

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Pathologie und Neuropathologie
Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

**Das Expressionsmuster von CA-125 und
Mesothelin in Primärtumor und Metastasen des
high-grade serösen Ovarialkarzinoms.
- Über den Einfluss dieser tumorassoziierten
Antigene und tumor-infiltrierenden
Lymphozyten auf die Prognose.**

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

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

vorgelegt von

Ney, Britta Joanna Berenike

2020

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. A. Staebler

2. Berichterstatter:

Professor Dr. J. Bauer

Tag der Disputation: 09.12.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Epidemiologie, geographische Distribution, Inzidenz und Mortalität des Ovarialkarzinoms	6
1.2 Screening, Therapie und Staging des Ovarialkarzinoms.....	7
1.3 FIGO-Klassifikation und Metastasierungswege	9
1.4 Einteilung der Ovarialneoplasien.....	11
1.5 Entstehungstheorien von epithelialen Ovarialneoplasien	15
1.5.1 <i>Inklusionszysten aus dem Oberflächenepithel des Ovars.</i>	15
1.5.2 <i>Das dualistische Modell</i>	16
1.5.3 <i>Vorläuferläsionen aus den Fimbrien der Tube</i>	17
1.6. Das Immunsystem	18
1.6.1 <i>T-Lymphozyten</i>	19
1.6.2 <i>Natürliche Reaktionen auf Kanzerogenese</i>	20
1.7 Tumorantigene	22
1.7.1 <i>CA-125</i>	25
1.7.2 <i>Mesothelin</i>	27
1.8. Ziele dieser Arbeit.....	29
2. Material und Methoden	30
2.1 Das Patientinnen-Kollektiv	30
2.2 Erstellen des Tissue-Microarray (TMA)	32
2.3 Immunhistochemie.....	34
2.3.1 <i>Allgemeine Immunhistochemie</i>	34
2.3.2 <i>Immunhistochemische Färbung für CA-125, Mesothelin und Lymphozyten</i>	36
2.3.3. <i>Auswertung der Immunhistochemie</i>	37

2.4 Statistische Auswertung	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Expressionsstatus von CA-125 und Mesothelin	39
3.2 Verteilung der Expression von CA-125 und Mesothelin.....	43
3.2.1 Homogenität der Expression innerhalb ausgewählter Tumorbereiche in Ovar und Netz.....	43
3.2.2 Heterogenität der Expression im Primärtumor verglichen mit den Metastasen	44
3.3 Infiltrationsstatus der CD3- und CD8-Lymphozyten.....	50
3.4 Heterogenität der Lymphozyteninfiltration im Primärtumor und in den Metastasen	53
3.5 Überlebensanalyse	58
3.5.1 Wie beeinflussen CA-125 und Mesothelin das Überleben?	58
3.5.2 Wie beeinflusst die Lymphozyteninfiltration das Überleben?	60
3.5.3 Wie beeinflusst die CA-125-Expression in Korrelation mit der Lymphozytendichte das Überleben?	63
3.5.4 Wie beeinflusst die Mesothelin-Expression in Korrelation mit der Lymphozytendichte das Überleben?	64
4. Diskussion.....	67
5. Zusammenfassung.....	78
6. Literaturverzeichnis.....	81
7. Erklärungen zum Eigenanteil	93

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: PRIMÄRTUMOR UND METASTASEN DES OVARIALKARZINOMS MIT DARSTELLUNG DER FIGO-STADIEN AUS „CARCINOMA OF THE OVARY“ (HEINTZ ET AL., 2006).....	10
ABBILDUNG 2: EINTEILUNG DER OVARIALNEOPLASIE ANHAND IHRES HISTOLOGISCHEN URSPRUNGS AUS „GYNÄKOLOGIE“ (KAST ET AL., 2013).....	12
ABBILDUNG 3: DIE WICHTIGSTEN HISTOLOGISCHEN SUBTYPEN DER EPITHELIALEN OVARIALKARZINOME. DAS SERÖSE KARZINOM ÄHNELT DEM TUBENEPITHEL, DAS ENDOMETRIOIDE KARZINOM DEN ENDOMETRIUMSDRÜSEN UND DAS MUZINÖSE KARZINOM DEM ENDOZERVIKALEN EPITHEL AUS „OVARIAN CANCER PATHOGENESIS: A MODEL IN EVOLUTION“ (KARST AND DRAPKIN, 2010).	14
ABBILDUNG 4: PROTEINE WELCHE AUF LIGANDEN DER MHC KLASSE I VON HGSC (SCHWARZ) UND BENIGNEM GEWEBE (GRAU) PRÄSENTIERT WERDEN. DER MARKANTE EXPRESSIONSGIPFEL IN HGSC, WELCHER IN BENIGNEM GEWEBEN FEHLT, WIRD IN DER WORD-CLOUD AUFGESCHLÜSSELT. AM HÖCHSTEN REPRÄSENTIERT IST DAS MUC16 ODER CA-125 (SCHUSTER ET AL., 2017).	24
ABBILDUNG 5: PROTEINE AUF LIGANDEN DER MHC KLASSE II VON HGSC (SCHWARZ) UND BENIGNEM GEWEBE (GRAU). DER MARKANTE EXPRESSIONSGIPFEL IN HGSC, WELCHER IN BENIGNEM GEWEBEN FEHLT, WIRD IN DER WORD-CLOUD AUFGESCHLÜSSELT. AM HÖCHSTEN REPRÄSENTIERT IST DAS MESOTHELIN (SCHUSTER ET AL., 2017).	25
ABBILDUNG 6: ALTER DER PATIENTINNEN IN UNSEREM KOLLEKTIV. DAS ALTER DER PATIENTINNEN REICHTE VON 31-92 JAHREN, WOBEI DER MITTELWERT BEI 66 JAHREN LAG.	32
ABBILDUNG 7: ERSTELLEN DES TISSUE-MICROARRAYS.....	34
ABBILDUNG 8: PRINZIP DER IMMUNHISTOCHEMIE MIT DER LAB METHODE. DER PRIMÄRANTIKÖRPER KOPPELT SICH AN DAS GESUCHTE ANTIGEN, WORAN SICH DANN DER BIOTINYLIERTER SEKUNDÄRANTIKÖRPER ZUR SIGNALVERSTÄRKUNG HEFTET. ALS NÄCHSTES BINDET SICH DAS MIT PEROXIDASE GEKOPPELTE AVIDIN AN DAS BIOTIN. NACH ZUGABE VON WASSERSTOFFPEROXID-CHROMOGEN-KOMPLEX, WIRD DIESES VOM PEROXID OXIDIERT, WELCHER DANN ALS BRAUNER FARBSTOFF SICHTBAR WIRD. ABBILDUNG VON (MULISCH, 2014).	35
ABBILDUNG 9: BEISPIELE DES IRS-SCORES VON CA-125. DIE LINKE ABBILDUNG ZEIGT EIN SCHWACHES FÄRBEMUSTER, DIE RECHTE EIN MEMBRANFÄRBEMUSTER UND DIE UNTERE ABBILDUNG EINE STARKE FÄRBUNG MIT ZYTOPLASMATISCHEM ANTEIL.	40
ABBILDUNG 10: BEISPIELE DES IRS-SCORES VON MESOTHELIN. DIE LINKE ABBILDUNG ZEIGT EIN SCHWACHES FÄRBEMUSTER, DIE MITTLERE ABBILDUNG EINE MITTLERE UND DIE RECHTE ABBILDUNG EIN STARKES FÄRBEMUSTER.	41
ABBILDUNG 11: HÄUFIGKEITEN DER IRS-SCORES IN DEN PRIMÄRTUMOREN DES OVARS. LINKS: CA-125 (N=157). DER CUT-OFF LIEGT BEI $IRS \geq 4$. 85,35% DER FÄLLE SIND ÜBER DEM CUT-OFF, DER MITTELWERT LIEGT BEI 7,01. RECHTS: MESOTHELIN (N=141). DER CUT-OFF LIEGT BEI $IRS \geq 6$. 23,4% DER FÄLLE LIEGEN ÜBER DEM CUT-OFF, DER MITTELWERT LIEGT BEI 3,68.	41
ABBILDUNG 12: IMMUNHISTOCHEMIE VON GESUNDEN TUBEN ALS KONTROLLGEWEBE MIT CA-125 UND MESOTHELIN. DIE CA-125-FÄRBUNGEN ERGABEN AM HÄUFIGSTEN DEN IRS SCORE 8, DIE MESOTHELIN-FÄRBUNGEN AM HÄUFIGSTEN DEN IRS-SCORE 6.....	42
ABBILDUNG 13: STREUDIAGRAMME ZU DEN IRS-SCORES VON CA-125 IM OVAR VERGlichen MIT DEN SCORES IM NETZ, PERITONEUM UND LYMPHKNOTEN. DIE GELBEN LINIEN TRENNEN DIE WERTE ÜBER UND UNTER DEM CUT-OFF VON IRS 4 AB.	46
ABBILDUNG 14: BALKENDIAGRAMM ZUR VERTEILUNG DER EXPRESSION VON CA-125 IN OVAR, NETZ UND PERITONEUM. DIE BALKEN ZEIGEN AN WIE VIELE FÄLLE IN JEWEILS 0,1,2 UND IN ALLEN LOKALISATIONEN EINEN IRS-SCORE ≥ 4 HATTEN. DIE ZAHLEN ÜBER DEN BALKEN GEBEN DIE JEWEILIGEN ABSOLUT- UND PROZENTWERTE AN.	47
ABBILDUNG 15: STREUDIAGRAMME ZU DEN IRS-SCORES VON MESOTHELIN IM OVAR VERGlichen MIT DEN SCORES IM NETZ, PERITONEUM UND LYMPHKNOTEN. DIE GELBEN LINIEN TRENNEN DIE WERTE ÜBER UND UNTER DEM CUT-OFF VON IRS 6 AB.	49
ABBILDUNG 16: BALKENDIAGRAMM ZUR VERTEILUNG DER EXPRESSION VON MESOTHELIN IN OVAR, NETZ UND PERITONEUM. DIE BALKEN ZEIGEN WIE VIELE FÄLLE IN JEWEILS 0,1,2 UND IN ALLEN LOKALISATIONEN EINEN IRS-SCORE ≥ 6 HATTEN. DIE ZAHLEN ÜBER DEN BALKEN GEBEN DIE JEWEILIGEN ABSOLUT- UND PROZENTWERTE AN.	50
ABBILDUNG 17: LINKS CD3E (EPITHELIALE) LYMPHOZYTEN. RECHTS CD3S (STROMALE) LYMPHOZYTEN.	52
ABBILDUNG 18: IMMUNHISTOCHEMIE VON CD3E (EPITHELIALE) LYMPHOZYTEN AUS DER TUBE ALS KONTROLLGEWEBE.	52
ABBILDUNG 19: STREUDIAGRAMME ZUR INFILTRATION VON CD3E IM OVAR VERGlichen MIT DER IM NETZ UND PERITONEUM. DIE GELBEN LINIEN TRENNEN DIE WERTE ÜBER UND UNTER DEM CUT-OFF VON 7/HPF.	54
ABBILDUNG 20: BALKENDIAGRAMM ZUR VERTEILUNG DER INFILTRATION VON CD3E IN OVAR, NETZ UND PERITONEUM. DIE BALKEN ZEIGEN WIE VIELE FÄLLE IN JEWEILS 0,1 UND 2 LOKALISATIONEN EINE INFILTRATION VON ≥ 7 CD3E/HPF	

