% Amplifikationen, $p=0,0509$; Tab. 9). Die muzinösen Tumore zeigten ausschließlich *PIK3CA*- "Zugewinne" (3,3%), wohingegen in keinem der 30 muzinösen Tumore eine Amplifikation zu finden war (Tab. 9). Alle Ergebnisse der FISH-Analyse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Ergebnisse der *PIK3CA* Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

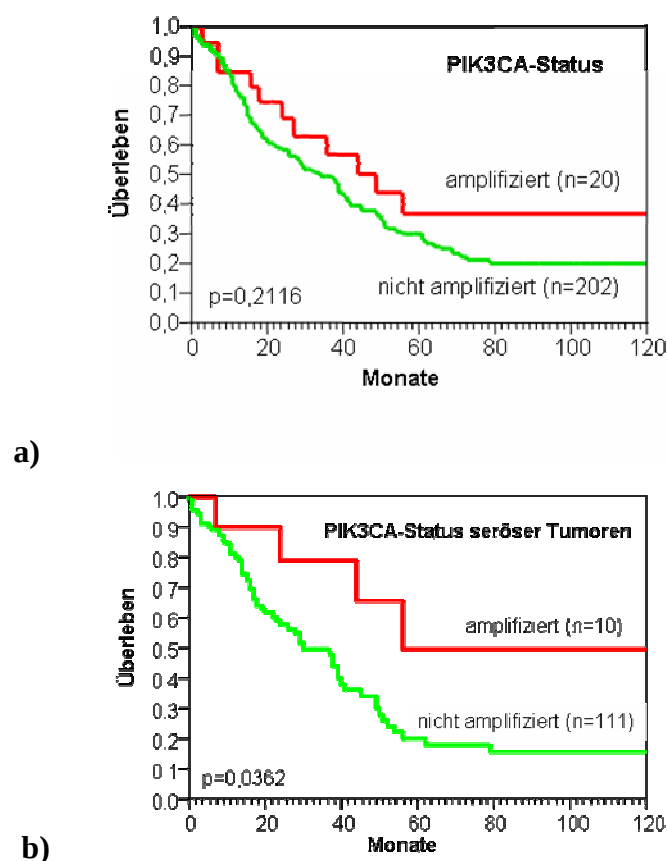
PIK3CA-Analyse (FISH)						
		n	n analysierbar	Amp (%)	Zugewinne (%)	p
Insgesamt		418	288	7,6	7,6	
Fälle mit bekannter Histologie		384	264	7,2	8,3	
Histotyp	serös	200	148	6,8	11,5	
	endometroid	68	50	12,0	6,0	0,2581*
	muzinös	44	30	0,0	3,3	0,0509**
	klarzellig	27	15	13,3	0,0	
	Müller-Mischtumore	15	4	0,0	0,0	
	Maligne Brenner	5	4	0,0	0,0	
	Keimstrang-Stroma-Tumore	10	5	20,0	20,0	
	undifferenziert	15	8	0,0	0,0	
FIGO-Stadium	I	58	40	12,5	2,5	$p=0,2596$
	II	39	30	3,3	6,7	
	III	148	110	8,2	6,4	
	IV	31	35	5,7	17,1	
FIGO-Stadium seröse Tumore	I	58	9	0,0	11,1	$p=0,2500$
	II	39	13	0,0	7,7	
	III	148	75	6,7	8,0	
	IV	31	24	8,3	25	
Malignitätsgrad nach <i>Silverberg</i>	1	80	53	7,6	5,7	$p=0,6369$
	2	89	49	10,2	4,1	
	3	88	59	3,4	3,4	
<i>Silverberg</i> seröse Tumore	1	80	11	9,1	9,1	$p=0,5931$
	2	89	17	0,0	5,9	
	3	88	36	2,8	2,8	

n = Anzahl der Ovarialtumoren, Amp = Amplifikation, *PIK3CA* Amplifikation: *serös versus endometroid, **serös versus muzinös

3.3.2 Prognoserelevanz der PIK3CA-Amplifikation

Es lagen insgesamt für 222 Tumore des Gesamtkollektivs sowohl Daten der *PIK3CA*-FISH-Analyse als auch Angaben zur Überlebenszeit vor. Bei der Betrachtung der Überlebenszeiten konnte für das Auftreten von *PIK3CA*-Amplifikationen im Gesamtkollektiv kein eindeutiger Einfluss auf die Patientenprognose beobachtet werden. Tendenziell zeigte sich eine eher längere Überlebenszeit bei Patientinnen deren Tumor eine *PIK3CA*-Amplifikation aufwies (Abb. 9a). Dieses Ergebnis war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,2116$) und muss mit Vorsicht betrachtet werden, da die Zahl *PIK3CA*-positiver Tumoren ($n=20$) niedrig ist. Innerhalb der serösen Tumore erwies sich diese Beobachtung jedoch als statistisch signifikant ($p=0,0362$). *PIK3CA*-amplifizierte, seröse Tumore korrelieren mit einer längeren Überlebenszeit, als seröse Tumore ohne *PIK3CA*-Amplifikation (Abb. 9b).

Abbildung 9: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom PIK3CA-Status



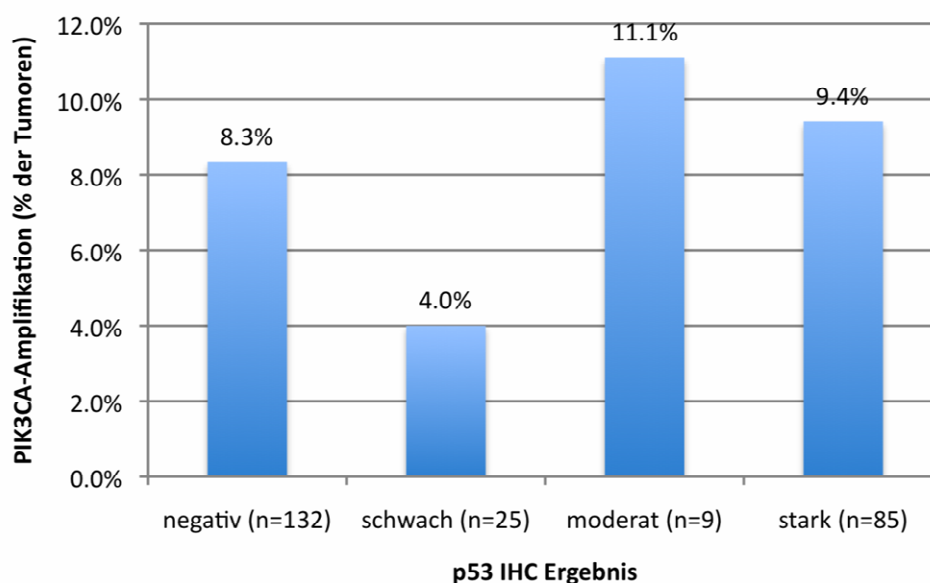
a) Gesamtkollektiv, b) nur seröse Tumore

3.4 Assoziation zwischen dem p53-Status und der PIK3CA-Amplifikation

Für die Beurteilung einer Assoziation zwischen dem *p53*-Status und der *PIK3CA*-Amplifikation lagen im Gesamtkollektiv für 251 von 418 Tumoren beide Untersuchungsergebnisse vor und konnten für diese Analyse verwendet werden.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem *p53*-Status und dem Vorliegen einer *PIK3CA*-Amplifikation war aus den Daten nicht ersichtlich. So fand sich die Amplifikation praktisch gleich häufig in *p53*-negativen (11/132, 8,3%) und *p53*-positiven Tumoren (10/119, 8,4%; $p=0,8118$). Auch in der Gruppe der serösen Tumore war kein Trend zu erkennen (*p53*-negative Tumore: *PIK3CA*-Amplifikation in 8,9% der Fälle, *p53*-positive Tumore: *PIK3CA*-Amplifikation in 8,5% der Fälle, $p=0,4635$). Der prozentuale Anteil an *PIK3CA*-Amplifikationen in den Tumoren des Gesamtkollektivs aufgegliedert nach *p53*-Status ist in Abbildung 10 dargestellt.

Abbildung 10: Prozentualer Anteil an PIK3CA-Amplifikationen in den Tumoren aufgegliedert nach p53-Status ($p=0,8118$)

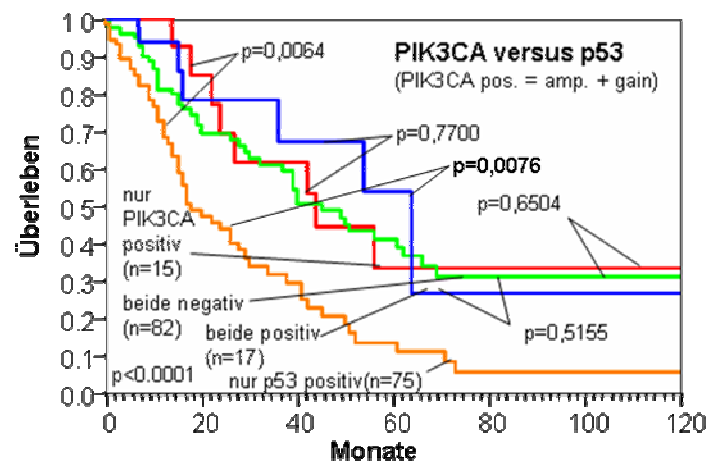


3.4.1 Überlebenszeiten in Abhängigkeit des p53- und des PIK3CA-Status

Die *PIK3CA*-amplifizierten Tumore zeigen unabhängig vom *p53*-Status (Gruppe "beide positiv" und "nur *PIK3CA* positiv", Abb. 11) im Vergleich zu den nicht *PIK3CA*-amplifizierten *p53*-positiven Tumoren (Gruppe "nur *p53* positiv") eine signifikant bessere Prognose. So haben Patientinnen mit *p53*-positiven Tumoren einen

signifikanten Überlebensvorteil, wenn zusätzlich eine *PIK3CA*-Amplifikation nachzuweisen ist ($p=0,0076$, Abb. 11). Ebenfalls zeigen Patientinnen mit Tumoren, die für *p53* negativ sind, jedoch eine *PIK3CA*-Amplifikation aufweisen ("nur *PIK3CA* positiv", Abb. 11) eine bessere Prognose, als diejenigen Patientinnen deren Tumor alleinig für *p53* positiv ("nur *p53* positiv", Abb. 11) ist ($p=0,0064$). Demnach scheint das Auftreten von *PIK3CA*-Amplifikationen in einigen Fällen einen Überlebensvorteil für Patientinnen mit Ovarialkarzinomen zu bedeuten.

Abbildung 11: Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom *p53*- und *PIK3CA*- Status



In der Gruppe die keine der beiden genomischen Veränderungen aufweist (Gruppe "beide negativ", Abb. 11) sind in dieser Untersuchung im Vergleich zu der Gruppe mit Amplifikationen im Bereich der *PIK3CA*-Genregion ("nur *PIK3CA* positiv", Abb. 11), keine statistisch signifikanten Überlebensvorteile zu erkennen ($p=0,6504$). Auch in der Gruppe mit sowohl *p53*- als auch *PIK3CA*-Veränderungen ("beide positiv", Abb. 11) war kein signifikanter Unterschied bezüglich der Patientenprognose im Vergleich zu der Gruppe mit keinen der beiden genomischen Veränderungen ("beide negativ", Abb. 11) ersichtlich ($p=0,5155$). Auch im Vergleich der Überlebenskurven der Gruppe mit beiden genomischen Veränderungen ("beide positiv", Abb. 11) zu der Gruppe in der nur die *PIK3CA*-Region amplifiziert vorlag ("nur *PIK3CA* positiv", Abb. 11), zeigte sich kein eindeutiger Unterschied bezüglich der Überlebenszeiten ($p=0,7700$).

3.4.2 Multivariate Analyse

Um den wichtigsten Einfluss auf das Patientenüberleben zu bestimmen, wurde eine multivariate Analyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass *p53* und das Tumorstadium unabhängige Prognosemarker waren (Tab. 10a), während der *PIK3CA*-

Amplifikationsstatus keinen vom Tumorstadium unabhängigen Prognosefaktor darstellte (Tab. 10b).

Tabelle 10: Ergebnisse der multivariaten Analyse der Prognoseparameter; a) Multivariate Analyse *p53* b) Multivariate Analyse *PIK3CA*

a)

Parameter		p-Wert*
FIGO-Stadium	I-IV	0,0001
Grad nach <i>Silverberg</i>	1-3	0,8701
<i>p53</i>	negativ, positiv	0,0378

b)

Parameter		p-Wert*
FIGO-Stadium	I-IV	<0,0001
Grad nach <i>Silverberg</i>	1-3	0,8637
<i>PIK3CA</i> -Amplifikation	amplifiziert, normal	0,5958

* COX proportional hazards test

4 Diskussion

p53

Das Tumorsuppressorgen *p53* wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es den Zellzyklus kontrolliert und unter bestimmten Bedingungen, wie etwa irreparablen DNA-Schäden, den programmierten Zelltod (Apoptose) einleitet. Mutationen des *p53*-Genes führen häufig zu einem funktionell inaktiven Gen und somit zum Überleben der geschädigten Zellen. Als Folge können in diesen Zellen weitere genetische Veränderungen akkumulieren, sodass es im ungünstigen Fall zur malignen Entartung kommt. Alterationen des *p53*-Tumorsuppressorgens gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen in soliden Tumoren. Auch in epithelialen Ovarialtumoren stellen *p53*-Mutationen die zahlenmäßig bedeutendste und am intensivsten untersuchte bekannte genetische Veränderung dar (Frank et al., 1994; Kohler et al., 1993; McManus et al., 1994; Milner et al., 1993; Okamoto et al., 1991). Viele inaktivierende *p53*-Mutationen führen zu einer verlängerten Halbwertszeit des *p53*-Proteins und werden erst dadurch mit der Immunhistochemie nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mit Immunhistochemie nachweisbare nukleäre *p53*-Anreicherung in etwa 44% (158/357) der malignen Ovarialtumore des TMA gefunden.

Dieser Wert korreliert gut mit publizierten Ergebnissen aus anderen Studien (Kmet et al., 2003). Kmet et al. haben 2003 in einer Übersichtsarbeit 98 Studien, die sich mit *p53* in Ovarialtumoren befassten, zusammengefasst. Die beschriebenen Studien wurden alle bis Ende des Jahres 2000 innerhalb der MEDLINE-, PubMed- und Ingenta-Datenbank veröffentlicht. Unter den 98 Studien, die sich mit *p53* beschäftigten, bezogen sich 93 auf das invasive Ovarialkarzinom. Insgesamt wurden 6839 Tumore untersucht, in 3521 Tumoren (51%) wurde eine gesteigerte nukleäre *p53*-Anreicherung gefunden. Die *p53*-Positivitäten lagen in den verschiedenen Studien zwischen 30 und 56% (Kmet et al., 2003).

In dieser Studie wurde zur Detektion der nukleären *p53*-Anreicherung der für den Gebrauch in formalinfixiertem Archivgewebe optimierte Antikörper DAK DO-1 verwendet. Die publizierten Daten spiegeln die grundsätzlichen Probleme der immunhistochemischen Analyse wieder. So wird deutlich, dass die Prävalenz der

nukleären *p53*-Anreicherung unter anderem von der Verwendung bestimmter Antikörper abhängig ist. Mehr als 50% der Karzinome, die mit *DO-1*, *DO-7*, *PAb-1801*, *Ab-6* und *BP53-12* detektiert wurden, waren *p53*-positiv. Hingegen zeigten nur 30% der mit den Antikörpern *CM-1* und *PAb-240* getesteten Tumore *p53*-Positivitäten (Kmet et al., 2003). In Tabelle 11 sind beispielhaft einige größere Studien aufgeführt (Anreder et al., 1999; Anttila et al., 1999; Chan et al., 2000; Dong et al., 1997; Eccles et al., 1992; Inoue et al., 1994; Kiyokawa, 1994; Levesque et al., 1995; Lianidou et al., 1999; Marks et al., 1991; Newcomb et al., 1999; Nijman et al., 1999; Saegusa et al., 2000; Sheridan et al., 1994; van Haaften-Day et al., 1996; Zheng et al., 1995; Zwahlen et al., 2000).

Die Immunhistochemie ist der Goldstandart für *in situ* Proteinanalysen in Tumorgeweben (Simon et al., 2010). Die Kombination aus IHC und der TMA-Technologie erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von hunderten von Geweben auf einem einzigen Objektträger und damit eine hochstandardisierte molekulare Untersuchung sämtlicher in eine Studie eingeschlossener Präparate (Simon und Sauter, 2003; Simon et al., 2010). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass trotz der Kleinheit der verwendeten Gewebeprobe (0,6 mm pro Tumor) an Tissue-Micro-Arrays repräsentative Forschungsergebnisse erzielt werden können (Sauter, 2010). Die Entwicklung optimaler Laborprotokolle ist für TMA-Untersuchungen von großer Bedeutung, da schon kleinere Protokollschwankungen Auswirkungen auf das immunhistochemische Resultat haben können (Simon et al., 2010).

Tabelle 11: p53 in Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers; ausgewählte Studien zur nukleären p53-Anreicherung in malignen Ovarialtumoren mit Angaben zur Assoziation einer p53-Positivität mit Tumorphänotyp und Prognose

Studie	n	Methode/AK bzw. Mut	% positiv (n pos/n)	Assoziation
Dong et al. 1997	125	IHC / DO7 (MAb, Novocastra, 1:100)	23 (29/125) low 47 (59/125) high (high: >25% positive Zellen)	nicht muzinöser Tumortyp hoher Malignitätsgrad fortgeschrittenes Stadium schlechte Prognose in gut-differenzierten Tumoren kürzeres Langzeitüberleben
Saegusa et al. 2000	124	IHC / DO-7 (Novocastra Lab. Ltd, Newcastle, UK, x500 dilution).	46 (57/124)	seröser Tumortyp
Zwahlen et al. 2000	12	IHC / DO-7 (MAb; M7001, Dako-p53, DO-7; Dako, Glostrup, Denmark, 1:50).	58 (7/12)	p73a-Protein Expression
Sheridan et al. 1994	20 93	IHC / DO-7 (NovoCastra)	50 (10/20) 47 (44/93)	p53-Missense-Mutationen Tendenz zu fortgeschrittenem Stadium
Anreder et al. 1999	48	IHC / MoAb-1801 (Dakopatts, Santa Barbara, Calif., 1:50)	62,5 (30/48)	Malignität kürzeres Langzeitüberleben
Eccles et al. 1992	23	IHC / PAb-1801 und PAb-240	52 (12/23)	LOH 17p in fortgeschrittenem Stadium seröser Tumoren
Marks et al. 1991	107	IHC / PAb-1801	50 (54/107)	p53-Mutationen Aneuploidie in Stadium III/IV
Inoue et al. 1994	60	IHC / PAb-1801	38 (23/60)	hoher Malignitätsgrad p53- Missense-Mutationen
van Haften-Day et al. 1996	16	IHC / DO-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 1:100)	31 (5/16)	Malignität seröser Tumortyp
Lianidou et al. 1999	55	IHC / DO-1 und CM-1 PCR / Exons 5-9	27 (15/55) 29 (16/55)	p53-Positivität korreliert mit Missense-Punktmutationen Mutationen in Exons 5-8 p53-Mutation häufiger in Grad 3 Tumoren und im serösen Typ beide: Stadium III/IV
Nijman et al. 1999	20	IHC / DO-1 (IgG2a, 1:3) und BP53-12 (IgG2a, 1:100)	40 (8/20)	Malignität Anstieg Post-Chemotherapie
Newcomb et al. 1999	53	IHC / BP53-12 (BioGenex, San Ramon, CA, 1:100)	60 (32/53)	p53 ist <i>kein</i> unabhängiger prognostischer Marker
Kiyokawa et al. 1994	50	IHC / BP53-12 (Japan Tanner/Bioprob, Kobe, Japan)	60 (30/50)	Malignität fortgeschrittenes Stadium DNA-Aneuploidie hoher Ki-67 Index
Chan et al. 2000	46 31	IHC / Ab-6 (Calbiochem, MA; 1:25) PCR-SSCP/ Exons 5–11	54 (25/46) 55 (17/31)	Malignitätsgrad: Grad 1 < Grad 2 < Grad 3 Malignität
Anttila et al. 1999	316	IHC / CM-1 (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK, 1:1200)	26 (83/316)	schlechte Prognose
Levesque et al. 1995	90	IHC / PAb-240 (mutantes P53) plus CM-1 (mutantes und Wildtyp p53)	43 (39/90)	kürzeres rezidivfreies Intervall kürzeres Langzeitüberleben höheres Rezidivrisiko und Tod bei Grad 1 und Grad 2 Tumoren
Zheng et al. 1995	46	PCR-SSCP / Exons 5-8	52 (24/46)	Malignität LOH Chr. 17p

n = Anzahl der Ovarialkarzinome, AK = Antikörper, Mut = Mutation, pos = positiv, IHC = Immunhistochemie, PCR = Polymerase Chain Reaction, LOH = Loss of Heterozygosity, Chr. = Chromosom, SSCP = Single Strand Conformation Polymorphism

Der in dieser Arbeit gefundene statistisch signifikante Zusammenhang einer erhöhten nukleären *p53*-Anreicherung mit einem fortgeschrittenen FIGO-Stadium ($p < 0,0001$) und mit entdifferenzierten Tumoren ($p < 0,0001$) wird von zahlreichen publizierten Daten unterstützt (Kmet et al., 2003).

In der Übersichtsarbeit von Kmet et al. fanden sich bei der gemeinsamen Betrachtung aller Studien im Stadium I/II zu 39% und im Stadium III/IV zu 55% *p53*-positive Tumore (Kmet et al., 2003). Hier spielte der eingesetzte Antikörper eine beachtliche Rolle. *DO-7* und *PAb-1801* standen mit höheren Detektionsraten im Zusammenhang, als beispielsweise der *CM-1* Antikörper. Unabhängig vom verwendeten Antikörper korrelierte jedoch eine *p53*-Positivität stets mit einem fortgeschrittenen Stadium. Auch bei der Bestimmung des *p53*-Proteins in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad des Tumors variierten die Ergebnisse je nach Antikörperzusatz. Insgesamt waren die Grad 3 Tumore jedoch häufiger *p53*-positiv als die Tumore vom Grad 1 (Kmet et al., 2003).

Eine hohe Vergleichbarkeit der Ergebnisse bezüglich FIGO-Stadium und Malignitätsgrad ist nur dann zu erreichen, wenn bei der histologischen und klinischen Einteilung der Tumore einheitliche Klassifizierungsschemata angewandt werden. In dieser Studie wurde die allgemein anerkannte Einteilung der Ovarialkarzinome nach dem Malignitätsgrad nach *Silverberg* vorgenommen (Silverberg, 1989, 2000). In einigen anderen Studien waren die Kriterien zur Klassifizierung der Tumore nach dem Malignitätsgrad nicht ersichtlich.

Bei der Betrachtung des histologischen Phänotyps fand sich eine nukleäre *p53*-Anreicherung im vorliegenden Patientenkollektiv häufiger in serösen, als in allen anderen histologischen Subtypen. Im Vergleich zu den klarzelligen ($p = 0,0005$) und muzinösen ($p = 0,0053$) Tumoren erwies sich dieser Unterschied als statistisch signifikant.

Auch dies passt zur existierenden Literatur. 57 der bereits publizierten Studien untersuchten die Assoziation zwischen der nukleären *p53*-Anreicherung und dem Histotyp. Seröse Tumore zeigten insgesamt zu 56% *p53*-Positivitäten, während die Positivität unter muzinösen, klarzelligen und endometroiden Tumoren geringer war. Die Verwendung verschiedener Antikörper bewirkte hier keinen nennenswerten Unterschied (Kmet et al., 2003).

In dem in dieser Studie untersuchten Patientenkollektiv ging ein positiver Befund der *p53*-Immunhistochemie mit einer signifikant schlechteren Patientenprognose einher ($p < 0,0001$).

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit mehreren Studien, die ebenfalls eine Assoziation zwischen der *p53*-Positivität und einem kürzeren Patientenüberleben beschreiben (Anreder et al., 1999; Anttila et al., 1999; Dong et al., 1997; Levesque et al., 1995). Allerdings zeigen andere Studien, meist mit geringerer Fallzahl, keine solche Assoziation (Darai et al., 1998; Reles et al., 1996; Wen et al., 1999). Die Fallzahlen der in der Literatur zu findenden Studien variieren zwischen 12 und 496 - mehr als 50% der Studien beinhalten jedoch weniger als 50 Tumore, nur 20% können ein Kollektiv mit mehr als 100 Patientinnen aufweisen (Kmet et al., 2003).

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Studien machen deutlich, wie groß der Einfluss unterschiedlicher Studiendesigns, Fallzahlen und Untersuchungsmethoden, wie beispielsweise der Antikörperzusatz, auf das *p53*-IHC-Resultat sein kann. Einen weiteren variablen Faktor stellten die in den einzelnen Studien unterschiedlich definierten Positivitätskriterien dar. Fehlbewertungen einer „normalen“ *p53*-Anreicherung als „abnormale“ Anreicherung, oder andersherum, führen somit zu einer Überschätzung beziehungsweise Unterschätzung der eigentlichen Prävalenz von *p53*-Alterationen. Studien, die als Kriterium für eine „*p53*-Positivität“ mindestens 10% der Tumorzellen mit detektierbarer *p53*-Immunreaktivität angenommen haben, zeigten in der Literatur eine *p53*-Positivität von etwa 48% (Kmet et al., 2003). Im Gegensatz dazu ergaben sich deutlich höhere Positivitäten (bis 60%) in Studien, die eine Gewebeprobe als „*p53*-positiv“ definierten, wenn überhaupt nur irgendwelche positiven Zellen ($\geq 1\%$) gefunden wurden (Kmet et al., 2003). Unterschiedliche Anreicherungsmuster (schwache Färbung versus starke Färbung) können auch der Ausdruck verschiedener biologischer Prozesse sein (Hall und Lane, 1994) und sind nicht unbedingt als pathologisch zu bewerten. So ist eine starke Anfärbung zwar häufig mit Mutationen assoziiert, eine weniger ausgeprägte Färbung einiger Tumorzellen muss jedoch nicht unbedingt durch molekulare Veränderungen der *p53*-Genregion bedingt sein, sondern zeigt möglicherweise die Akkumulation von funktionstüchtigem *p53* als Reaktion auf genetische Veränderungen (Kmet et al., 2003).

Ein standardisiertes Vorgehen bei der Bewertung des *p53*-Status, gegebenenfalls unter Berücksichtigung der physiologisch bedingten *p53*-Anreicherung, ist für die direkte Vergleichbarkeit der Studienergebnisse unabdingbar. In dieser Arbeit wurden alle Immunfärbungen von einem erfahrenen Pathologen ausgewertet. Ausschließlich nukleäre Färbungen wurden als *p53*-spezifisch gewertet. Dabei wurde die Intensität der nukleären Färbung in einer 4-Schritt-Skala quantifiziert. Zudem wurde der Anteil gefärbter Tumorzellen je Gewebespot notiert (Tab. 7). Aus diesen beiden Parametern wurde ein abschließendes *p53*-IHC-Resultat erstellt.

PIK3CA

Das *p53*-Gen ist ein Schlüsselen zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität (Lane, 1992). Die Entstehung von Genamplifikationen wird im Zusammenhang mit einem Verlust der normalen *p53*-Funktion gesehen (Livingstone et al., 1992; Yin et al., 1992). Amplifikationen des *PIK3CA*-Gens, welches für die katalytische Untereinheit von *PI3-Kinasen* kodiert, werden in vielen verschiedenen Tumorentitäten beschrieben (Nakayama et al., 2007). In Plattenepithel-Karzinomen der Kopf- und Hals-Region wird das Vorkommen von *PIK3CA*-Amplifikationen bereits als unabhängiger Prognosefaktor beschrieben, von dem auf Tumoraggressivität und Langzeitüberleben geschlossen werden kann (Singh et al., 2002b). Die Aktivierung der *PI3-Kinase* hat unter physiologischen Bedingungen eine Vielzahl an Reaktionen zur Folge, die Angiogenese (Zhang et al., 2003), Zellwachstum, Proliferation und das Zellüberleben beeinflussen (Vivanco und Sawyers, 2002). Durch die hohe Anzahl an genetischen Veränderungen der *PIK3CA*-Region in Ovarialkarzinomen und aufgrund des onkogenen Potentials der *PI3-Kinasen* wird vermutet, dass die Aktivierung der *PI3-Kinasen* durch Amplifikationen oder somatische Punktmutationen der *PIK3CA*-Genregion auch an der Tumorentstehung im Ovar beteiligt ist (Andrew, 1999; Shayesteh et al., 1999; Vivanco und Sawyers, 2002).