HATTEN. ES GAB KEINE FÄLLE DIE EINE HOHE CD3E-INFILTRATION IN ALLEN DREI LOKALISATIONEN ZEIGTEN. DIE ZAHLEN ÜBER DEN BALKEN GEBEN DIE JEWEILIGEN ABSOLUT- UND PROZENTWERTE AN.....	55
ABBILDUNG 21: STREUDIAGRAMME ZUR INFILTRATION VON CD8E IM OVAR VERGlichen MIT DER IM NETZ UND PERITONEUM. DIE GELBEN LINIEN TRENNEN DIE WERTE ÜBER UND UNTER DEM CUT-OFF VON 1/HPF.	56
ABBILDUNG 22: BALKENDIAGRAMM ZUR VERTEILUNG DER INFILTRATION VON CD8E IN OVAR, NETZ UND PERITONEUM. DIE BALKEN ZEIGEN WIE VIELE FÄLLE IN JEWEILS 0, 1, 2 UND IN ALLEN LOKALISATIONEN EINE INFILTRATION VON ≥ 1 CD8E/HPF HATTEN. DIE ZAHLEN ÜBER DEN BALKEN GEBEN DIE JEWEILIGEN ABSOLUT- UND PROZENTWERTE AN....	57
ABBILDUNG 23: KAPLAN-MEIER ÜBERLEBENSKURVE FÜR DIE CA-125 EXPRESSION IM OVAR (LINKS), SOWIE IN OVAR, NETZ UND PERITONEUM (RECHTS).....	59
ABBILDUNG 24: KAPLAN-MEIER ÜBERLEBENSKURVE FÜR DIE MESOTHELIN EXPRESSION IM OVAR (LINKS), SOWIE IN OVAR, NETZ UND PERITONEUM (RECHTS).....	60
ABBILDUNG 25: KAPLAN-MEIER ÜBERLEBENSKURVE VON CD3E MIT HOHER UND NIEDRIGER LYMPHOZYTENINFILTRATION IM OVAR. DIE ROTE KURVE ZEIGT DIE FÄLLE MIT HOHER UND DIE BLAUE MIT NIEDRIGER LYMPHOZYTENINFILTRATION. MIT $p=0,003$ BESTEHT EINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ.	61
ABBILDUNG 26: KAPLAN-MEIER ÜBERLEBENSKURVE VON CA-125 IM OVAR MIT NIEDRIGER (ROT) UND HOHER (GRÜN) EXPRESSION BEI NIEDRIGER CD3E-INFILTRATION (LINKS) UND HOHER CD3E-INFILTRATION (RECHTS).....	64
ABBILDUNG 27: KAPLAN-MEIER ÜBERLEBENSKURVE VON MESOTHELIN IM OVAR MIT NIEDRIGER (ROT) UND HOHER (GRÜN) EXPRESSION BEI NIEDRIGER CD3E-INFILTRATION (LINKS) UND HOHER CD3E-INFILTRATION (RECHTS).....	66

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: WHO KLASSIFIKATION DER EPITHELIALEN OVARIALNEOPLASIEEN.	13
TABELLE 2: KLINISCHE DATEN UNSERES KOLLEKTIVS.....	31
TABELLE 3: IN DER IMMUNHISTOCHEMIE VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER.	36
TABELLE 4: HÄUFIGKEITEN VON CA-125 UND MESOTHELIN IN DEN PRIMÄRTUMOREN DES OVARS UND IN DEN METASTASEN. ST. ABWEICHUNG = STANDARDABWEICHUNG.	42
TABELLE 5: T-TEST FÜR VERBUNDENE STICHPROBEN ZUM EXPRESSIONSMUSTER VON CA-125 IN DER TUMORPERIPHERIE UND IM TUMORZENTRUM. DIE P-WERTE IM OVAR $p=0,274$ UND NETZ $p=0,086$ SAGEN AUS, DASS ES KEINEN STATISTISCH SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED IN DER EXPRESSION ZWISCHEN TUMORZENTRUM UND INFILTRATIONSFRONT GIBT.....	44
TABELLE 6: -TEST FÜR VERBUNDENE STICHPROBEN ZUM EXPRESSIONSMUSTER VON MESOTHELIN IN DER TUMORPERIPHERIE UND IM TUMORZENTRUM. DER P-WERT SAGT AUS, DASS ES KEINEN STATISTISCH SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED IN DER EXPRESSION ZWISCHEN TUMORZENTRUM UND INFILTRATIONSFRONT IM NETZ GIBT.	44
TABELLE 7: KREUZTABELLE ZUR DARSTELLUNG DER ABSOLUT- UND PROZENTZAHL DER FÄLLE IN OVAR UND NETZ, SOWIE OVAR UND PERITONEUM, WELCHE ALS PUNKTE PRO GELBEM QUADRAT IN DEN OBIGEN STREUDIAGRAMMEN DARGESTELLT SIND. GEZEIGT WERDEN DIE FÄLLE DER CA-125 EXPRESSION ÜBER ODER UNTER DEM CUT-OFF VON IRS 4.....	46
TABELLE 8: T-TEST FÜR VERBUNDENE STICHPROBEN ZUM EXPRESSIONSMUSTER VON CA-125 IM OVAR, NETZ, PERITONEUM UND LYMPHKNOTEN. DER VERGLEICH VON OVAR UND PERITONEUM ($p=0,000$) ZEIGT EINEN STATISTISCH SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED IN DER EXPRESSION. DER VERGLEICH VON OVAR UND NETZ ($p=0,087$), SOWIE OVAR UND LYMPHKNOTEN ($p=0,072$) ZEIGT KEINEN UNTERSCHIED.....	47
TABELLE 9: KREUZTABELLE ZUR DARSTELLUNG DER ABSOLUT- UND PROZENTZAHL DER FÄLLE IN OVAR UND NETZ, SOWIE OVAR UND PERITONEUM, WELCHE ALS PUNKTE PRO GELBEM QUADRAT IN DEN OBIGEN STREUDIAGRAMMEN DARGESTELLT SIND. GEZEIGT WERDEN DIE FÄLLE DER MESOTHELINEXPRESSON ÜBER ODER UNTER DEM CUT-OFF IRS 6.....	49
TABELLE 10: T-TEST FÜR VERBUNDENE STICHPROBEN ZUM EXPRESSIONSMUSTER VON MESOTHELIN IM OVAR, NETZ, PERITONEUM UND LYMPHKNOTEN. DER VERGLEICH VON OVAR UND NETZ ($p=0,039$) ZEIGT EINEN STATISTISCH SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED IN DER EXPRESSION. DIE EXPRESSION IN OVAR UND PERITONEUM ($p=0,399$), SOWIE OVAR UND LYMPHKNOTEN ($p=0,197$) ZEIGT KEINEN UNTERSCHIED.....	50
TABELLE 11: VERTEILUNG DER VERSCHIEDENEN LYMPHOZYPENPOPULATIONEN IN OVAR, NETZ UND PERITONEUM. CD3E: EPITHELIALE CD3-LYMPHOZYPEN. CD3S: STROMALE CD3-LYMPHOZYPEN. CD8E: EPITHELIALE CD8-LYMPHOZYPEN. CD8S: STROMALE CD8-LYMPHOZYPEN.	53
TABELLE 12: KREUZTABELLE ZUR DARSTELLUNG DER ABSOLUT- UND PROZENTZAHL DER FÄLLE IN OVAR UND NETZ, SOWIE OVAR UND PERITONEUM, WELCHE ALS PUNKTE PRO GELBEM QUADRAT IN DEN OBIGEN STREUDIAGRAMMEN DARGESTELLT SIND. GEZEIGT WERDEN DIE FÄLLE DER INFILTRATION VON CD3E LYMPHOZYPEN WELCHE ÜBER ODER UNTER DEM CUT-OFF 7/HPF WAREN.	55
TABELLE 13: T-TEST FÜR VERBUNDENE STICHPROBEN ZUR HETEROGENITÄT DER INFILTRATION VON CD3E LYMPHOZYPEN IN DEN PRIMÄRTUMOREN DES OVARS UND DEN METASTASEN IN NETZ UND PERITONEUM.	55
TABELLE 14: KREUZTABELLE ZUR DARSTELLUNG DER ABSOLUT- UND PROZENTZAHL DER FÄLLE IN OVAR UND NETZ, SOWIE OVAR UND PERITONEUM, WELCHE ALS PUNKTE PRO GELBEM QUADRAT IN DEN OBIGEN STREUDIAGRAMMEN DARGESTELLT SIND. GEZEIGT WERDEN DIE FÄLLE DER INFILTRATION VON CD8E LYMPHOZYPEN WELCHE ÜBER ODER UNTER DEM CUT-OFF 1/HPF WAREN.	57
TABELLE 15: HOMOGENITÄT DER INFILTRATION CD8E-POSITIVER LYMPHOZYPEN IN DEN PRIMÄRTUMOREN DES OVARS UND DEN METASTASEN IN NETZ UND PERITONEUM. T-TEST FÜR VERBUNDENE STICHPROBEN.....	57
TABELLE 16: ÜBERLEBENSTABELLE NACH KAPLAN MEIER BEI HOHER UND NIEDRIGER LYMPHOZYPENINFILTRATION IN OVAR, NETZ UND PERITONEUM. MED. ÜBERL. = MEDIANES ÜBERLEBEN; SIG. LR = SIGNIFIKANZ LOG RANK; 5, 10 JAHRE = ÜBERLEBEN ZU DIESEM ZEITPUNKT.	62
TABELLE 17: ÜBERLEBENSTABELLE NACH CA-125-EXPRESSION UND CD3E-INFILTRATION IM OVAR. MED. ÜBERL. = MEDIANES ÜBERLEBEN; SIG. LR = SIGNIFIKANZ LOG RANK; 5, 10 JAHRE = ÜBERLEBEN ZU DIESEM ZEITPUNKT.	64
TABELLE 18: ÜBERLEBENSTABELLE NACH MESOTHELIN-EXPRESSION UND CD3E-INFILTRATION. MED. ÜBERL. = MEDIANES ÜBERLEBEN; SIG. LR = SIGNIFIKANZ LOG RANK; 5, 10 JAHRE = ÜBERLEBEN ZU DIESEM ZEITPUNKT.....	65
TABELLE A 1: EINTEILUNG DER OVARIALKARZINOME NACH TNM- UND FIGO-STADIEN (PRAT, 2014).	91

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie, geographische Distribution, Inzidenz und Mortalität des Ovarialkarzinoms

Pro Jahr erkranken in Deutschland etwa 9 600 Frauen an einem malignen Ovarialtumor. 5 500 Frauen sterben pro Jahr an einem Ovarialkarzinom (Batzler et al., 2008, Burges and Schmalfeldt, 2011).

Somit ist das Ovarialkarzinom in Deutschland nach dem Mamma-, kolorektalen, Lungen- und Endometriumkarzinom (Burges and Schmalfeldt, 2011) der fünfthäufigste maligne Tumor der Frau (Kurman et al., 2011) und steht an fünfter Stelle der durch Krebserkrankungen verursachten Todesfälle (Schüler et al., 2013, Siegel et al., 2014).

Von den gynäkologischen Tumoren ist das Uteruskarzinom das häufigste, an zweiter Stelle kommt das Ovarialkarzinom, gefolgt vom Zervixkarzinom. Dabei besitzt das Ovarialkarzinom unter den gynäkologischen Tumoren die höchste Letalitätsrate (Tumorregister München).

Die Inzidenz des Ovarialkarzinoms unterliegt einer auffälligen geographischen Distribution, wobei Migrationsstudien gezeigt haben, dass sich die Inzidenzen an den Ort der Immigration anpassen und nicht vom Ort der Emigration beeinflusst werden, sodass man auf den Einfluss von Umweltfaktoren schließen kann (Kurman et al., 2011). Im Durchschnitt aller Länder liegt die Inzidenz des Ovarialkarzinoms bei 6,1 Neuerkrankungen/100 000 Einwohnern. Dabei variieren die Inzidenzen pro 100 000 Einwohnern sehr stark von z.B. 0,8 in Comoros, Ostafrika bis 14,2 in Latvia, Nordeuropa (International Agency for Research on Cancer, 2014). Die geographische Variation lässt sich unter anderem durch die Ovulationstheorie erklären, welche besagt, dass das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, abhängig ist von der Häufigkeit der Ovulationen (Fathalla, 1971). Diese würden regelmäßig das Ovarialepithel schädigen, welches zu wiederholten Reparaturvorgängen und

Zellproliferationen führen und somit maligne Entartung fördern könne (Fathalla, 1971). Im Horizont dieser Theorie verringern orale Kontrazeptiva (Havrilesky et al., 2013), Multiparität (Hinkula et al., 2006) und Laktation (Leeper et al., 2002) die Wahrscheinlichkeit an einem Ovarialkarzinom zu erkranken.

In Deutschland liegt das mittlere Erkrankungsalter am Ovarialkarzinom bei 69 Jahren und die relative Fünfjahresüberlebensrate bei etwa 42%, da über 75% der Neuerkrankungen erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt werden (FIGO III und IV) (Siehe FIGO-Klassifikation für das Ovarialkarzinom im Anhang) (Karst and Drapkin, 2010).