In dieser Arbeit wurde im vorliegenden Kollektiv eine mittels FISH-Technik analysierte *PIK3CA*-Amplifikationshäufigkeit von 7,6% (22/288) gefunden. In weiteren 7,6% (22/288) konnten geringgradige "Zugewinne" der *PIK3CA*-Region gezeigt werden. Als Amplifikation wurde das Vorliegen von mindestens doppelt so vielen *PIK3CA*-Signalen wie *Zentromer 3*-Signalen ($\text{Ratio } PIK3CA/Zen3 \geq 2,0$) definiert. Gewebeproben mit einem *PIK3CA/Zentromer 3*-Verhältnis zwischen 1 und 2 wurden als "Zugewinn" bezeichnet. Alle anderen Gewebeproben wurden als normal definiert.

In der Literatur finden sich verschiedene Studien, in denen die Häufigkeit von *PIK3CA*-Amplifikationen in Ovarialtumoren untersucht wurden (Abubaker et al., 2009; Campbell et al., 2004; Kolasa et al., 2009; Mayr et al., 2006; Nakayama et al., 2006; Nakayama et al., 2007; Shayesteh et al., 1999; Willner et al., 2007; Woenckhaus et al., 2007; Zhang et al., 2007). Die *PIK3CA*-Amplifikationsrate lag in diesen Studien zwischen 6,2% und 58%. Nach Angaben von Shayesteh et al. finden sich insgesamt in bis zu 40% aller Tumoren, inklusive der Ovarialtumoren, Zugewinne der 3q26-Genregion (Iwabuchi et al., 1995; Shayesteh et al., 1999; Suzuki et al., 2000). Einen

Überblick über die wichtigsten Studien gibt Tabelle 12 (Abubaker et al., 2009; Campbell et al., 2004; Kolasa et al., 2009; Nakayama et al., 2006; Nakayama et al., 2007; Shayesteh et al., 1999; Willner et al., 2007; Woenckhaus et al., 2007).

Ähnliche Ergebnisse, jedoch bei geringerer Fallzahl als in dieser Arbeit, finden sich in einer Studie von Woenckhaus et al.. In 74 Ovarialkarzinomen (39 seröse, 8 muzinöse, 6 endometroide, 9 klarzellige, 12 undifferenzierte Tumoren) wurde mittels PCR- und FISH-Analyse nach chromosomalen Veränderungen des 3q26.3-Genlocus, der *PIK3CA* mit einschließt, gesucht und die Befunde in Bezug zu klinischen Verlaufsdaten gesetzt. In der FISH-Untersuchung lagen in 78% (25/32) 3q26.3-"Zugewinne" (9,4% (3/32) high-level, 68,8% (22/32) moderat) und in 6,2% (2/32) 3q26.3-Amplifikationen (beide moderat) vor. Die "Zugewinne" wurden ermittelt, indem die Anzahl der YAC-Signale, die den *PIK3CA*-Genlocus mit einschließen, durch die Anzahl der Zellen pro Gewebeprobe dividiert wurde (Ratio: 3q26.3-YAC-Signale/Gesamtzellzahl >2; 2-4 moderat, >4 high-level). Amplifikationen wurden ermittelt, indem die Anzahl der YAC-Signale durch die Anzahl der *D3Z1*-Zentromer-Signale dividiert wurde (Ratio: 3q26.3-YAC/*D3Z1*-Zentromer >2; 2-3 moderat, >3 high-level). Mittels PCR wurden in 22% (11/50) der invasiven epithelialen Ovarialtumore *PIK3CA*-Amplifikationen gefunden (6% (3/50) high-level, 16%, (8/50) moderat). Als Amplifikation wurde in der PCR-Untersuchung das Verhältnis der *PIK3CA*-Genregion zur *TRAT1*-Genregion auf Chromosom 3q13 bewertet (Ratio: *PIK3CA/TRAT1* auf Chr. 3q13 >2; 2-3 moderat, >3 high-level) (Woenckhaus et al., 2007).

Abubaker et al. ermittelten mittels FISH-Analyse in 156 epithelialen Ovarialtumoren (125 seröse, 22 endometroide, 4 klarzellige, 5 undifferenzierte) eine wesentlich höhere *PIK3CA*-Amplifikationshäufigkeit von 35,5%. Als Amplifikation war, wie in dieser Arbeit, das Vorliegen der doppelten Anzahl an *PIK3CA*-Signalen wie Zentromer 3-Signalen definiert (Ratio: *PIK3CA/Zentromer* 3, 1-2 Zugewinn, >2 Amplifikation). In 3,9% (6/153) lagen *PIK3CA*-Mutationen vor (Abubaker et al., 2009).

Weitere Publikationen zur Häufigkeit von *PIK3CA*-Amplifikationen in Ovarialkarzinomen kommen vermutlich durch Abweichungen in Methodik und Auswertung zu anderen Ergebnissen.

Tabelle 12: PIK3CA-Amplifikationen und Mutationen in ausgewählten Studien; Übersicht über PIK3CA-Veränderungen in malignen Ovarialtumoren mit Angaben zur Assoziation zu Tumorphänotyp und Prognose

Studie	n	Tumortyp/ Meth	Amp	n	Tumortyp/ Meth	Mut	Assoziation
<i>Abubaker et al. 2009</i>	156	EOC/FISH	54/152 35,5%	156	EOC/PCR	6/153 3,9%	nicht signifikant assoziiert mit klinisch-pathologischen Parametern
<i>Kolasa et al. 2009</i>	117	EOC/PCR	28/117 24%	117	EOC/SSCP	5/117 4,3%	Mut nur in end und klar Amp und Mut nicht gleichzeitig Amp häufiger in Tumoren mit TP53 Mutationen und hoher AKT Aktivität Amp nicht mit Histotyp, Alter und FIGO assoziiert tendenziell häufiger in entdifferenzierten Tumoren Amp stärkerer negativer Prognosefaktor als Resttumorgroße nach OP: seltener komplette Remission, kürzeres Langzeitüberleben Taxan- und Platinumresistenz
<i>Nakayama et al. 2007</i>	98	ser HG EOC/FISH	8/74 10,8%	124	98 HG/FISH 26 LG/FISH	8/74 10,8% 0/25 0%	Amp v.a. in HG-Tumoren mit großer genetischer Instabilität selten in LG-Tumoren (duale Pathogenese)
<i>Nakayama et al. 2006</i>	124	74 ser HG EOC/FISH 37 ser BT/FISH	1/74 13,3% 0/37	65	44 ser. HG Tumoren/PCR 21 ser BT/PCR	1/44 2,3% 1/21 4,8%	
<i>Campbell et al. 2004</i>	182	EOC/PCR	41/167 24,6%	167	EOC/PCR	11/167 6,6%	Mut v.a. in end und klar Amp in allen Histotypen gleichhäufig Amp reziprok mit Mut assoziiert Amp und Mut nicht in BT und benignen Tumoren
<i>Willner et al. 2007</i>	116	94 ser EOC/PCR 22 end/klar EOC/PCR Insgesamt	19/94 20% 0/22 19/116 16,4%	89	12 klar/PCR 26 end/PCR 51 ser/PCR	3/12 25% 3/26 12% 0/51	Mut nur in end und klar Mut alle in Grad 3 Tumoren Mut häufiger in Tumoren mit Wildtyp-p53 Amp nur in ser Tumoren keine Amp und Mut gleichzeitig Amp tendentiell häufiger in Wildtyp-p53 end und klar besseres Überleben
<i>Woenckhaus et al. 2007</i>	74	EOC/PCR EOC/FISH	11/50 22% 25/32 Gain 2/32 Amp 6,2%				Amp mit schlechter Prognose assoziiert Amp eher früher Ereignis in entdifferenzierten Karzinomen (PCR) Amp nicht signifikant mit Stadium, Alter, Malignitätsgrad, oder Histotyp assoziiert (FISH) keine Assoziation zwischen p110α und AKT
<i>Shayesteh et al. 1999</i>	12	EOC/FISH	7/12 58%				Amp assoziiert mit p110α Expression LY294002 (PI3Kinase Inhibitor) hemmt Zellproliferation und steigert Apoptose <i>in vitro</i>

n = Anzahl der Ovarialtumore, Amp = Amplifikation, Mut = Mutation, Meth = Methode, EOC = Ovarialkarzinome, CCC = clear cell carcinoma, klarzelliges Ovarialkarzinom, BT = Borderline-Tumore, HG = high-grade, alle FIGO III/IV, LG = low-grade, ser = seröse, end = endometroid, klar = klarzellig, PCR = Polymerase Chain Reaction, FISH = Fluoreszenz in situ Hybridisierung, SSCP = Single Strand Conformation Polymorphism

In einer Studie nach *Shayesteh* et al. galten in der FISH-Analyse diejenigen Tumore als *PIK3CA*-positiv, dessen 3q26-Region im Vergleich zur 3p25-Region in der Anzahl ihrer Genkopien erhöht vorlag. Demnach zeigten 3 von 12 (25%) ovariellen Primärtumoren im Vergleich zur 3p25-Genregion eine erhöhte Anzahl der *PIK3CA*-Region. 4 weitere Tumore zeigten eine vermehrte Anzahl sowohl der 3q26, als auch der 3p25 Region. Somit lagen insgesamt in 58% (7/12) *PIK3CA*-Amplifikationen vor (*Shayesteh* et al., 1999).

Campbell et al. fanden mittels PCR-Technik in 24,6% (41/167) der untersuchten Ovarialkarzinome (88 seröse, 35 endometroide, 5 klarzellige, 24 muzinöse, 14 undifferenzierte) *PIK3CA*-Amplifikationen. Als Amplifikation wurde eine mehr als 7-fach erhöhte Anzahl der *PIK3CA*-Signale gegenüber dem Durchschnittswert der Referenzgene *KRAS* und *BARD1* definiert. In keinem der untersuchten 7 Borderline- oder der 8 benignen Tumore war eine Amplifikation zu finden. In 6,6% (11/167) der epithelialen Ovarialtumore waren somatische Mutationen des *PIK3CA*-Gens zu finden. Zusammengefasst lagen in 30,5% aller Ovarialtumore entweder eine Amplifikation oder Genmutation vor (*Campbell* et al., 2004).

In einer Studie von *Willner* et al. ermittelte man anhand von PCR-Untersuchungen in 20% (19/94) der serösen Ovarialkarzinome *PIK3CA*-Amplifikationen. In keinem der 22 endometroiden und klarzelligen Tumoren wurde eine Amplifikation gefunden. Alle histologischen Tumortypen zusammengefasst lagen in 16,4% der Ovarialkarzinome *PIK3CA*-Amplifikationen vor. Als Amplifikation war definiert, wenn der *PIK3CA*-Wert mindestens 2-fach höher als der Durchschnittswert der Loci *KRAS2* und *BARD1* war. Mutationen fanden sich nur in endometroiden und klarzelligen und in keinem der serösen Tumoren (*Willner* et al., 2007).

Nakayama et al. fanden in 8 von 60 serösen "high-grade" (hoher Malignitätsgrad, FIGO-Stadium III/IV) Tumoren mittels FISH-Analyse eine Amplifikationsrate von 13,3%. Als Amplifikation wurde ein Verhältnis der 3q26.32-Genregion gegenüber der 3q13.11-Genregion von mehr als 1,5 gewertet, als hohe Amplifikationsrate wurde ein Verhältnis 3q26.32/3q13.11 von mehr als 3 gewertet (*Nakayama* et al., 2006).

Kolasa et al. fanden mittels PCR in 117 Ovarialkarzinomen (84 seröse, 15 endometroide, 7 klarzellige, 7 undifferenzierte und 5 andere nicht weiter klassifizierte Subtypen) in 24% *PIK3CA*-Amplifikationen. Als Amplifikation war das Verhältnis an

PIK3CA-Genkopien in Tumorgewebe im Vergleich zur Anzahl an *PIK3CA*-Genkopien im angrenzenden Normalgewebe definiert. Ein Verhältnis *PIK3CA*-Tumorgewebe/*PIK3CA*-Normalgewebe von 1 wurde dementsprechend als normal gewertet, eine Anzahl von mindestens 3 Kopien im Tumorgewebe im Vergleich zu den im Normalgewebe vorliegenden 2 Genkopien wurde als Amplifikation gewertet (Ratio: *PIK3CA*-Kopien im Tumor/*PIK3CA*-Kopien im Normalgewebe >1,5). In 4,3% (5/117) lagen *PIK3CA*-Mutationen vor (Kolasa et al., 2009).

Interessanterweise gibt es relativ wenige übereinstimmende Ergebnisse in Studien, die sich mit der Häufigkeit von *PIK3CA*-Amplifikationen in Ovarialtumoren beschäftigten. Diese Diskrepanzen ergeben sich zu einem großen Teil vermutlich dadurch, dass die Methoden zur *PIK3CA*-Analyse (PCR versus FISH) sowie die Auswertungskriterien bezüglich der Anzahl der Genamplifikationen in den unterschiedlichen Studien stark differierten. Außerdem waren die untersuchten Patientengruppen bezüglich der Tumorphistologie und des Untersuchungsmaterials nicht einheitlich. Eine direkte Vergleichbarkeit ist somit aufgrund der anzunehmenden distinktierten Pathogenese der einzelnen histologischen Subtypen nicht möglich.

Die FISH-Analyse stellt eine der sensitivsten und spezifischsten Methoden zum Nachweis von Genamplifikationen besonders für Proben mit geringer Anzahl an Genkopien dar (Cox et al., 1998; Pauletti et al., 1996; Swiger und Tucker, 1996). Im Gegensatz dazu zeigt sich die PCR-Analyse häufig störanfälliger (Nakayama et al., 2006).

Bezüglich des FIGO-Stadiums und des Malignitätsgrads war in dem vorliegenden Kollektiv keine Assoziation zu den *PIK3CA*-Amplifikationen ersichtlich.

Dies entspricht den Ergebnissen anderer Studien, in denen auch keine Assoziation der *PIK3CA*-Amplifikationen zu klinischpathologischen Parametern gefunden wurde (Abubaker et al., 2009; Kolasa et al., 2009; Woenckhaus et al., 2007).

In den von Woenckhaus et al. untersuchten 50 Ovarialkarzinomen fanden sich in Tumoren mit niedrigem FIGO-Stadium tendenziell häufiger *PIK3CA*-Amplifikationen, als in Tumoren mit fortgeschrittenem Stadium (FIGO I 43%, II 17%, III 13%, IV keine) (Woenckhaus et al., 2007).

Liang et al. untersuchten die *PIK3CA*-mRNA-Level in Bezug auf das FIGO-Stadium und fanden ebenfalls keinen weiteren Anstieg in fortgeschrittenen FIGO-Stadien (Liang et al., 2009).