Bei dieser Erkrankung spielt Früherkennung eine besonders wichtige Rolle, da die Prognose sehr stark vom Initialstadium und dem Alter zum Diagnosezeitpunkt abhängt. So beträgt die Wahrscheinlichkeit des Fünfjahresüberlebens bei einem „frühen“ Ovarialkarzinom, also einer auf das Becken beschränkten Erkrankung (FIGO-Stadium I bis IIA) im Stadium IA 89,6%, im Stadium IIA schon nur 70,7%. Beim fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (FIGO-Stadium IIB bis IV) liegt die Überlebensrate nach 5 Jahren im Stadium IIIA bei 46,7%, im Stadium IV nur noch bei 18,6% (Heintz et al., 2006). Der zweite bedeutsame Faktor in der Früherkennung dieser Erkrankung ist das jeweilige Alter zum Diagnosezeitpunkt. So zeigt sich bei einem Alter von 15-29 Jahren eine relative Fünfjahresüberlebensrate von 81,5%, während sie bei einem Alter von 70-79 Jahren bei 33,3% und bei über 80-Jährigen bei lediglich 23% liegt (Heintz et al., 2006).

1.2 Screening, Therapie und Staging des Ovarialkarzinoms

Die im vorangegangenen Kapitel angedeutete hohe Bedeutung der Früherkennung einer Ovarialkarzinomerkrankung geht jedoch mit besonderen Schwierigkeiten einher.

Doch warum ist die Früherkennung so schwierig? Welche Frühsymptome gibt es?

Dies liegt unter anderem an der anatomischen Lage der Ovarien, welche die präzise Einordnung von Frühsymptomen nicht begünstigt, dass sogar nach signifikanter Größenzunahme, gastrointestinale Beschwerden in Form von Blähgefühl oder Übelkeit die einzigen und unspezifischen Frühsymptome darstellen (Karst and Drapkin, 2010). Ein weiterer Faktor ist das Fehlen von verlässlichen Screening Methoden. CA-125 Serumwertkontrollen und transvaginaler Ultraschall bei asymptomatischen Frauen oder sogar in Risikogruppen hat nicht zu einer Erhöhung der Krebsfrüherkennung geführt (Reade et al., 2013), da diese Methoden viele falsch-positive Ergebnisse liefern. Schon seit 1975 gilt die möglichst radikale Tumoresektion als der wichtigste unabhängige Prognosefaktor in der Therapie des Ovarialkarzinoms (Griffiths, 1975, Wimberger et al., 2010). Deshalb wird nach den S3-Leitlinien zur Therapie des Ovarialkarzinoms eine en-bloc Tumoresektion mit Längsschnitllaparatomie, Adnexextirpation beidseits, Hysterektomie, Omentektomie, Appendektomie (bei muzinösem/unklarem Tumortyp) und beidseitiger pelviner und paraaortaler Lymphonodektomie angestrebt. Bei fortgeschrittenem Stadium kommen auch multiviszzerale Resektionen zum Einsatz, obwohl eine Komplettresektion dann oft unmöglich ist. Neben der Zytoreduktion, ist die Operation ebenfalls essentiell, um die Diagnose histologisch zu sichern und um das prognose- und therapiebestimmende Staging zu gewährleisten (Coleman et al., 2013, Bristow et al., 2002). Zum operativen Staging gehört die Inspektion der gesamten Abdominalhöhle, Biopsieentnahmen aus allen auffälligen Arealen, sowie aus unauffälligen Peritonealregionen und außerdem eine Peritonealzytologie und histologische Aufarbeitung des En-Bloc Resektats (Kommission Ovar A.G.O e.V., 2013).

Als postoperative systemische Therapie erhalten die Patientinnen mit frühem Ovarialkarzinom eine Chemotherapie mit Carboplatin über 6 Zyklen, ab Stadium IIb-IV ergänzend dazu Paclitaxel und bei Bedarf zusätzlich den Anti-VEGF monoklonalen Antikörper Bevacizumab als Angiogenesehemmer (Kommission Ovar A.G.O e.V., 2013, Coleman et al., 2013).

Obwohl sich die Therapie des Ovarialkarzinoms in den letzten 20 Jahren kontinuierlich weiterentwickelt hat, mit besseren chirurgischen Techniken (Chi et al., 2009, Earle et al., 2006), dem Verzicht auf Radiotherapie, die keine

Vorteile bringt (Gronroos et al., 1984) und besseren Kombinationen und Dosierungen von Chemotherapeutika (McGuire et al., 1989, Piccart et al., 2000, Coleman et al., 2013) sind das Langzeitüberleben und die Rezidivhäufigkeit trotzdem relativ stabil geblieben (Pothuri and Herzog, 2006). Bis 1988 bspw. betrug die Zehnjahresüberlebensrate 32,2%, wobei sie in den 10 Jahren danach lediglich auf 34,4% anstieg (Engel et al., 2002).

1.3 FIGO-Klassifikation und Metastasierungswege

Zur Stadieneinteilung gynäkologischer Tumoren hat sich die FIGO-Klassifikation, basierend auf einem klinischen Staging, etabliert. Wobei diese Stadien beim Ovarialkarzinom praktisch dem T-Wert der TNM-Klassifikation, nach chirurgischen und pathologischen Kriterien, entsprechen (Siehe Abbildung 1).

Die gynäkologischen Tumore werden in der FIGO-Klassifikation nach dem folgenden Schema eingeteilt:

0 = Carcinoma in Situ

I = Tumor auf das Ausgangsorgan begrenzt

II = Tumor auf das angrenzende Gewebe ausgedehnt

III = Ausdehnung bis zum nächsten Organ

IV = Einbruch in angrenzendes Organ, Fernmetastasen

Für die jeweiligen Stadien besteht noch eine genauere Untergliederung (Siehe FIGO-Klassifikation im Anhang).

Das Ovarialkarzinom kann sich durch Exfoliation maligner Zellen auf die Nachbarorgane und in die Peritonealhöhle ausbreiten, häufig ist auch das kontralaterale Ovar mitbefallen. Lymphogen metastasiert es in pelvine und paraaortale Lymphknoten. Über den hämatogenen Metastasierungsweg können Fernmetastasen entstehen, bevorzugt in Leber und Lunge.

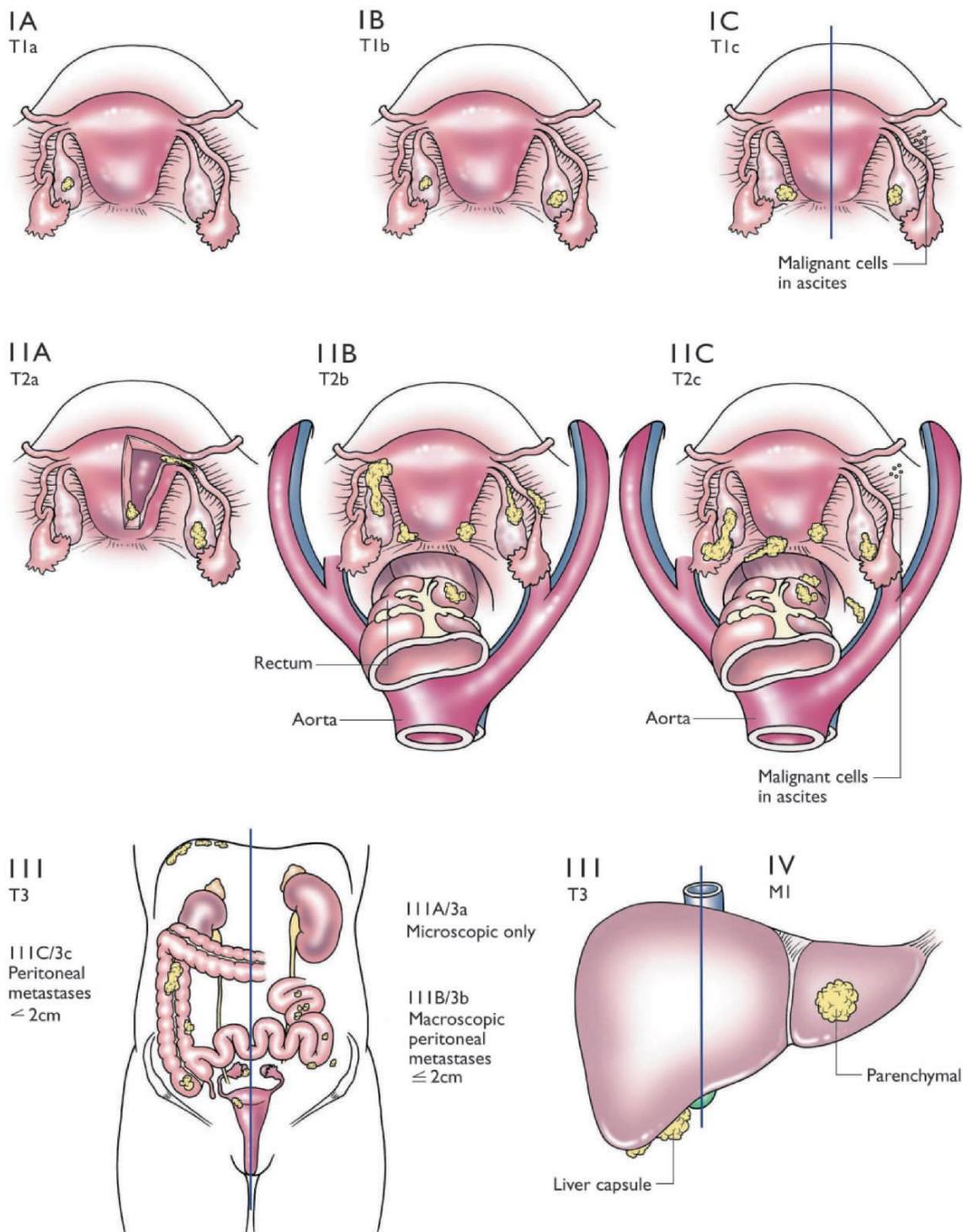


Abbildung 1: Primärtumor und Metastasen des Ovarialkarzinoms mit Darstellung der FIGO-Stadien aus „Carcinoma of the Ovary“ (Heintz et al., 2006).

1.4 Einteilung der Ovarialneoplasien

Bei den Neoplasien des Ovars kann man nicht von einer einheitlichen Erkrankung sprechen, eher von sehr heterogenen völlig unterschiedlichen Malignomen, welche das Ovar betreffen.

Eine Grundlegende Eigenschaft all dieser Tumoren sind ihre benignen, borderline- und malignen Dignitäten. Typisch für die benigne Dignität ist das nicht-invasive, eher verdrängend-langsame Wachstum, bei der Übergangsform der borderline Dignität liegen zwar Zell- und Gewebsatypien vor, aber ein invasives Wachstum, welches für die maligne Dignität typisch ist, kann nicht nachgewiesen werden.

Die WHO hat die Malignome des Ovars daher erstmals nach ihrem Ursprungsgewebe eingeteilt (Siehe Abbildung 2):

- Aus dem Müller-Oberflächenepithel entstehen die epithelialen Tumore (60-70%).
- Aus den Keimzellen entstehen die Keimzelltumore (15-20%).
- Aus dem gonadal- oder sexuell-differenziertem Stroma (Granulosa- und Theka-Zellen) entstehen die Keimstrang-Stroma Tumore (5-10%).
- Aus anderen Organen und Geweben können sekundär Metastasen im Ovar entstehen (5%).

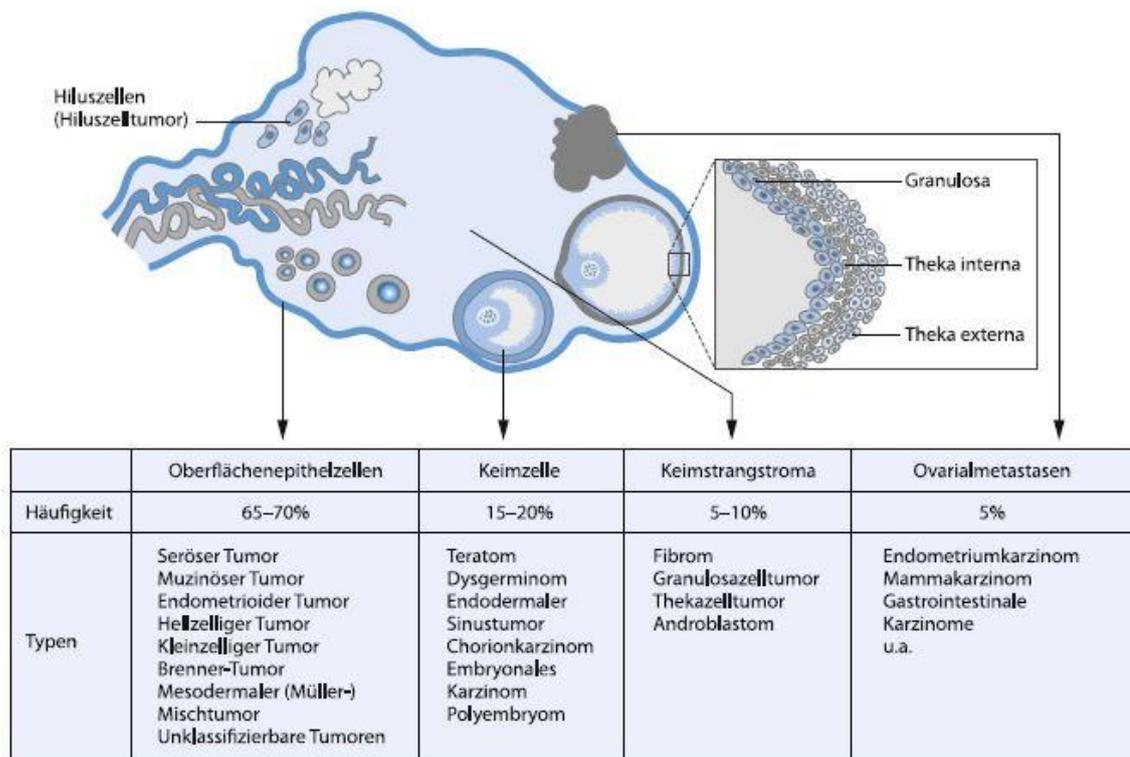


Abbildung 2: Einteilung der Ovarialneoplasien anhand ihres histologischen Ursprungs aus „Gynäkologie“ (Kast et al., 2013).

Die häufigste Gruppe mit 60-70% und der höchsten Letalitätsrate sind die epithelialen Tumoren. Sie machen 40% aller benignen und fast 90% aller malignen Ovarialtumoren aus.

Obwohl diese Gruppe scheinbar alle von derselben Ursprungszelle ausgehen, nämlich einer einschichtigen, das Ovar umgebenden Mesothelzellschicht, sprechen wir auch hier von sehr heterogenen Erkrankungen.

Die WHO hat diese Gruppe deshalb weiter differenziert nach den unterschiedlichen Zellmorphologien des sekundären Müller-Systems (Siehe Tabelle 1) (Staebler and Diebold, 2007, Kurman et al., 2011).

Die häufigste Entität der epithelialen Neoplasien, sind die serösen Tumore mit einem Anteil von ca. 67% (Kurman et al., 2011). Darunter fällt, als benigne Form das seröse Zystadenom, als Übergangsform der seröse Borderline Tumor und als maligne Form das seröse Ovarialkarzinom. Letztgenanntes beschreibt den, für diese Arbeit, grundlegenden Tumortyp.

Die Endometrioiden Tumore haben einen Anteil von 7,5%, die muzinösen 4% und die klarzelligen Tumore einen Anteil von 8,5% an den epithelialen Neoplasien.

Eine weitere Auffälligkeit dieser Neoplasien ist, dass die serösen Tumore morphologisch dem Tubenepithel, die endometrioiden Tumore den Endometriumsdrüsen und die muzinösen Tumore dem endozervikalen Epithel ähneln (Siehe Abbildung 3) (Dubeau, 1999).

Tabelle 1: WHO Klassifikation der epithelialen Ovarialneoplasien.