Im Bezug auf den Malignitätsgrad zeigten bisher durchgeführte Studien tendenziell häufiger *PIK3CA*-Amplifikationen in wenig differenzierten Tumoren, als in gut differenzierten (Kolasa et al., 2009; Woenckhaus et al., 2007).

Campbell et al. fanden in keinem der untersuchten 7 Borderline- und 8 benignen Tumore *PIK3CA*-Amplifikationen (Campbell et al., 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass *PIK3CA*-Amplifikationen eher ein frühes Ereignis in der Tumorengese von entdifferenzierten Ovarialkarzinomen darstellen.

In dieser Arbeit wurden *PIK3CA*-Amplifikationen tendenziell häufiger in endometroiden (12%) als in serösen (6,8%) Tumoren gefunden. Allerdings war die Gesamtzahl aller *PIK3CA*-Veränderungen (Amplifikationen und "Zugewinne") in beiden Tumortypen nahezu identisch (endometroid: 18%; serös: 18,3%; $p=0,2581$). *PIK3CA*-Veränderungen (Amplifikationen und "Zugewinne") fanden sich zudem tendenziell häufiger in serösen (6,8% Amplifikationen, 11,5% Zugewinne) als in muzinösen Tumoren ($p=0,0509$). Die muzinösen Tumore zeigten ausschließlich *PIK3CA*- "Zugewinne" (3,3%), wohingegen in keinem der 30 Tumore eine Amplifikation zu finden war.

In der Literatur finden sich bei generell kleineren Fallzahlen hierzu keine eindeutigen Angaben. In einem Teil der Studien wurden *PIK3CA*-Amplifikation in allen histologischen Subtypen etwa gleichhäufig beobachtet (Abubaker et al., 2009; Campbell et al., 2004; Kolasa et al., 2009; Woenckhaus et al., 2007). Andere Studien beobachteten *PIK3CA*-Amplifikationen vor allem in serösen Ovarialkarzinomen (Mayr et al., 2006; Willner et al., 2007), wohingegen *PIK3CA*-Mutationen charakteristischer Weise in endometroiden und klarzelligen Tumoren zu finden waren (Campbell et al., 2004; Kolasa et al., 2009; Willner et al., 2007). In den untersuchten Tumoren war das Auftreten von Mutationen reziprok mit dem Vorkommen von *PIK3CA*-Amplifikationen assoziiert (Campbell et al., 2004; Kolasa et al., 2009; Willner et al., 2007). Aufgrund dessen wird vermutet, dass *PIK3CA* in serösen Tumoren über Amplifikationen und in endometroiden und klarzelligen Tumoren über somatische Mutationen aktiviert wird.

Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass den einzelnen histologischen Subtypen eine unterschiedliche Pathogenese zugrunde liegt (Willner et al., 2007).

Das heterogene histologische Bild der Ovarialtumore mit seinen vermutlich unterschiedlichen pathogenetischen Entstehungswegen stellt ein weiteres Problem für die Vergleichbarkeit der in der Literatur zu findenden *PIK3CA*-Amplifikationshäufigkeiten dar. In der Mehrzahl der Fälle wurde die Häufigkeit der *PIK3CA*-Amplifikationen in Tumorkollektiven mit unterschiedlichen histologischen Subtypen bestimmt und keine Angaben zu den Amplifikationshäufigkeiten innerhalb der einzelnen Subgruppen gemacht.

In einer Studie von *Nakayama* et al. wurden, um ein möglichst einheitliches Untersuchungsgut zu haben, nur seröse Ovarialtumore untersucht. Die am häufigsten amplifizierten Genregionen seröser Ovarialkarzinome konnten auf diese Weise identifiziert werden. Unter den häufigsten Amplifikationen fand man sowohl Genregionen mit bereits bekannten potentiellen Onkogenen sowie weitere Genregionen, die bis jetzt noch nicht beschrieben wurden. Zu den am häufigsten amplifizierten Regionen gehörten die Gene *CyclinE1*, *AKT*, *Notch3*, *PIK3CA* und *HBXAP/Rsf-1*. *PIK3CA*-Amplifikationen wurden in 9,1% der 33 serösen "high-grade" (FIGO-Stadium III/IV) Ovarialkarzinome gefunden. Eine Amplifikation wurde registriert, wenn mehr als 3,5 Genkopien in drei aufeinander folgenden SNP-Analysen zu verzeichnen waren. In "low-grade" Tumoren (seröse Borderline-Tumore, invasive Tumore im FIGO-Stadium I/II) war die Anzahl und Höhe der Amplifikationen deutlich geringer. *PIK3CA*-Amplifikationen wurden zudem mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in 124 (98 "high-grade", 26 "low-grade") weiteren serösen Ovarialtumoren untersucht. Die *PIK3CA*-Amplifikationsrate lag bei den "high-grade" Tumoren bei 10,8%, (8/74) unter den "low-grade" Tumoren fanden sich keine "Zugewinne". Ein Verhältnis der *PIK3CA*-Genregion gegenüber der Chromosomenregion 2q11.2 von mehr als 2 wurde als "Zugewinn" bezeichnet, als Amplifikation wurde ein Verhältnis von *PIK3CA*/Chromosom 2q11.2 von mehr als 3 definiert (Nakayama et al., 2007).

In zukünftigen Studien an Ovarialkarzinomen wäre es sinnvoll bei einem heterogenen Patientengut die einzelnen Tumore unter Berücksichtigung des histologischen Phänotyps auf Genveränderungen zu untersuchen, beispielsweise nur entdifferenzierte seröse Ovarialkarzinome ähnlich der Studie nach *Nakayama* et al. (Nakayama et al.,

2007). Nur so kann man in Zukunft dem heterogenen Bild der Ovarialkarzinome in diagnostischer und therapeutischer Hinsicht gerecht werden.

Bei der Betrachtung der Überlebenszeiten konnte in dieser Arbeit für das Auftreten von *PIK3CA*-Amplifikationen kein eindeutiger Einfluss auf die Patientenprognose beobachtet werden. Tendenziell zeigte sich eine eher bessere Überlebenszeit bei Patientinnen, deren Tumor eine *PIK3CA*-Amplifikation aufwies. Dieses Ergebnis war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,2116$).

In einigen Studien an Ovarialkarzinomen zeigten *PIK3CA*-Amplifikationen keinen Einfluss auf das Patientenüberleben (Cheng et al., 2004; Diebold, 2001; Hauptmann et al., 2002; Quaye et al., 2008). Dies steht im Kontrast zu einigen anderen Studien, die in *PIK3CA*-Amplifikationen einen aussagekräftigen Prognosefaktor sehen (Kolasa et al., 2009; Woenckhaus et al., 2007).

In einer Studien nach Woenckhaus et al. waren *PIK3CA*-Amplifikationen mit einem schlechteren Patientenüberleben assoziiert, wobei die Prognoserelevanz von *PIK3CA* den gängigen Prognosefaktoren, wie beispielsweise FIGO-Stadium und *Ki-67 labeling Index* ebenbürtig, wenn nicht sogar überlegen erschien (Woenckhaus et al., 2007).

Auch nach Kolasa et al. ist das Auftreten von *PIK3CA*-Amplifikationen in Ovarialkarzinomen ebenfalls als ein unabhängiger Prognosefaktor anzusehen. In dieser Studie hatten *PIK3CA*-Amplifikationen einen stärkeren negativen Einfluss auf die Patientenprognose, als die Größe des nach der Operation verbleibenden Resttumors, welche einer der stärksten Prognosefaktoren ist. Zudem war das Auftreten von *PIK3CA*-Amplifikationen in dieser Studie mit einer Resistenz gegenüber platinhaltigen Chemotherapien assoziiert (Kolasa et al., 2009).

Eine schlechte Prognose kann durch eine reduzierte Ansprechrate auf Chemotherapien verursacht sein. Viele Therapieansätze basieren darauf, Tumorzellen über chemotherapeutisch oder strahleninduzierte Doppelstrangbrüche in die Apoptose zu schicken. Ob eine Tumorzelle auf ein chemotherapeutisches Agens anspricht oder nicht, ist vermutlich zum Teil von der Fähigkeit abhängig, in den Zustand der Apoptose überzugehen (Xu, 2008).

An der Apoptose beteiligte Gene wie *p53* liegen im Ovarialkarzinom häufig dysreguliert vor (Fraser et al., 2003). Einige Studien konnten nachweisen, dass Tumoren mit *p53*-Mutationen häufiger ein schlechtes Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapien aufweisen (El-Deiry, 2003; Fraser et al., 2003). Vermutlich wird eine Resistenz gegenüber bestimmten Chemotherapien auch noch durch andere genetische Veränderungen verursacht (Pinto et al., 2005). So könnte auch die Aktivierung des *PI3K/AKT*-Signalweges durch Mutationen oder Amplifikationen, die zu einer Hemmung der Apoptose führen, in einigen Tumorzellen für das bessere Überleben unter Chemotherapie verantwortlich sein (Lee et al., 2005).

Resistenzen gegenüber taxan- und platinhaltigen Chemotherapien wurden in Ovarialkarzinomen mit *PIK3CA*-Amplifikationen beobachtet (Kolasa et al., 2009). Einige Studien lassen hoffen, dass durch eine Kombination aus der Standardtherapie mit *PI3-Kinase*-Inhibitoren die Prognose einiger Patientinnen mit Ovarialkarzinomen in Zukunft verbessert werden könnte. Die Behandlung von ovariellen Zellkulturen mit *PI3-Kinase*-Inhibitoren, wie beispielsweise LY294002, zeigen *in vitro* einen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation (Zhang et al., 2009) und gehen mit einer gesteigerten Apoptoserate einher (Shayesteh et al., 1999). Substanzen wie GDC-0941 (Folkes et al., 2008), NVP-BE235 (Maira et al., 2008; Schnell et al., 2008), PI-103 (Prevo et al., 2008) und SF1126, ein LY294002 Prodrug (Garlich et al., 2008), die gegen die *PI3-Kinase* gerichtet sind befinden sich derzeit in klinischer Erprobung. Zukünftige klinische Studien sollten bei der Bewertung der Wirksamkeit dieser Substanzen sowohl den *PIK3CA*-Status, als auch den histologischen Subtyp dokumentieren und die Auswirkungen auf das Langzeitüberleben ermitteln.

Auf welche Weise der *PI3K/AKT*-Signalweg in Tumoren aktiviert wird und welche Rolle Amplifikationen der *PIK3CA*-Genregion hierbei spielen ist weiter unklar. Bei Zervixkarzinomen, in denen *PIK3CA* ebenfalls eine häufig amplifizierte Genregion darstellt, geht man davon aus, dass eine gesteigerte *PI3-Kinasen*-Aktivität im Zusammenhang mit dem Auftreten von *PIK3CA*-Amplifikationen steht (Ma et al., 2000). Einige Studien beschreiben diesen Zusammenhang auch in Ovarialkarzinomen (Kolasa et al., 2009; Shayesteh et al., 1999). In der Studie von Woenckhaus et al. konnte zwar eine Korrelation zwischen der *p110α*-Expression und einem Zugewinn der 3q26.3-Genregion nachgewiesen werden, zwischen *p110α* und *AKT* war ein direkter Zusammenhang jedoch nicht ersichtlich. Ein kausaler Zusammenhang zwischen

"Zugewinnen" der *PIK3CA*-Genregion, der *PI3-Kinasen*-Aktivierung und der *AKT*-Phosphorylierung konnte durch diese Daten nicht gestützt werden. Demnach ist es denkbar, dass möglicherweise auch noch andere Aktivierungswege eine Rolle spielen (Woenckhaus et al., 2007).

Die *PI3-Kinasen*-Aktivität scheint außerdem durch die individuelle Zellumgebung beeinflusst zu sein. Bei der immer wiederkehrenden Ovulation, die mit einer gesteigerten Entartungsrate in Zusammenhang steht (Fathalla, 1971), werden die Zellen zum Teil aus ihrem Zellverband gerissen und liegen getrennt von ihrer extrazellulären Matrix vor. In Keratinozyten außerhalb des Zellverbands wurden reduzierte *p53*-Level mit konsekutiv erhöhter genetischer Instabilität beobachtet. Dies geschieht möglicherweise auch in ovariellen Zellen während der Ovulation. Normalerweise würde man vermuten, dass diese Zellen daraufhin ihre *PI3-Kinasen*-Aktivität verlieren und absterben. *PIK3CA*-Amplifikationen könnten jedoch ausschlaggebend dafür sein, dass dies nicht geschieht und die Zellen überleben und auf diesem Wege einen malignen Phänotyp entwickeln (Shayesteh et al., 1999).

Weitere standardisierte Untersuchungen an Kollektiven mit ausreichend großen Fallzahlen sowie eine Metaanalyse der bereits vollzogenen Studien sind notwendig, um zu ermitteln, wodurch *PIK3CA*-Amplifikationen in Ovarialkarzinomen entstehen, ob sie mit einer Aktivierung der *PI3-Kinasen* einhergehen, auf welche Weise sie das Tumorstadium fördern und in welchem Zusammenhang sie mit Tumorphänotyp und Prognose stehen.

Assoziation zwischen dem p53-Status und der PIK3CA-Amplifikation

Nach den Ergebnissen unserer Studie besteht vermutlich kein Zusammenhang zwischen einer *PIK3CA*-Amplifikation und einer genetischen Instabilität bedingt durch *p53*-Mutationen. *PIK3CA*-Amplifikationen fanden sich praktisch gleichhäufig in *p53*-negativen (11/132; 8,3%) sowie *p53*-positiven Tumoren (10/119; 8,4%, $p=0,8118$).

In der Literatur finden sich wenige und zum Teil widersprüchliche Studien mit allgemein geringen Fallzahlen, die sich mit dem Einfluss von *p53*-Mutationen auf die Entstehung von *PIK3CA*-Amplifikationen in Ovarialtumoren befassen.

In einer Studie von *Kolasa et al.* wurden *PIK3CA*-Amplifikationen häufiger in Ovarialkarzinomen gefunden, in denen gleichzeitig *p53*-Mutationen vorlagen (26/87 (30%) mit *p53*-Mutationen; 2/28 (7%) mit Wildtyp-*p53*) (*Kolasa et al.*, 2009).

In anderen Studien kam man zu gegenteiligen Ergebnissen. Die Untersuchung von *Willner et al.* an serösen Ovarialkarzinomen zeigte einen leichten Trend zu vermehrten *PIK3CA*-Amplifikationen in Tumoren mit Wildtyp-*p53* (12/42 (28%)) im Vergleich zu Tumoren mit mutiertem *p53* (7/52 (3%), $p=0,08$) (*Willner et al.*, 2007).