Seröse Tumore low-grade
<ul style="list-style-type: none"> - Seröses Zystadenom - Seröser borderline Tumor - Low-grade seröses Adenokarzinom
Seröse Tumore high-grade
<ul style="list-style-type: none"> - Seröses tubares intraepitheliales Karzinom (STIC) - High-grade seröses Karzinom von Tube, Ovar oder Peritoneum
Muzinöse Tumore
<ul style="list-style-type: none"> - Muzinöses Zystadenom - Muzinöser Borderline Tumor - Muzinöses Adenokarzinom
Endometrioiden Tumore
<ul style="list-style-type: none"> - Endometrioides Zystadenom - Endometrioider Borderline Tumor - Endometrioides Adenokarzinom
Klarzelltumore
<ul style="list-style-type: none"> - Klarzelliges Adenofibrom, Zystadenom - Klarzelliger Borderline Tumor - Klarzelliges Adenokarzinom
Transitionalzelltumore

<ul style="list-style-type: none"> - Brenner Tumor - Borderline Brenner Tumor - Maligner Brenner Tumor
Gemischt epitheliale Tumore
<ul style="list-style-type: none"> - Benigne - Borderline - Maligne
Undifferenziertes Karzinom

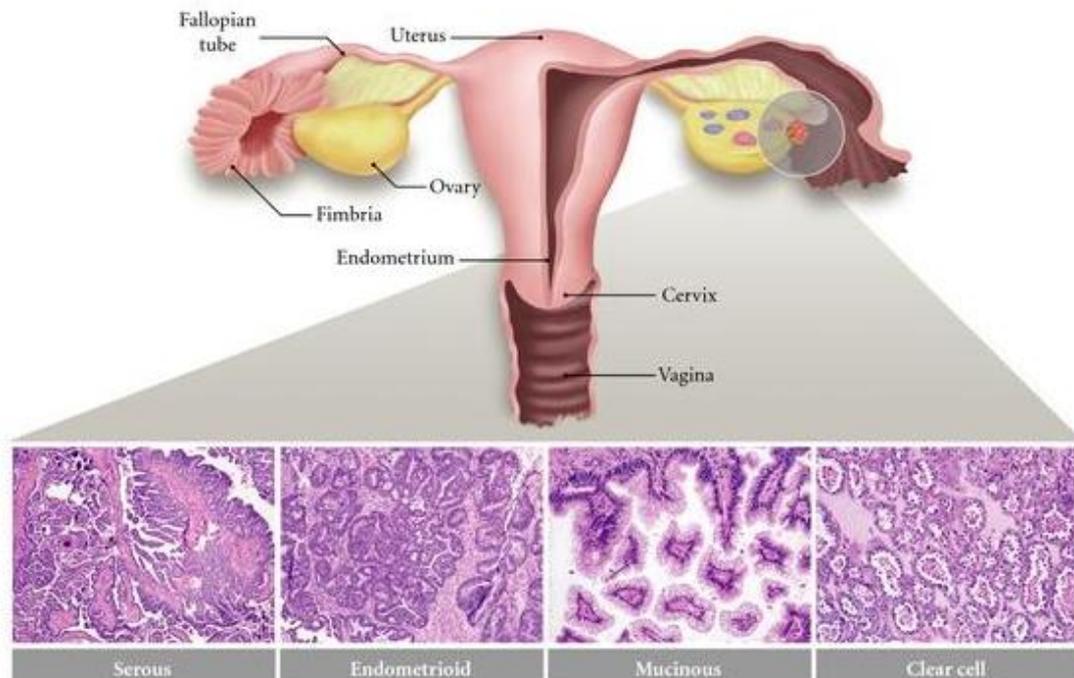


Abbildung 3: Die wichtigsten histologischen Subtypen der epithelialen Ovarialkarzinome. Das seröse Karzinom ähnelt dem Tubenepithel, das endometrioides Karzinom den Endometriumsdrüsen und das muzinöse Karzinom dem endozervikalen Epithel aus „Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution“ (Karst and Drapkin, 2010).

Warum sehen diese Malignome Gewebe des Müllerschen-Systems ähnlich, obwohl das Ovar gar nicht aus dem Müllergang entsteht? Das Oberflächenepithel des Ovars geht über in das Mesothel welches die anderen Bauch- und Beckenorgane überzieht, warum sehen die Malignome deshalb nicht eher den Mesotheliomen ähnlich? (Dubeau, 1999)

Häufig werden Karzinome im Peritoneum und in der Tube gefunden, welche histopathologisch als epitheliale Ovarialkarzinome klassifiziert werden, ohne dass ein Primärtumor im Ovar nachzuweisen ist. Bisher wurde auf eine De Novo Entstehung spekuliert.

Diese morphologischen Beobachtungen und die sehr unterschiedliche klinische Manifestation, werfen viele Fragen hinsichtlich der Karzinogenese auf, vor allem wenn diese heterogenen Erkrankungen vermeintlich nur aus einer Zelllinie entstehen sollen.

1.5 Entstehungstheorien von epithelialen Ovarialneoplasien

1.5.1 Inklusionszysten aus dem Oberflächenepithel des Ovars.

Die herkömmliche Theorie zur Entstehung der epithelialen Tumore des Ovars, geht von einem gemeinsamen Ursprung aus dem Oberflächenepithel aus, mit einer schrittweisen Karzinogenese, ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom (Hermanek, 1989). Durch ständige Ovulationen hervorgerufene Verletzungen und Reparaturvorgänge des Oberflächenepithels werden die Zellen zur Proliferation angeregt und wiederholt entzündlichen Zytokinen, sowie reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt (Fathalla, 1971). Dadurch können DNA-Schäden entstehen (Murdoch and Martinchick, 2004). Weiterhin kommt es mit zunehmendem Alter gehäuft zu Invaginationen des Epithels, und letztendlich zu sogenannten Inklusionszysten (Karst and Drapkin, 2010, Scully, 1995). Diese werden nun in dem hormonreichen Milieu des Ovars zunehmend zur Metaplasie und Proliferation angeregt, sodass Müller-ähnliche Differenzierungen aus dem ursprünglichen Mesothel entstehen können (Resta et al., 1993).

Diese Theorie geht einher mit epidemiologischen Beobachtungen der Ovulationstheorie und kann auch die Entstehung von differenzierten Müller-charakteristischen low-grade Karzinomen des Ovars erklären.

Allerdings beobachtet man sehr selten, dass diese Malignome zu high-grade Karzinomen übergehen. Die Entstehung von extraovariellen Peritonealkarzinomen, deren Ursprung histologisch dem Ovar zuzuordnen sind, können genauso wenig erklärt werden.

1.5.2 Das dualistische Modell

In diesem Modell werden die epithelialen Tumore des Ovars nach ihrer Entstehung in zwei große Kategorien eingeteilt, dem Typ 1- und Typ 2 Tumor (Staebler and Diebold, 2007, Kurman and Shih le, 2010, Meinhold-Heerlein et al., 2011, Diebold, 2014, Malpica et al., 2004, Shih and Kurman, 2004).

Typ 1 Tumore sind low-grade und entstehen schrittweise aus Vorgänger-Läsionen, ähnlich der Theorie der Inklusionszysten. Der Prototyp dieser Kategorie ist, aufgrund der Häufigkeit, das seröse Karzinom vom low-grade- und borderline-Typ. Weitere Tumore sind die muzinösen Tumore, die endometrioiden Tumore, die Brenner Tumore sowie die Klarzelltumore. Sie weisen bestimmte molekulare Veränderungen auf, welche in den Typ 2 Tumoren nicht gefunden werden; BRAF- und KRAS-Mutationen in serösen Karzinomen, KRAS-Mutationen in muzinösen Tumoren und β -Catenin-, PTEN-Mutationen sowie Mikrosatelliteninstabilität in endometrioiden Tumoren (Shih and Kurman, 2004). Diese Tumore weisen einen längeren Krankheitsverlauf und bessere Prognose auf, als die der Typ 2 Tumore.

Der Prototyp der Typ 2 Tumore ist, ebenfalls aufgrund der Häufigkeit, das high-grade seröse Karzinom (HGSC), ein weiteres das undifferenzierte Karzinom. Charakteristisch sind Mutationen im Tumorsuppressorgen 53 (TP53) in 50-80% und Genamplifikation im HER2/neu Onkogen in 10-20% der Fälle, sowie chromosomale Instabilität (Kurman and Shih le, 2010, Meinhold-Heerlein et al., 2011, Staebler and Diebold, 2007, Diebold, 2014, Shih and Kurman, 2004). Diese Tumore haben eine rasche Krankheitsprogredienz und eine schlechte Prognose.

Diese Theorie erklärt das Vorhandensein dieser zwei klinischen Ausprägungen und ging zunächst bei den Typ 2 Karzinomen von einer Entstehung de novo aus, da keine Vorläuferläsionen im Ovar bisher gefunden werden konnten (Shih and Kurman, 2004).

1.5.3 Vorläuferläsionen aus den Fimbrien der Tube

Nach der Entdeckung der BRCA-Keimbahn-Mutation (Breast Cancer Antigen), ein familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom-Syndrom, welches für ca. 11-15% der Ovarialkarzinome ursächlich ist, wurden zahlreiche prophylaktische Oophorektomien auf okkulte Tumormanifestationen untersucht (Karst and Drapkin, 2010). Hier wurde eine hohe Inzidenz, ca. 50%, von Tubenepitheldysplasien festgestellt (Piek et al., 2001).

Die beiden Gene BRCA1 (auf Chromosom 17) und BRCA2 (auf Chromosom 13) sind Zellreifungs-, DNA-Reparatur- und Tumorsuppressorgene welche, mit loss-of-function Mutationen in der Keimbahn, Karzinogenese nicht mehr adäquat verhindern können. Diese Mutation geht mit einem 15-40% Lebenszeitrisiko eines Ovarialkarzinoms, einher (Kast et al., 2013)

Das Tubenepithel besteht aus zwei Zelltypen, sekretorische und Zilien-tragende Zellen. Piek et al. haben beobachtet, dass die dysplastischen Regionen eine Entwicklung zum sekretorischen Phänotyp und Verlust der Zilien-tragenden Zellen zeigten (Piek et al., 2001, Karst and Drapkin, 2010). Diese Neoplasien der sekretorischen Zellen, weisen eine Mutation in p53 aber ohne Proliferationsaktivität auf, die sogenannte p53-Signatur (Staebler, 2011, Gross et al., 2010).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass Frauen mit BRCA-Mutation am häufigsten seröse tubare intraepitheliale Karzinome (STIC) in den Fimbrien der Tuben aufweisen, keine jedoch in den Ovarien (Medeiros et al., 2006).

Vorläufer dieser STIC-Läsionen sind vermutlich die Tubendysplasien mit p53-Signatur (Staebler, 2011, Gross et al., 2010).

Auch bei serösen Ovarialkarzinomen von Frauen ohne BRCA-Keimbahnmutation wurde das Vorhandensein von STIC-Läsionen dokumentiert (Kindelberger et al., 2007).

Als erster Schritt in der Entwicklung von der p53-Signatur zum serösen Karzinom, wird eine erhöhte Proliferation beobachtet, die „proliferierende p53-Signatur“ (Staebler, 2011).

Durch den Verlust von p53, dem „Wächter des Genoms“ und daraufhin z.B. ovulatorisch-bedingten Entzündungsprozessen im Mikromilieu der Fimbrien, kann es zu weiteren genetischen „Hits“ mit dann fehlender DNA-Reparatur kommen und somit die Entstehung von STIC-Läsionen verursachen (Karst and Drapkin, 2010, Salvador et al., 2008, Erickson et al., 2013). Die Nähe zum Ovar während den Ovulationen ermöglicht die Übersiedlung dieser Neoplasien zu den Ovarien oder zum Peritoneum, welches wiederum die Pathogenese der Peritonealkarzinose ohne Primärtumor im Ovar erklärt (Carlson et al., 2008, Kindelberger et al., 2007).

Da wir nun wissen wie Vielfältig die Erkrankung „Eierstockkrebs“ sein kann, stellt sich die Frage wie sinnvoll es ist für diese heterogene Gruppe nur eine standardisierte Therapie zu haben. Momentan beschäftigen sich daher viele Arbeitsgruppen mit der Suche nach spezifischeren, personalisierten Tumortherapien.

Hierfür eignet sich insbesondere die Immuntherapie. Dafür müssen wir aber zuerst mehr über den Schnittpunkt zwischen Tumorbilogie und Immunsystem erfahren.

1.6. Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes System aus zellulären und nicht-zellulären Bestandteilen, welches der Abwehr von Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren

und Pilzen, dient und außerdem auf maligne-gewordene körpereigene Zellen reagieren kann (Schmidt, 2013).

Um die Unversehrtheit des Körpers gegenüber äußeren Einflüssen, sowie pathologischen inneren Veränderungen, zu bewahren, besitzen selbst einfache Organismen ein Abwehrsystem, die angeborene oder unspezifische Immunantwort. Dieser Schutz entwickelte sich schon sehr früh in der Evolution und besteht aus physiologischen Barrieren wie Epithelien, zellvermittelte Abwehr durch dendritische Zellen, Makrophagen, natürliche Killerzellen und Granulozyten, sowie durch allgemein entzündliche Reaktionen und dem Komplementsystem (Ute et al., 2009). Diese durch Erbinformation angelegte Reaktion ist unspezifisch, lebenslang festgelegt und läuft innerhalb von Minuten ab.

Zeitgleich wandern aktivierte dendritische Zellen in regionale Lymphknoten und reifen zu Antigen-präsentierenden Zellen, um Zellen der adaptiven, oder spezifischen, Immunantwort zu aktivieren (Gatti and Pierre, 2003).

Die adaptive Immunantwort, eine bei Wirbeltieren weiterentwickelte, anpassungsfähige und spezifische Form der Abwehr mit immunologischem Gedächtnis, besteht hauptsächlich aus zwei Zelltypen: Den B- und T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten sind für die humorale Immunabwehr verantwortlich, indem sie sich zu Plasmazellen weiterentwickeln, Antigen-spezifische Antikörper bilden und somit zur Opsonierung von Antigenen beitragen (Miller, 2017).

Auf die T-Lymphozyten wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

1.6.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten wandern unablässig durch den Körper und überwachen die Zusammensetzung der Peptide auf der Membran körpereigener Zellen auf pathologische Veränderungen. Jede T-Zelle kann mit ihrem T-Zell-Rezeptor und weiteren Co-Rezeptoren ein spezifisches Antigen erkennen (Schlüssel-Schloss-Prinzip) (Miller, 2017). Im Gegensatz zu B-Lymphozyten benötigen T-

Lymphozyten jedoch die Präsentation über das MHC-System (major histocompatibility complex), unterliegen also der sogenannten MHC-Restriktion (Kamradt and Ferrari-Kühne, 2011). MHC I Proteinkomplexe befinden sich auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des Körpers und präsentieren die intrazellulären Proteine des Zytosols. MHC II Proteinkomplexe befinden sich auf Antigen-präsentierenden Zellen und präsentieren extrazelluläre Peptide, welche durch Endo- oder Phagozytose aufgenommen worden sind (Kamradt and Ferrari-Kühne, 2011).

Je nach Art des T-Lymphozyts kommt es nach Aktivierung mit dem passenden Antigen zu einer unterschiedlichen Reaktion (Weinzierl, 2008). Zytotoxische T-Zellen, mit dem Co-Rezeptor CD8, erkennen Peptide welche auf MHC I präsentiert werden und lysieren entartete Zellen. Liganden auf MHC II-Molekülen werden von T-Lymphozyten mit dem Co-Rezeptor CD4 erkannt. Dieser ist charakteristisch für T-Helfer-Zellen, welche durch Zytokinproduktion weitere Immunzellen anlocken und regulatorische T-Zellen, welche eine überschießende Immunreaktion verhindern (Miller, 2017).

Im Falle der Progression einer Neoplasie im Körper, kann das adaptive Immunsystem dieser Entwicklung durch unterschiedliche Mechanismen entgegensteuern.

1.6.2 Natürliche Reaktionen auf Kanzerogenese

Durch die ständige Kontrolle und Zerstörung von fehlerhaft-funktionierenden, körpereigenen Zellen, versucht der Körper Kanzerogenese zu verhindern (Robbins and Kawakami, 1996). Kommt es doch zu einer Neoplasie, können Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten (TILs) Tumorzellen direkt zur Apoptose anregen oder Zytokine wie Interferon-Gamma produzieren, welche die Tumor-Angiogenese und -Proliferation hemmen und somit zur Tumorregression führen (Weinzierl, 2008).