Auf welche Weise Amplifikationen entstehen, ist noch nicht vollends geklärt. In *p53*-defizienten Zellen scheint die Entstehung von Amplifikationen begünstigt zu sein. Amplifikationen finden sich jedoch auch in Zellen mit Wildtyp-*p53* (*Lengauer et al.*, 1998).

Vielen Genen wird heute ein zur genetischen Instabilität beisteuernder Effekt zugeschrieben, wenn sie ausgeschaltet, supprimiert oder überexprimiert vorliegen (*Albertson*, 2006). Von besonderer Bedeutung sind Gendefekte innerhalb des Zellzykluskontrollsystems. Bei funktionellen Defiziten werden bei jeder Zellteilung die genetischen Veränderungen zusätzlich zum bestehenden Defekt in die nächste Zellgeneration übertragen und die genetische Information wird durch Mutationsanhäufung zunehmend instabil (*Xu*, 2008). Verschiedene Studien demonstrieren die Auswirkungen einer *p53*-Inaktivierung auf die genetische Stabilität einer Zelle. Untersuchungen an hämatopoetischen Zellen zeigten, dass *p53*-defiziente Mäuse als Reaktion auf ionisierende Strahlung deutlich mehr DNA-Doppelstrangbrüche aufwiesen, als die *p53*-normalen Kontrolltiere (*Lee et al.*, 1994). An Fibroblasten von

Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom, einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung mit Keimbahnmutationen des *p53*-Gens, konnte demonstriert werden, dass die Zellen nach mehreren Zellkulturpassagen aneuploid wurden (Bischoff et al., 1990). Auch an Fibroblasten von homozygoten *p53*-knockout Mäusen führten die Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen (Harvey et al., 1993). Der Zusammenhang zwischen inaktiviertem *p53* und der Entstehung von Genamplifikationen wurde erstmalig anhand von zwei Studien aus den 1990er Jahren beobachtet (Livingstone et al., 1992; Yin et al., 1992). In diesen Studien entstanden Amplifikationen in *p53*-defizienten Zellen infolge einer DNA-Synthesestörung und betrafen die Genbereiche, dessen Genprodukte im Versuch gehemmt oder blockiert wurden. Genetische Amplifikationen sind jedoch keinesfalls ausschließlich späte Ereignisse in genetisch bereits hochgradig instabilen Tumoren. Schon in präneoplastischen und dysplastischen Geweben sowie in benignen, dem Tumor angrenzenden Geweben findet man Zellen mit Genamplifikationen (Albertson, 2006).

Albertson et al. beobachteten in murinen Tumoren eine vermehrte Amplifikationsentstehung im Zusammenhang mit funktionellen Defiziten des DNA-Reparatursystems. Lagen Defekte innerhalb der "Rekombination ohne Homologie" (Non Homologous End Joining; NHEJ) in Kombination mit einer *p53*-Inaktivität vor, erkrankten die insuffizienten Mäuse vermehrt an pro-B-Zell-Lymphomen und wiesen Amplifikationen der *IgH*- und der *MYC*-Region auf (Albertson, 2006).

Aufgrund der genannten Befunde, hätte eine vermehrte Häufigkeit von *PIK3CA*-Amplifikationen bei *p53*-alterierten Tumoren erwartet werden können. Genaue Untersuchungen zur Amplifikationsbegünstigung, unter anderem durch *p53*, fehlen jedoch. Deswegen kann bislang ausschließlich gemutmaßt werden, dass bestimmte genetische Defekte zur vermehrten Amplifikationsanfälligkeit führen. Dies betrifft nach dem heutigen Kenntnisstand jedoch am wahrscheinlichsten die Gene, die an der Mitose, der DNA-Replikation, der DNA-Reparatur, an den Zellzyklus-Kontrollpunkten, sowie am Erhalt der Telomere beteiligt sind (Albertson, 2006).

Einen interessanten und unerwarteten Befund stellt die in unserem Kollektiv signifikant bessere Prognose von *PIK3CA*-amplifizierten *p53*-positiven Tumoren im Vergleich zu nicht amplifizierten *p53*-positiven Tumoren dar. Eine eindeutige Erklärung hierfür gibt es nicht.

In Mammakarzinomen wurde in einer Studie mit 590 Patientinnen ein Zusammenhang zwischen aktiviertem *PIK3CA* und einer längeren Überlebenszeit festgestellt. Die Aktivierung erfolgte jedoch auf dem Boden von Mutationen der 3q26.3-Genregion und war nicht durch Amplifikationen bedingt (Kalinsky et al., 2009).

In der 3q26-Genregion liegen vermutlich weitere Onkogene, die ebenfalls die Tumorphysiologie beeinflussen. In einer 2007 veröffentlichten Studie von Nanjundan et al. wurde beobachtet, dass Amplifikationen der *MDS1/EVI1* und *EVI1*-Genregion, die in derselben Genregion (3q26) wie *PIK3CA* liegen, in Ovarialkarzinomen ebenfalls mit einem besseren Patientenüberleben einhergingen (Nanjundan et al., 2007).

Astanehe et al. identifizierten 2008 eine *PIK3CA*-Promotorregionen an die *p53* direkt bindet und die Transkription des nachfolgenden Gens hemmt (Astanehe et al., 2008). Dass *p53* die Transkription von *PIK3CA* negativ reguliert und somit auch Einfluss auf das *p110α*-Protein-Level hat, hatte zuvor schon eine Studiengruppe um Singh et al. an Zellen des oberen Gastrointestinaltrakts sowie an Zelllinien von Kolonkarzinomen gezeigt (Singh et al., 2002a). Bei Astanehe et al. wurden hohe *p110α*-Transkriptionsraten, *PIK3CA*-Protein-Level und *PI-Kinase*-Aktivitäten in nicht tumorösen ovariellen Epithelzellen und in ovariellen Krebszelllinien mit experimentell supprimiertem *p53* beobachtet. In Zellen, die *p53* nach Gamma-Bestrahlung oder adenoviralen Infektionen überexprimierten, waren hingegen niedrige *p110α* Protein-Level zu verzeichnen, selbst wenn *PIK3CA*-Amplifikationen vorlagen. Ein *p53*-Verlust resultiert demnach in einer gesteigerten *PIK3CA*-Transkription, unabhängig davon, ob *PIK3CA* amplifiziert vorliegt oder nicht. Der synergistische Effekt eines *p53*-Verlustes bei gleichzeitig bestehenden *PIK3CA*-Amplifikationen bewirkt möglicherweise eine erhöhte *PI3-Kinasen*-Aktivität und hat wohlmöglich auch einen Einfluss auf die Patientenprognose (Astanehe et al., 2008). Unsere Daten lassen es denkbar erscheinen, dass durch eine *PIK3CA*-Amplifikation zu einem Teil das "ungünstige prognostische Potential" einer *p53*-Inaktivierung kompensiert wird.

5 Zusammenfassung

Ovarialkarzinome entstehen auf dem Boden genetischer Veränderungen innerhalb der ovariellen Epithelzelle. Zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Ovarialkarzinomen gehören *p53*-Mutationen und *PIK3CA*-Amplifikationen. *p53* ist ein Schlüsselgen zum Erhalt der genetischen Stabilität. Die Entstehung von Genamplifikationen wird im Zusammenhang mit einem Verlust der normalen *p53*-Funktion gesehen. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob eine *p53*-vermittelte genetische Instabilität für die hohe Rate an *PIK3CA*-Amplifikationen in Ovarialkarzinomen verantwortlich ist. Zudem sollten an einem Kollektiv von über 400 Patientinnen weitere Daten zum Zusammenhang zwischen *p53*-Alterationen, *PIK3CA*-Amplifikationen, Tumorphänotyp und Patientenprognose gewonnen werden.

Für diese Untersuchung wurde aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf repräsentatives Tumormaterial von 121 Patientinnen mit malignen Ovarialtumoren herausgesucht und in einen TMA eingebracht. Zusätzlich stand ein weiterer 297 Gewebeproben von Patientinnen aus dem Kantonsspital Basel umfassender Ovarialtumor-TMA zur Verfügung. Die insgesamt 418 Ovarialtumore wurden mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit einer selbst generierten FISH-Sonde auf *PIK3CA*-Amplifikationen untersucht. Die nukleäre *p53*-Anreicherung wurde mittels Immunhistochemie bestimmt.

Eine nukleäre *p53*-Proteinanreicherung wurde in 44,3% (158/357) der Ovarialtumore detektiert und war entsprechend der existierenden Literatur signifikant mit fortgeschrittenen ($p < 0,0001$) und entdifferenzierten ($p < 0,0001$) Tumoren assoziiert. Eine immunhistochemische *p53*-Positivität ging mit einer signifikant schlechteren Patientenprognose einher ($p < 0,0001$). Auch dies entspricht den in der Literatur zu findenden Ergebnissen.

PIK3CA-Amplifikationen wurden in 7,6% (22/288) der Tumore gefunden. Weitere 7,6% (22/288) zeigten einen geringgradigen "Zugewinn" der *PIK3CA*-Genkopienanzahl. *PIK3CA*-Genveränderungen waren bei geringer Fallzahl nicht eindeutig mit dem Patientenüberleben assoziiert ($p = 0,2116$). Zu den histopathologischen Parametern bestand keine eindeutige Assoziation. In der Literatur finden sich *PIK3CA*-Amplifikationshäufigkeiten in Ovarialkarzinomen zwischen 6,2% und 58%. Bezüglich

des Zusammenhangs zwischen *PIK3CA*-Amplifikationen, Tumorphänotyp und Patientenprognose finden sich in der Literatur keine einheitlichen Angaben.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem *p53*-Status und einer *PIK3CA*-Amplifikation lag nicht vor. So fanden sich *PIK3CA*-Amplifikationen praktisch gleichhäufig in *p53*-negativen (11/132; 8,3%) und *p53*-positiven (10/119; 8,4%; $p=0,8118$) Tumoren. In bereits durchgeführten Studien wurden *PIK3CA*-Amplifikationen zum Teil häufiger in Ovarialtumoren mit *p53*-Mutationen gefunden, in anderen Studien waren *PIK3CA*-Amplifikationen mit Wildtyp-*p53* assoziiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass *p53*-Alterationen und *PIK3CA*-Amplifikationen zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Ovarialkarzinomen zählen. Die bekannten Zusammenhänge zwischen *p53*-Alterationen, Tumorphänotyp und Patientenprognose konnten reproduziert werden. Ein eindeutiger Einfluss der *PIK3CA*-Amplifikation auf die Patientenprognose sowie ein Zusammenhang mit dem Tumorphänotyp konnte nicht ermittelt werden. Der vermutete Zusammenhang zwischen einer durch *p53* bedingten genetischen Instabilität und der Entstehung von *PIK3CA*-Amplifikationen lies sich nicht bestätigen.

6 Abkürzungsverzeichnis

α-FR	Alpha Folat-Rezeptor
AKT	v-akt Murine Thymoma Viral Oncogene, Proteinkinase B
ASV 16	Avian Sarcoma Virus 16
ATM	Ataxia Teleangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Teleangiectasia Related
BARD1	BRCA1-associated Ring Domain 1
bax	Bcl2 Associated x
bcl2	b-cell CLL/lymphoma 2
BRCA	Breast Cancer Gene: BRCA1 und BRCA2
CA 125	Carbohydrate Antigen 125, Cancer Antigen 125
CAD	Carbomyl Phosphate Synthetase, Aspartate Transcarbomylase, Dihydroorotase
CDK	Cyclin dependent Kinase
Chk2	Checkpoint Kinase 2
CTNNB1	Catenin, Beta 1, Cadherin-associated Protein
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
E1B	Branched-chain Keto Acid Dehydrogenase E1
E6	Human Papillomavirus E6-associated Protein
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor, erbB1
EV11	Ecotropic Viral Integration Site-1
Fas	TNF Rezeptor Superfamily, Member 6
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
HBXAP/Rsf-1	Hepatitis B Virus X-associated Protein/Remodeling and Spacing Factor 1
HE	Hämatoxylin und Eosin
Her-2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, erbB2
IGF1	Insuline-like Growth Factor 1
IHC	Immunhistochemie
IP	intraperitoneal
Ki-67	Antigen identifiziert durch den monoklonalen Antikörper Ki-67
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
MDM2	Murine Double Minute 2
MDS1	Myelodysplastic Syndrome 1
MYC	v-myc Myelocytomatosis Viral Oncogene
Notch3	Neurogenic Locus Notch homolog 3
NOXA	Phorbol-12-myristate-13 Acetate-induced Protein 1, PMAIP1
p14^{ARF}	p14 alternate reading frame ARF, Genprodukt des CDKN2A-Genlocus
p16	Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor 2A, CDKN2A
p21^{WAF1/CIP1}	Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor 1, CDK-interacting Protein 1
p53	p53-Gen, p53-Protein

P53AIP1	p53 regulated Apoptosis-inducing Protein 1
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymerase
PCR	Polemerase Chain Reaction
PDGF	Plateled-derived Growth Factor
PDK	Pyruvatdehydrogenasen-Kinasen
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIDD	p53-induced Protein with Death Domain
PIK3CA	katalytische Untereinheit p110 α der Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat
PIP₃	Phosphatidylinositol(3,4,5)-Trisphosphat
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
RAS	Rat Sarcoma Proto-Onkogen
SCC	Squamous Cell Carcinoma-related Oncogene
SH2	Src-homology 2
SH3	Src-homology 3
SnoN	Ski-related Novel Protein N
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Src	körpereigenes Protein aus der Familie der Tyrosinkinasen
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SV40	Simian Virus 40
TERC	Telomerase RNA Component
TMA	Tissue Micro Array
TNF	Tumor Nekrose Factor
TRAT1	T-cell Receptor-associated Transmembrane Adapter 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
YAC	Yeast Artificial Chromosome
ZASC1	Kruppel-like Zinc Finger Protein
Zen3	Zentromer 3

7 Literaturverzeichnis

1. Abubaker J, Bavi P, Al-Haqawi W, Jehan Z, Munkarah A, Uddin S, Al-Kuraya KS (2009) PIK3CA alterations in Middle Eastern ovarian cancers. *Mol Cancer* 8:51.
2. AGO (2007) Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren, Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. sowie in der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (Hrsg), W. Zuckschwerdt, München Wien New York.
3. Albertson DG (2006) Gene amplification in cancer. *Trends Genet* 22:447-455.
4. Andrew S (1999) PIK3CA: determining its role in cellular proliferation and ovarian cancer. *Clin Genet* 56:190-191.
5. Anreder MB, Freeman SM, Merogi A, Halabi S, Marrogi AJ (1999) p53, c-erbB2, and PCNA status in benign, proliferative and malignant ovarian surface epithelial neoplasms: a study of 75 cases. *Arch Pathol Lab Med* 123:310-316.
6. Anttila MA, Kosma VM, Hongxiu J, Puolakka J, Juhola M, Saarikoski S, Syrjanen K (1999) p21/WAF1 expression as related to p53, cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 79:1870-1878.
7. Aoki M, Schetter C, Himly M, Batista O, Chang HW, Vogt PK (2000) The catalytic subunit of phosphoinositide 3-kinase: requirements for oncogenicity. *J Biol Chem* 275:6267-6275.
8. Astanehe A, Arenillas D, Wasserman WW, Leung PC, Dunn SE, Davies BR, Mills GB, Auersperg N (2008) Mechanisms underlying p53 regulation of PIK3CA transcription in ovarian surface epithelium and in ovarian cancer. *J Cell Sci* 121:664-674.
9. Aunoble B, Sanches R, Didier E, Bignon YJ (2000) Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review). *Int J Oncol* 16:567-576.
10. Bargonetti J, Friedman PN, Kern SE, Vogelstein B, Prives C (1991) Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* 65:1083-1091.
11. Baselga J (2006) Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* 312:1175-1178.
12. Bates S, Vousden KH (1996) p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 6:12-18.
13. Bell DA (2005) Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol* 18 Suppl 2:S19-32.
14. Bell DA, Scully RE (1994) Early de novo ovarian carcinoma. A study of fourteen cases. *Cancer* 73:1859-1864.
15. Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Sheer D, Shows TB, Bruns GA, Peacock J (1985) Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* 11:505-510.
16. Bertheau P, Espie M, Turpin E, Lehmann J, Plassa LF, Varna M, Janin A, de The H (2008) TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology* 75:132-139.
17. Bischoff FZ, Yim SO, Pathak S, Grant G, Siciliano MJ, Giovanella BC, Strong LC, Tainsky MA (1990) Spontaneous abnormalities in normal fibroblasts from patients with Li-Fraumeni cancer syndrome: aneuploidy and immortalization. *Cancer Res* 50:7979-7984.
18. Bose I, Ghosh B (2007) The p53-MDM2 network: from oscillations to apoptosis. *J Biosci* 32:991-997.

19. Boss EA, Massuger LF, Thomas CM, Geurts-Moespot A, Boonstra H, Sweep CG (2001) Vascular endothelial growth factor in ovarian cyst fluid. *Cancer* 91:371-377.
20. Bourdon JC (2007) p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* 97:277-282.
21. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP (2005) p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 19:2122-2137.
22. Boyd J (2003) Specific keynote: hereditary ovarian cancer: what we know. *Gynecol Oncol* 88:S8-10; discussion S11-13.
23. Boyd J (2008) Whence epithelial ovarian carcinoma? *Gynecol Oncol* 109:161-163.
24. Boyd J, Rubin SC (1997) Hereditary ovarian cancer: molecular genetics and clinical implications. *Gynecol Oncol* 64:196-206.
25. Brescia RJ, Dubin N, Demopoulos RI (1989) Endometrioid and clear cell carcinoma of the ovary. Factors affecting survival. *Int J Gynecol Pathol* 8:132-138.
26. Bristow RE, Gossett DR, Shook DR, Zahurak ML, Tomacruz RS, Armstrong DK, Montz FJ (2002) Micropapillary serous ovarian carcinoma: surgical management and clinical outcome. *Gynecol Oncol* 86:163-170.
27. Bristow RE, Karlan BY (1996) Ovulation induction, infertility, and ovarian cancer risk. *Fertil Steril* 66:499-507.
28. Byrne AT, Ross L, Holash J, Nakanishi M, Hu L, Hofmann JI, Yancopoulos GD, Jaffe RB (2003) Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res* 9:5721-5728.
29. Caduff RF, Svoboda-Newman SM, Ferguson AW, Johnston CM, Frank TS (1999) Comparison of mutations of Ki-RAS and p53 immunoreactivity in borderline and malignant epithelial ovarian tumors. *Am J Surg Pathol* 23:323-328.
30. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, Cristiano BE, Pearson RB, Phillips WA (2004) Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 64:7678-7681.
31. Cannistra SA (2004) Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 351:2519-2529.
32. Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655-1657.
33. Caron de Fromentel C, Soussi T (1992) TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 4:1-15.
34. Casas S, Aventin A, Fuentes F, Vallespi T, Granada I, Carrio A, Angel Martinez-Climent J, Sole F, Teixido M, Bernues M, Duarte J, Maria Hernandez J, Brunet S, Dolors Coll M, Sierra J (2004) Genetic diagnosis by comparative genomic hybridization in adult de novo acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 153:16-25.
35. Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, Huang LW, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC (2000) Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 156:409-417.
36. Chang HW, Aoki M, Fruman D, Auger KR, Bellacosa A, Tsichlis PN, Cantley LC, Roberts TM, Vogt PK (1997) Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science* 276:1848-1850.
37. Cheng KW, Lahad JP, Kuo WL, Lapuk A, Yamada K, Auersperg N, Liu J, Smith-McCune K, Lu KH, Fishman D, Gray JW, Mills GB (2004) The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat Med* 10:1251-1256.

38. Colombo N, Maggioni A, Vignali M, Parma G, Mangioni C (1994) Options for primary chemotherapy in advanced ovarian cancer: the European perspective. *Gynecol Oncol* 55:S108-113.
39. Cox MC, Maffei L, Buffolino S, Del Poeta G, Venditti A, Cantonetti M, Aronica G, Aquilina P, Masi M, Amadori S (1998) A comparative analysis of FISH, RT-PCR, and cytogenetics for the diagnosis of bcr-abl-positive leukemias. *Am J Clin Pathol* 109:24-31.
40. Cramer DW (2000) Epidemiology and Biostatistics. In: Practical Gynecologic Oncology. Berek JS, Hacker NF (Hrg.), 3rd edition, MD: Williams & Wilkins, Baltimore.
41. Crozier MA, Copeland LJ, Silva EG, Gershenson DM, Stringer CA (1989) Clear cell carcinoma of the ovary: a study of 59 cases. *Gynecol Oncol* 35:199-203.
42. Cuatrecasas M, Erill N, Musulen E, Costa I, Matias-Guiu X, Prat J (1998) K-ras mutations in nonmucinous ovarian epithelial tumors: a molecular analysis and clinicopathologic study of 144 patients. *Cancer* 82:1088-1095.
43. Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J (1997) K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer* 79:1581-1586.
44. Cui B, Zheng B, Zhang X, Stendahl U, Andersson S, Wallin KL (2009) Mutation of PIK3CA: possible risk factor for cervical carcinogenesis in older women. *Int J Oncol* 34:409-416.
45. Darai E, Walker-Combrouze F, Mlika-Cabanne N, Feldmann G, Madelenat P, Scoazec JY (1998) Expression of p53 protein in borderline epithelial ovarian tumors: a clinicopathologic study of 39 cases. *Eur J Gynaecol Oncol* 19:144-149.
46. de Graeff P, Crijns AP, de Jong S, Boezen M, Post WJ, de Vries EG, van der Zee AG, de Bock GH (2009) Modest effect of p53, EGFR and HER-2/neu on prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 101:149-159.
47. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci US A* 76:2420-2424.
48. Deligdisch L, Einstein AJ, Guera D, Gil J (1995) Ovarian dysplasia in epithelial inclusion cysts. A morphometric approach using neural networks. *Cancer* 76:1027-1034.
49. DePriest PD, Banks ER, Powell DE, van Nagell JR, Jr., Gallion HH, Puls LE, Hunter JE, Kryscio RJ, Royalty MB (1992) Endometrioid carcinoma of the ovary and endometriosis: the association in postmenopausal women. *Gynecol Oncol* 47:71-75.
50. Diamandis EP, Borgono CA, Scorilas A, Harbeck N, Dorn J, Schmitt M (2004) Human kallikrein 11: an indicator of favorable prognosis in ovarian cancer patients. *Clin Biochem* 37:823-829.
51. Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD (2004) Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nat Rev Cancer* 4:718-727.
52. Diebold J (2001) [Phenotype--genotype--correlation in ovarian neoplasia]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 85:153-160.
53. Dinh P, Harnett P, Piccart-Gebhart MJ, Awada A (2008) New therapies for ovarian cancer: cytotoxics and molecularly targeted agents. *Crit Rev Oncol Hematol* 67:103-112.
54. Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA, Cummings MC, Gabrielli BG, Wright GR, Hurst T, Khoo SK, Parsons PG (1997) Reduced expression of retinoblastoma gene product (pRB) and high expression of p53 are associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Int J Cancer* 74:407-415.

55. Duncan TJ, Al-Attar A, Rolland P, Scott IV, Deen S, Liu DT, Spendlove I, Durrant LG (2008) Vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer: a model for targeted use of novel therapies? *Clin Cancer Res* 14:3030-3035.
56. Eccles DM, Brett L, Lessells A, Gruber L, Lane D, Steel CM, Leonard RC (1992) Overexpression of the p53 protein and allele loss at 17p13 in ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 65:40-44.
57. Eifel P, Hendrickson M, Ross J, Ballon S, Martinez A, Kempson R (1982) Simultaneous presentation of carcinoma involving the ovary and the uterine corpus. *Cancer* 50:163-170.
58. El-Deiry WS (2003) The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene* 22:7486-7495.
59. Estilo CL, P OC, Ngai I, Patel SG, Reddy PG, Dao S, Shaha AR, Kraus DH, Boyle JO, Wong RJ, Pfister DG, Huryn JM, Zlotolow IM, Shah JP, Singh B (2003) The role of novel oncogenes squamous cell carcinoma-related oncogene and phosphatidylinositol 3-kinase p110alpha in squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res* 9:2300-2306.
60. Evans MF, McDicken IW, Herrington CS (1999) Numerical abnormalities of chromosomes 1, 11, 17, and X are associated with stromal invasion in serous and mucinous epithelial ovarian tumours. *J Pathol* 189:53-59.
61. Falkenberry SS, Steinhoff MM, Gordinier M, Rappoport S, Gajewski W, Granai CO (1996) Synchronous endometrioid tumors of the ovary and endometrium. A clinicopathologic study of 22 cases. *J Reprod Med* 41:713-718.
62. Fathalla MF (1971) Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2:163.
63. Feeley KM, Wells M (2001) Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* 38:87-95.
64. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57:1083-1093.
65. Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, Alix S, Baker SJ, Box G, Chuckowree IS, Clarke PA, Depledge P, Eccles SA, Friedman LS, Hayes A, Hancox TC, Kugendradas A, Lensun L, Moore P, Olivero AG, Pang J, Patel S, Pergl-Wilson GH, Raynaud FI, Robson A, Saghir N, Salphati L, Sohal S, Utsch MH, Valenti M, Wallweber HJ, Wan NC, Wiesmann C, Workman P, Zhyvoloup A, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ (2008) The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin -4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem* 51:5522-5532.
66. Frank TS, Bartos RE, Haefner HK, Roberts JA, Wilson MD, Hubbell GP (1994) Loss of heterozygosity and overexpression of the p53 gene in ovarian carcinoma. *Mod Pathol* 7:3-8.
67. Frasci G, Conforti S, Zullo F, Mastrantonio P, Comella G, Comella P, Persico G, Iaffaioli RV (1996) A risk model for ovarian carcinoma patients using CA 125: time to normalization renders second-look laparotomy redundant. *Cancer* 77:1122-1130.
68. Fraser M, Leung B, Jahani-Asl A, Yan X, Thompson WE, Tsang BK (2003) Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. *Reprod Biol Endocrinol* 1:66.
69. Fujita M, Enomoto T, Murata Y (2003) Genetic alterations in ovarian carcinoma: with specific reference to histological subtypes. *Mol Cell Endocrinol* 202:97-99.
70. Fukunaga M, Nomura K, Ishikawa E, Ushigome S (1997) Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumours. *Histopathology* 30:249-255.
71. Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK (1998) The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res* 58:5002-5008.

72. Garlich JR, De P, Dey N, Su JD, Peng X, Miller A, Murali R, Lu Y, Mills GB, Kundra V, Shu HK, Peng Q, Durden DL (2008) A vascular targeted pan phosphoinositide 3-kinase inhibitor prodrug, SF1126, with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res* 68:206-215.
73. Gomez-Raposo C, Mendiola M, Barriuso J, Hardisson D, Redondo A (2010) Molecular characterization of ovarian cancer by gene-expression profiling. *Gynecol Oncol* 118:88-92.
74. Guan XY, Fung JM, Ma NF, Lau SH, Tai LS, Xie D, Zhang Y, Hu L, Wu QL, Fang Y, Sham JS (2004) Oncogenic role of eIF-5A2 in the development of ovarian cancer. *Cancer Res* 64:4197-4200.
75. Hall PA, Lane DP (1994) p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?--Revisited! *J Pathol* 172:1-4.
76. Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE (1995) A prospective study of reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer* 76:284-290.
77. Harris CC (1993) p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 262:1980-1981.
78. Harvey M, Sands AT, Weiss RS, Hegi ME, Wiseman RW, Pantazis P, Giovanella BC, Tainsky MA, Bradley A, Donehower LA (1993) In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* 8:2457-2467.
79. Hauptmann S, Denkert C, Koch I, Petersen S, Schluns K, Reles A, Dietel M, Petersen I (2002) Genetic alterations in epithelial ovarian tumors analyzed by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol* 33:632-641.
80. Havrilesky L, Darcy M, Hamdan H, Priore RL, Leon J, Bell J, Berchuck A (2003) Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 21:3814-3825.
81. Heaps JM, Nieberg RK, Berek JS (1990) Malignant neoplasms arising in endometriosis. *Obstet Gynecol* 75:1023-1028.
82. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Pecorelli S, Beller U (2006) Carcinoma of the ovary. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 95 Suppl 1:S161-192.
83. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53.
84. Holschneider CH, Berek JS (2000) Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 19:3-10.
85. Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Gabelli SB, Amzel LM (2007) The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science* 318:1744-1748.
86. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL (1990) Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335:675-679.
87. Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Yang ZQ, Shimada Y, Nomura N, Hirai H, Imamura M, Inazawa J (2001) SNO is a probable target for gene amplification at 3q26 in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *Biochem Biophys Res Commun* 286:559-565.
88. Imoto I, Yuki Y, Sonoda I, Ito T, Shimada Y, Imamura M, Inazawa J (2003) Identification of ZASC1 encoding a Kruppel-like zinc finger protein as a novel target for 3q26 amplification in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 63:5691-5696.
89. Inoue M, Fujita M, Enomoto T, Morimoto H, Monden T, Shimano T, Tanizawa O (1994) Immunohistochemical analysis of p53 in gynecologic tumors. *Am J Clin Pathol* 102:665-670.

90. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM (1986) Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320:84-85.
91. Issa RM, Lebeau A, Grob T, Holst F, Moch H, Terracciano L, Choschzick M, Sauter G, Simon R (2009) Estrogen receptor gene amplification occurs rarely in ovarian cancer. *Mod Pathol* 22:191-196.
92. Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, Ma YY, Carcangiu ML, Pinkel D, Yang-Feng TL, Gray JW (1995) Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res* 55:6172-6180.
93. Joerger AC, Fersht AR (2008) Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 77:557-582.
94. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, Hedvat CV, Traina TA, Solit D, Gerald W, Moynahan ME (2009) PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 15:5049-5059.
95. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B (1991) Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252:1708-1711.
96. Kiyokawa T (1994) Alteration of p53 in ovarian cancer: its occurrence and maintenance in tumor progression. *Int J Gynecol Pathol* 13:311-318.
97. Kline RC, Wharton JT, Atkinson EN, Burke TW, Gershenson DM, Edwards CL (1990) Endometrioid carcinoma of the ovary: retrospective review of 145 cases. *Gynecol Oncol* 39:337-346.
98. Kmet LM, Cook LS, Magliocco AM (2003) A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer* 97:389-404.
99. Ko LJ, Prives C (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10:1054-1072.
100. Kohler MF, Kerns BJ, Humphrey PA, Marks JR, Bast RC, Jr., Berchuck A (1993) Mutation and overexpression of p53 in early-stage epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 81:643-650.
101. Kolasa IK, Rembiszewska A, Felisiak A, Ziolkowska-Seta I, Murawska M, Moes J, Timorek A, Dansonka-Mieszkowska A, Kupryjanczyk J (2009) PIK3CA amplification associates with resistance to chemotherapy in ovarian cancer patients. *Cancer Biol Ther* 8:21-26.
102. Komiyama S, Aoki D, Tominaga E, Susumu N, Udagawa Y, Nozawa S (1999) Prognosis of Japanese patients with ovarian clear cell carcinoma associated with pelvic endometriosis: clinicopathologic evaluation. *Gynecol Oncol* 72:342-346.
103. Kommoss F, Richter B, Breitbach GP (2001) Borderline-Tumoren des Ovars. *Der Gynäkologe* 34:1003-1012.
104. Koonings PP, Campbell K, Mishell DR, Jr., Grimes DA (1989) Relative frequency of primary ovarian neoplasms: a 10-year review. *Obstet Gynecol* 74:921-926.
105. Kress M, May E, Cassingena R, May P (1979) Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 31:472-483.
106. Kuo KT, Guan B, Feng Y, Mao TL, Chen X, Jinawath N, Wang Y, Kurman RJ, Shih Ie M, Wang TL (2009a) Analysis of DNA copy number alterations in ovarian serous tumors identifies new molecular genetic changes in low-grade and high-grade carcinomas. *Cancer Res* 69:4036-4042.
107. Kuo KT, Mao TL, Jones S, Veras E, Ayhan A, Wang TL, Glas R, Slamon D, Velculescu VE, Kuman RJ, Shih Ie M (2009b) Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* 174:1597-1601.

108. Kupryjanczyk J, Thor AD, Beauchamp R, Merritt V, Edgerton SM, Bell DA, Yandell DW (1993) p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4961-4965.
109. Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.
110. Lane DP, Benchimol S (1990) p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 4:1-8.
111. Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278:261-263.
112. Lane DP, Hupp TR (2003) Drug discovery and p53. *Drug Discov Today* 8:347-355.
113. Ledermann JA, Raja FA (2010) Targeted trials in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 119(1):151-156.
114. Lee JM, Abrahamson JL, Kandel R, Donehower LA, Bernstein A (1994) Susceptibility to radiation-carcinogenesis and accumulation of chromosomal breakage in p53 deficient mice. *Oncogene* 9:3731-3736.
115. Lee S, Choi EJ, Jin C, Kim DH (2005) Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecol Oncol* 97:26-34.
116. Leitch AR, Schwarzbacher T, Jackson D, Leitch IJ (1994) In situ-Hybridisierung., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford.
117. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649.
118. Levesque MA, Katsaros D, Yu H, Zola P, Sismondi P, Giardina G, Diamandis EP (1995) Mutant p53 protein overexpression is associated with poor outcome in patients with well or moderately differentiated ovarian carcinoma. *Cancer* 75:1327-1338.
119. Levine AJ (1989) The p53 tumor suppressor gene and gene product. *Princess Takamatsu Symp* 20:221-230.
120. Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351:453-456.
121. Liang S, Yang N, Pan Y, Deng S, Lin X, Yang X, Katsaros D, Roby KF, Hamilton TC, Connolly DC, Coukos G, Zhang L (2009) Expression of activated PIK3CA in ovarian surface epithelium results in hyperplasia but not tumor formation. *PLoS One* 4:e4295.
122. Lianidou ES, Levesque MA, Katsaros D, Angelopoulou K, Yu H, Genta F, Arisio R, Massobrio M, Bharaj B, Diamandis EP (1999) Immunofluorometric assay of p53 protein versus sequencing of p53 exons 5 to 9 for the detection of p53 abnormalities in ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 19:749-756.
123. Liede A, Tonin PN, Sun CC, Serruya C, Daly MB, Narod SA, Foulkes WD (1998) Is hereditary site-specific ovarian cancer a distinct genetic condition? *Am J Med Genet* 75:55-58.
124. Linzer DI, Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17:43-52.
125. Linzer DI, Maltzman W, Levine AJ (1979) The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. *Virology* 98:308-318.
126. Liu WL, Midgley C, Stephen C, Saville M, Lane DP (2001) Biological significance of a small highly conserved region in the N terminus of the p53 tumour suppressor protein. *J Mol Biol* 313:711-731.
127. Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70:923-935.

128. Loeb LA (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51:3075-3079.
129. Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, Liu JM, Yang DM, Yang WK, Shen CY (2000) PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 19:2739-2744.
130. Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chene P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, Garcia-Echeverria C (2008) Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 7:1851-1863.
131. Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK, Clarke-Pearson DL, Iglehart JD, Bast RC, Jr., Berchuck A (1991) Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 51:2979-2984.
132. Martinez J, Georgoff I, Levine AJ (1991) Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes Dev* 5:151-159.
133. Matias-Guiu X, Prat J (1998) Molecular pathology of ovarian carcinomas. *Virchows Arch* 433:103-111.
134. Mayr D, Kanitz V, Anderegg B, Luthardt B, Engel J, Lohrs U, Amann G, Diebold J (2006) Analysis of gene amplification and prognostic markers in ovarian cancer using comparative genomic hybridization for microarrays and immunohistochemical analysis for tissue microarrays. *Am J Clin Pathol* 126:101-109.
135. McBride OW, Merry D, Givol D (1986) The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:130-134.
136. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M (1996) Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 334:1-6.
137. McManus DT, Yap EP, Maxwell P, Russell SE, Toner PG, McGee JO (1994) p53 expression, mutation, and allelic deletion in ovarian cancer. *J Pathol* 174:159-168.
138. Michalovitz D, Halevy O, Oren M (1990) Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 62:671-680.
139. Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, Schneidman-Duhovny D, Wolfson HJ, Backer JM, Williams RL (2007) Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* 317:239-242.
140. Milner BJ, Allan LA, Eccles DM, Kitchener HC, Leonard RC, Kelly KF, Parkin DE, Haites NE (1993) p53 mutation is a common genetic event in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 53:2128-2132.
141. Milner J, Medcalf EA (1991) Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 65:765-774.
142. Montag AG, Jenison EL, Griffiths CT, Welch WR, Lavin PT, Knapp RC (1989) Ovarian clear cell carcinoma. A clinicopathologic analysis of 44 cases. *Int J Gynecol Pathol* 8:85-96.
143. Moreno-Bueno G, Gamallo C, Perez-Gallego L, de Mora JC, Suarez A, Palacios J (2001) beta-Catenin expression pattern, beta-catenin gene mutations, and microsatellite instability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 10:116-122.
144. Mostoufizadeh M, Scully RE (1980) Malignant tumors arising in endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 23:951-963.

145. Muller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T (2006) One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat* 9:288-306.
146. Nakayama K, Nakayama N, Jinawath N, Salani R, Kurman RJ, Shih Ie M, Wang TL (2007) Amplicon profiles in ovarian serous carcinomas. *Int J Cancer* 120:2613-2617.
147. Nakayama K, Nakayama N, Kurman RJ, Cope L, Pohl G, Samuels Y, Velculescu VE, Wang TL, Shih Ie M (2006) Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms. *Cancer Biol Ther* 5:779-785.
148. Nanjundan M, Nakayama Y, Cheng KW, Lahad J, Liu J, Lu K, Kuo WL, Smith-McCune K, Fishman D, Gray JW, Mills GB (2007) Amplification of MDS1/EVI1 and EVI1, located in the 3q26.2 amplicon, is associated with favorable patient prognosis in ovarian cancer. *Cancer Res* 67:3074-3084.
149. Newcomb EW, Sosnow M, Demopoulos RI, Zeleniuch-Jacquotte A, Sorich J, Speyer JL (1999) Expression of the cell cycle inhibitor p27KIP1 is a new prognostic marker associated with survival in epithelial ovarian tumors. *Am J Pathol* 154:119-125.
150. Nijman HW, Kenemans P, Poort-Keesom RJ, Verstraeten RA, Mensdorff-Pouilly S, Verheijen RH, Melief CJ, Hilgers J, Meijer CJ (1999) Influence of chemotherapy on the expression of p53, HER-2/neu and proliferation markers in ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 83:201-206.
151. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G (2001) Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 94:1-5.
152. Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23-28.
153. Okamoto A, Sameshima Y, Yokoyama S, Terashima Y, Sugimura T, Terada M, Yokota J (1991) Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer. *Cancer Res* 51:5171-5176.
154. Or YY, Hui AB, Tam KY, Huang DP, Lo KW (2005) Characterization of chromosome 3q and 12q amplicons in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 26:49-56.
155. Oren M, Maltzman W, Levine AJ (1981) Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* 1:101-110.
156. Palacios J, Gamallo C (1998) Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 58:1344-1347.
157. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ (1996) Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 13:63-72.
158. Pienta KJ, Partin AW, Coffey DS (1989) Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. *Cancer Res* 49:2525-2532.
159. Pinto D, Pereira D, Portela C, da Silva JL, Lopes C, Medeiros R (2005) The influence of HER2 genotypes as molecular markers in ovarian cancer outcome. *Biochem Biophys Res Commun* 335:1173-1178.
160. Pitt SC, Chen H (2008) The phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathway in medullary thyroid cancer. *Surgery* 144:721-724.
161. Pothuri B, Leitao MM, Levine DA, Viale A, Olshen AB, Arroyo C, Bogomolny F, Olvera N, Lin O, Soslow RA, Robson ME, Offit K, Barakat RR, Boyd J (2010) Genetic analysis of the early natural history of epithelial ovarian carcinoma. *PLoS One* 5:e10358.
162. Prat J (2005) Ovarian carcinomas, including secondary tumors: diagnostically challenging areas. *Mod Pathol* 18 Suppl 2:S99-111.

163. Press JZ, De Luca A, Boyd N, Young S, Troussard A, Ridge Y, Kaurah P, Kalloger SE, Blood KA, Smith M, Spellman PT, Wang Y, Miller DM, Horsman D, Faham M, Gilks CB, Gray J, Huntsman DG (2008) Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have distinct molecular abnormalities. *BMC Cancer* 8:17.
164. Prevo R, Deutsch E, Sampson O, Diplexcito J, Cengel K, Harper J, O'Neill P, McKenna WG, Patel S, Bernhard EJ (2008) Class I PI3 kinase inhibition by the pyridinylfuranopyrimidine inhibitor PI-103 enhances tumor radiosensitivity. *Cancer Res* 68:5915-5923.
165. Qiao YH, Cheng J, Guo RX (2007) [Expression of phosphorylated protein kinase B and PTEN protein in ovarian epithelial cancer]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 42:325-329.
166. Quaye L, Gayther SA, Ramus SJ, Di Cioccio RA, McGuire V, Hogdall E, Hogdall C, Blaakr J, Easton DF, Ponder BA, Jacobs I, Kjaer SK, Whittemore AS, Pearce CL, Pharoah PD, Song H (2008) The effects of common genetic variants in oncogenes on ovarian cancer survival. *Clin Cancer Res* 14:5833-5839.
167. Rameh LE, Cantley LC (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274:8347-8350.
168. Reich NC, Oren M, Levine AJ (1983) Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol* 3:2143-2150.
169. Reles A, Schmider A, Press MF, Schonborn I, Friedmann W, Huber-Schumacher S, Strohmeyer T, Lichtenegger W (1996) Immunostaining of p53 protein in ovarian carcinoma: correlation with histopathological data and clinical outcome. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:489-494.
170. Riazimand SH, Welkoborsky HJ, Bernauer HS, Jacob R, Mann WJ (2002) Investigations for fine mapping of amplifications in chromosome 3q26.3-28 frequently occurring in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncology* 63:385-392.
171. Riedinger JM, Bonnetain F, Basuyau JP, Eche N, Larbre H, Dalifard I, Wafflart J, Ricolleau G, Pichon MF (2007) Change in CA 125 levels after the first cycle of induction chemotherapy is an independent predictor of epithelial ovarian tumour outcome. *Ann Oncol* 18:881-885.
172. Risch HA, Marrett LD, Howe GR (1994) Parity, contraception, infertility, and the risk of epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol* 140:585-597.
173. Robert-Koch-Institut (2010a) Inzidenzraten ICD-10 C56 (Eierstöcke). Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie. Krebsregisterdaten. Krebs in Deutschland (Online im Internet) http://www.rki.de/cln_169/nn_203956/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/KID/Lokalisationen__Tabellen/kid_lokalisationen_tabelle.html (Stand: 05.08.2010, 16:45).
174. Robert-Koch-Institut (2010b) Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends, 7. Ausgabe, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg), Berlin.
175. Robert-Koch-Institut (2010c) Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes., RKI (Hrsg), Berlin.
176. Rohlke P, Milde-Langosch K, Weyland C, Pichlmeier U, Jonat W, Loning T (1997) p53 is a persistent and predictive marker in advanced ovarian carcinomas: multivariate analysis including comparison with Ki67 immunoreactivity. *J Cancer Res Clin Oncol* 123:496-501.
177. Rosano L, Di Castro V, Spinella F, Tortora G, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A (2007) Combined targeting of endothelin A receptor and epidermal growth factor receptor in ovarian cancer shows enhanced antitumor activity. *Cancer Res* 67:6351-6359.
178. Rosen B, Kwon J, Fung Kee Fung M, Gagliardi A, Chambers A (2004) Systematic review of management options for women with a hereditary predisposition to ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 93:280-286.