An einigen Karzinomtypen, unter anderem dem HGSC, wurde gezeigt, welche erhebliche prognostische Relevanz TILs haben (Hwang et al., 2012, Milne et al., 2012, Fridman et al., 2012) und dass eine hohe Anzahl von TILs im HGSC mit einem deutlich verbesserten Overall Survival assoziiert ist (Adams et al., 2009, Hwang et al., 2012, Clarke et al., 2009, Webb et al., 2014, Sato et al., 2005, Kandalaft et al., 2011). Dabei scheinen vor allem die T-Lymphozyten eine Rolle zu spielen, welche das Tumorepithel infiltrieren (Hwang et al., 2012, Zhang et al., 2003). Dabei spielt es prognostisch eine Rolle, welche Lymphozyten erhöht sind. Bei bspw. hoher Infiltration von intraepithelialen CD3+ und CD103+ verbessert sich das Überleben von 0% bei kombinierter niedriger auf 90% bei kombinierter hoher Infiltration (Bösmüller et al., 2016). Mittlerweile wird sogar von einer „Immune Contexture“ eines Tumors gesprochen. Genauer gesagt, die Anzahl, die Zellart und der Ort von Immunzellinfiltraten, welches eine wesentliche Rolle zum Overall- und Disease free Survival beiträgt (Galon et al., 2007, Fridman et al., 2012). Diese Beobachtung wurde erstmals am kolorektalen Karzinom und später an vielen anderen Krebserkrankungen, unter anderem dem Ovarialkarzinom, beschrieben (Pages et al., 2010, Ascierto et al., 2011). Arbeiten von Galon et al. zum kolorektalen Karzinom zeigten, dass vor allem die Verwendung eines „Immunoscores“ eine genauere prognostische Aussagekraft bieten könnte als die bisher geläufige TNM-Klassifikation (Galon et al., 2012b, Galon et al., 2012a). Dabei werden einmal im „invasive margin“ (IM) und im „center of Tumor“ (CT) zwei Lymphozytenpopulationen (CD8+, CD3+ oder CD45RO+) ausgezählt und in einem Score von „I0“ bis „I4“ eingeteilt. Durch diese Einteilung werden die Patienten, welche eine stärkere Therapie bräuchten als sie es mit der TNM Klassifikation bekämen, aufgedeckt, und somit die Fälle von Tumorprogression vermindert.

Während der Progression von malignen Tumorerkrankungen sind Tumorzellen extrinsischem Stress in Form von Sauerstoffmangel, Nährstoffmangel und Angriffen des Immunsystems ausgesetzt (Cui, 2016). Diesem Selektionsdruck können nur die Tumorzellen standhalten, welche angepasste Signalwege eingeschaltet haben, beispielsweise zur verstärkten Angiogenese oder Abschwächung der Immunantwort. Bei schnell-wachsenden Tumoren sorgt der

enorme Zellumsatz für genügend Mutationen um sich diesen Gegebenheiten anzupassen.

Tumorzellen können demnach Immune-escape Fähigkeiten besitzen, wie beispielsweise, der Expression von PD-Ls (Ligand for programmed cell death)., sodass TILs, wenn sie an diese andocken, zur Apoptose angeregt werden (Hamanishi et al., 2007).

Weiterhin kann das Mikromilieu bestimmter Tumoren die Immunantwort supprimieren, indem immunsuppressive Chemokine wie TGF-, IL-10, VEGF und IL-6 produziert werden (Yigit et al., 2010), sodass der Körper seine Fähigkeit zur Erkennung und Abwehr entarteter Zellen verlieren kann.

Tumorzellen können außerdem, bspw. durch Herunterregulierung des Transporter TAP1/2 (Transporter associated with Antigen processing) welcher die MHC I-Moleküle mit Antigenen belädt, „inkognito“ wachsen (Weinzierl, 2008). Daher sind zum einen die Tumorummunantwort und zum anderen die Tumorantigene, welche von Tumorzellen präsentiert werden, wichtige Faktoren für eine günstige Prognose.

1.7 Tumorantigene

Tumorantigene können, je nach ihrem Expressionsmuster, in Tumor-assoziierte Antigene, welche auf Tumorzellen sowie auf gesunden Körperzellen vorhanden sind und Tumor-spezifische Antigene, welche nur auf Tumorzellen vorhanden sind, eingeteilt werden.

Zur Entwicklung von Immuntherapien ist es wichtig Antigene zu finden, welche spezifisch vom Tumor exprimiert werden, damit Autoimmunphänomene vermieden werden können. Da jedoch einige Antigene, welche als spezifisch vermutet wurden, oft doch nicht so Tumor-spezifisch sind, hat sich eine neue Einteilung aufgrund der Molekülstruktur etabliert. Einige dieser Typen werden im Folgenden genannt:

Differentiation-Antigene, welche außer von Krebszellen auch von embryonalen Zellen exprimiert werden können, nicht jedoch von normalen Zellen.

Overexpression/amplification Antigene, welche ebenfalls auf normalen Zellen vorkommen können, auf diesen jedoch in zu niedriger Ausprägung um eine Immunantwort zu induzieren. Weitere Typen sind durch Tumormutationen entstandene mutational Antigene, cancer-testis Antigene, oncofetale Antigene, glykolipid Antigene und virale Antigene (Chu et al., 2008, Liu et al., 2010).

In dieser Arbeit beschäftigen wir uns mit dem glykolipid-Antigen CA-125 und dem differentiation-Antigen Mesothelin (Chang and Pastan, 1996).

In einer Arbeit von Schuster et al. zeigen genau diese zwei Tumorantigene, auf MHC I und MHC II Liganden von HGSC, eine Überexpression (Schuster et al., 2017).

Diese Antigene werden demnach nicht nur als Protein auf der Zelloberfläche, sondern auch im sog. „Ligandom“ des Tumors, überexprimiert (Siehe Abbildungen 4 und 5).

MHC class I

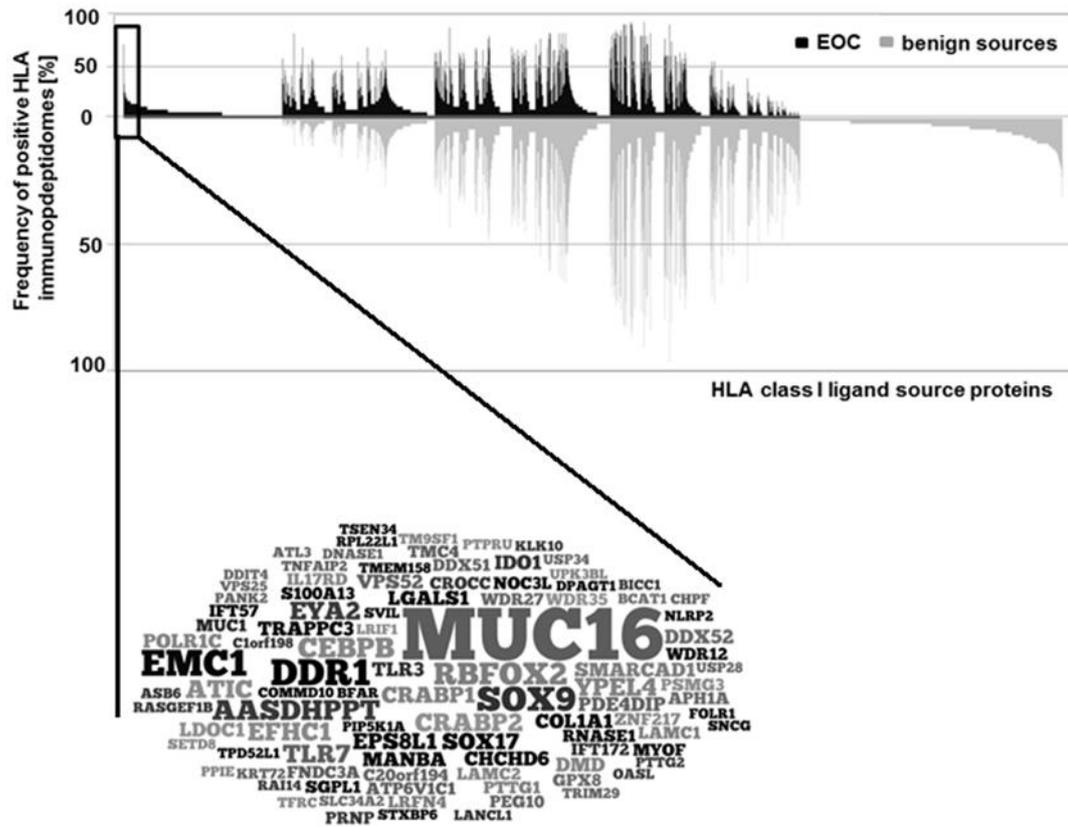


Abbildung 4: Proteine welche auf Liganden der MHC Klasse I von HGSC (schwarz) und benignem Gewebe (grau) präsentiert werden. Der markante Expressionsgipfel in HGSC, welcher in benignem Geweben fehlt, wird in der Word-Cloud aufgeschlüsselt. Am höchsten repräsentiert ist das MUC16 oder CA-125 (Schuster et al., 2017).

MHC class II