179. Rotter V, Witte ON, Coffman R, Baltimore D (1980) Abelson murine leukemia virus-induced tumors elicit antibodies against a host cell protein, P50. *J Virol* 36:547-555.
180. Runnebaum IB, Stickeler E (2001) Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol* 127:73-79.
181. Saegusa M, Machida D, Okayasu I (2000) Loss of DCC gene expression during ovarian tumorigenesis: relation to tumour differentiation and progression. *Br J Cancer* 82:571-578.
182. Saigo PE (1993) The histopathology of malignant ovarian tumors. In: Cancer of the ovary. Markman M, Hoskins WJ (Hrg.), Raven Press, New York, S. 21-43.
183. Sarnow P, Ho YS, Williams J, Levine AJ (1982) Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28:387-394.
184. Sattler HP, Lensch R, Rohde V, Zimmer E, Meese E, Bonkhoff H, Retz M, Zwergel T, Bex A, Stoeckle M, Wullich B (2000) Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *Prostate* 45:207-215.
185. Sattler HP, Rohde V, Bonkhoff H, Zwergel T, Wullich B (1999) Comparative genomic hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer. *Prostate* 39:79-86.
186. Sauter G (2010) Representativity of TMA studies. *Methods Mol Biol* 664:27-35.
187. Schilder RJ, Sill MW, Chen X, Darcy KM, Decesare SL, Lewandowski G, Lee RB, Arciero CA, Wu H, Godwin AK (2005) Phase II study of gefitinib in patients with relapsed or persistent ovarian or primary peritoneal carcinoma and evaluation of epidermal growth factor receptor mutations and immunohistochemical expression: a Gynecologic Oncology Group Study. *Clin Cancer Res* 11:5539-5548.
188. Schlosshauer PW, Cohen CJ, Penault-Llorca F, Miranda CR, Bignon YJ, Dauplat J, Deligdisch L (2003) Prophylactic oophorectomy: a morphologic and immunohistochemical study. *Cancer* 98:2599-2606.
189. Schnell CR, Stauffer F, Allegrini PR, O'Reilly T, McSheehy PM, Dartois C, Stumm M, Cozens R, Littlewood-Evans A, Garcia-Echeverria C, Maira SM (2008) Effects of the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 on the tumor vasculature: implications for clinical imaging. *Cancer Res* 68:6598-6607.
190. Scorilas A, Borgono CA, Harbeck N, Dorn J, Schmalfeldt B, Schmitt M, Diamandis EP (2004) Human kallikrein 13 protein in ovarian cancer cytosols: a new favorable prognostic marker. *J Clin Oncol* 22:678-685.
191. Scully RE, Barlow JF (1967) "Mesonephroma" of ovary. Tumor of Mullerian nature related to the endometrioid carcinoma. *Cancer* 20:1405-1417.
192. Scully RE, Sobin LH (1999) World Health Organisation (WHO). International Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Ovarian Tumours, 2. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York.
193. Scully RE, Young RH, Clement PB (1998) Atlas of Tumor Pathology. Tumours of the Ovary, Maldeveloped Gonads, Fallopian Tube, and Broad Ligament, 3rd series, Washington: Armed Forces Institute of Pathology.
194. Sebolt-Leopold JS, English JM (2006) Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature* 441:457-462.
195. Seidman JD, Kurman RJ (2003) Pathology of ovarian carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 17:909-925, vii.

196. Selivanova G, Wiman KG (2007) Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene* 26:2243-2254.
197. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW (1999) PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 21:99-102.
198. Sheridan E, Silcocks P, Smith J, Hancock BW, Goyns MH (1994) P53 mutation in a series of epithelial ovarian cancers from the U.K., and its prognostic significance. *Eur J Cancer* 30A:1701-1704.
199. Shigemasa K, Tian X, Gu L, Tanimoto H, Underwood LJ, O'Brien TJ, Ohama K (2004) Human kallikrein 8 (hK8/TADG-14) expression is associated with an early clinical stage and favorable prognosis in ovarian cancer. *Oncol Rep* 11:1153-1159.
200. Shih Ie M, Kurman RJ (2004) Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 164:1511-1518.
201. Silverberg SG (1989) Grading index in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 8:147-155.
202. Silverberg SG (2000) Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* 19:7-15.
203. Silvestrini R, Daidone MG, Veneroni S, Benini E, Scarfone G, Zanaboni F, Villa A, Presti M, Danese S, Bolis G (1998) The clinical predictivity of biomarkers of stage III-IV epithelial ovarian cancer in a prospective randomized treatment protocol. *Cancer* 82:159-167.
204. Simon R, Mirlacher M, Sauter G (2010) Immunohistochemical analysis of tissue microarrays. *Methods Mol Biol* 664:113-126.
205. Simon R, Sauter G (2003) Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 5:1-12.
206. Singer G, Kurman RJ, Chang HW, Cho SK, Shih Ie M (2002) Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am J Pathol* 160:1223-1228.
207. Singer G, Oldt R, 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih Ie M (2003) Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95:484-486.
208. Singh B, Reddy PG, Goberdhan A, Walsh C, Dao S, Ngai I, Chou TC, P OC, Levine AJ, Rao PH, Stoffel A (2002a) p53 regulates cell survival by inhibiting PIK3CA in squamous cell carcinomas. *Genes Dev* 16:984-993.
209. Singh B, Stoffel A, Gogineni S, Poluri A, Pfister DG, Shaha AR, Pathak A, Bosl G, Cordon-Cardo C, Shah JP, Rao PH (2002b) Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 161:365-371.
210. Solomon E, Borrow J, Goddard AD (1991) Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254:1153-1160.
211. Soussi T, Asselain B, Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, Beroud C (2006a) Meta-analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection. *Clin Cancer Res* 12:62-69.
212. Soussi T, Beroud C (2001) Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1:233-240.
213. Soussi T, Ishioka C, Claustres M, Beroud C (2006b) Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. *Nat Rev Cancer* 6:83-90.
214. Soussi T, Kato S, Levy PP, Ishioka C (2005) Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum Mutat* 25:6-17.

215. Spentzos D, Levine DA, Ramoni MF, Joseph M, Gu X, Boyd J, Libermann TA, Cannistra SA (2004) Gene expression signature with independent prognostic significance in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 22:4700-4710.
216. Strano S, Dell'Orso S, Di Agostino S, Fontemaggi G, Sacchi A, Blandino G (2007) Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene* 26:2212-2219.
217. Sturzbecher HW, Brain R, Addison C, Rudge K, Remm M, Grimaldi M, Keenan E, Jenkins JR (1992) A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene* 7:1513-1523.
218. Sugita M, Tanaka N, Davidson S, Sekiya S, Varella-Garcia M, West J, Drabkin HA, Gemmill RM (2000) Molecular definition of a small amplification domain within 3q26 in tumors of cervix, ovary, and lung. *Cancer Genet Cytogenet* 117:9-18.
219. Suzuki S, Moore DH, 2nd, Ginzinger DG, Godfrey TE, Barclay J, Powell B, Pinkel D, Zaloudek C, Lu K, Mills G, Berchuck A, Gray JW (2000) An approach to analysis of large-scale correlations between genome changes and clinical endpoints in ovarian cancer. *Cancer Res* 60:5382-5385.
220. Swiger RR, Tucker JD (1996) Fluorescence in situ hybridization: a brief review. *Environ Mol Mutagen* 27:245-254.
221. Tavassoli FA, Devilee P (2003) World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of the Breast and Female Genital Organs, IARC Press, Lyon.
222. Temin HM (1988) Evolution of cancer genes as a mutation-driven process. *Cancer Res* 48:1697-1701.
223. Teneriello MG, Ebina M, Linnoila RI, Henry M, Nash JD, Park RC, Birrer MJ (1993) p53 and Ki-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Res* 53:3103-3108.
224. Toker A, Cantley LC (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387:673-676.
225. Toledo F, Wahl GM (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6:909-923.
226. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G (2001) Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159:2249-2256.
227. UICC (2006) Global cancer control. International Union Against Cancer. Prognostic Factors in Cancer, 3. Auflage, John Wiley & Sons Hoboken New Jersey, USA.
228. Ulbright TM, Roth LM (1985) Metastatic and independent cancers of the endometrium and ovary: a clinicopathologic study of 34 cases. *Hum Pathol* 16:28-34.
229. van Haaften-Day C, Russell P, Boyer CM, Kerns BJ, Wiener JR, Jensen DN, Bast RC, Jr., Hacker NF (1996) Expression of cell regulatory proteins in ovarian borderline tumors. *Cancer* 77:2092-2098.
230. Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ (2009) Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol* 16:267-282.
231. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 253:239-254.
232. Vergote IB, Kaern J, Abeler VM, Pettersen EO, De Vos LN, Trope CG (1993) Analysis of prognostic factors in stage I epithelial ovarian carcinoma: importance of degree of differentiation and deoxyribonucleic acid ploidy in predicting relapse. *Am J Obstet Gynecol* 169:40-52.

233. Verri E, Guglielmini P, Puntoni M, Perdelli L, Papadia A, Lorenzi P, Rubagotti A, Ragni N, Boccardo F (2005) HER2/neu oncoprotein overexpression in epithelial ovarian cancer: evaluation of its prevalence and prognostic significance. Clinical study. *Oncology* 68:154-161.
234. Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501.
235. Vogelstein B, Kinzler KW (1994) Tumour-suppressor genes. X-rays strike p53 again. *Nature* 370:174-175.
236. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310.
237. Volinia S, Hiles I, Ormondroyd E, Nizetic D, Antonacci R, Rocchi M, Waterfield MD (1994) Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 alpha (PIK3CA) gene. *Genomics* 24:472-477.
238. Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:275-283.
239. Weber-Mangal S, Sinn HP, Popp S, Klaes R, Emig R, Bentz M, Mansmann U, Bastert G, Bartram CR, Jauch A (2003) Breast cancer in young women (< or = 35 years): Genomic aberrations detected by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 107:583-592.
240. Wen WH, Reles A, Runnebaum IB, Sullivan-Halley J, Bernstein L, Jones LA, Felix JC, Kreienberg R, el-Naggar A, Press MF (1999) p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *Int J Gynecol Pathol* 18:29-41.
241. Wenham RM, Lancaster JM, Berchuck A (2002) Molecular aspects of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 16:483-497.
242. Werness BA, Eltabbakh GH (2001) Familial ovarian cancer and early ovarian cancer: biologic, pathologic, and clinical features. *Int J Gynecol Pathol* 20:48-63.
243. Wessels LF, van Welsem T, Hart AA, van't Veer LJ, Reinders MJ, Nederlof PM (2002) Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization: a specific somatic genetic profile for BRCA1 tumors. *Cancer Res* 62:7110-7117.
244. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M (2009) p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* 9:95-107.
245. Willner J, Wurz K, Allison KH, Galic V, Garcia RL, Goff BA, Swisher EM (2007) Alternate molecular genetic pathways in ovarian carcinomas of common histological types. *Hum Pathol* 38:607-613.
246. Wittekind C, Wagner G (1997) TNM-Klassifikation maligner Tumoren (UICC), Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio.
247. Woenckhaus J, Steger K, Sturm K, Munstedt K, Franke FE, Fenic I (2007) Prognostic value of PIK3CA and phosphorylated AKT expression in ovarian cancer. *Virchows Arch* 450:387-395.
248. Wolf D, Admon S, Oren M, Rotter V (1984) Abelson murine leukemia virus-transformed cells that lack p53 protein synthesis express aberrant p53 mRNA species. *Mol Cell Biol* 4:552-558.
249. Wu GS, El-Diery WS (1996) p53 and chemosensitivity. *Nat Med* 2:255-256.
250. Xu Y (2008) Induction of genetic instability by gain-of-function p53 cancer mutants. *Oncogene* 27:3501-3507.
251. Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 70:937-948.
252. Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, Imoto I, Fujisawa T, Inazawa J (2003) TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 9:4705-4713.

253. Zaino RJ, Unger ER, Whitney C (1984) Synchronous carcinomas of the uterine corpus and ovary. *Gynecol Oncol* 19:329-335.
254. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Liang S, Hasegawa K, Giannakakis A, Poulos N, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Butzow R, Weber BL, Coukos G (2007) Integrative genomic analysis of phosphatidylinositol 3'-kinase family identifies PIK3R3 as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 13:5314-5321.
255. Zhang L, Yang N, Katsaros D, Huang W, Park JW, Fracchioli S, Vezzani C, Rigault de la Longrais IA, Yao W, Rubin SC, Coukos G (2003) The oncogene phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 63:4225-4231.
256. Zhang X, Deng HX, Zhao X, Su D, Chen XC, Chen LJ, Wei YQ, Zhong Q, Li ZY, He X, Yi T (2009) RNA interference-mediated silencing of the phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit attenuates growth of human ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Oncology* 77:22-32.
257. Zheng J, Benedict WF, Xu HJ, Hu SX, Kim TM, Velicescu M, Wan M, Cofer KF, Dubeau L (1995) Genetic disparity between morphologically benign cysts contiguous to ovarian carcinomas and solitary cystadenomas. *J Natl Cancer Inst* 87:1146-1153.
258. Zwahlen D, Tschan MP, Grob TJ, Peters UR, Fink D, Haenggi W, Altermatt HJ, Cajot JF, Tobler A, Fey MF, Aebi S (2000) Differential expression of p73 splice variants and protein in benign and malignant ovarian tumours. *Int J Cancer* 88:66-70.

8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter für die freundliche Überlassung des Themas, die Schaffung und Bereitstellung der strukturellen Voraussetzungen für die Durchführung der Untersuchungen und seine ausgezeichnete inhaltliche Betreuung dieser Arbeit. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei seiner Sekretärin Frau Karin Breitmeyer für ihre ausgesprochen freundliche und hilfsbereite Art bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Andreas Lübke und Frau Dr. med. Rana Issa, die bei der Erarbeitung und Auswertung der Ergebnisse entscheidende Arbeit geleistet haben.

Ich danke auch Herrn PD Dr. rer. nat. Ronald Simon. Seine fachliche und persönliche Unterstützung haben in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ebenso danke ich Herrn Dr. med. Olaf Hellwinkel für seine Unterstützung bei den ersten Schritten der statistischen Bearbeitung.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors des Pathologischen Instituts am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, die durch ihre Arbeit zur Durchführung dieser Studie beigetragen haben.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinem Freund ganz herzlich für ihre ehrliche Unterstützung während meines gesamten Studiums danken.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: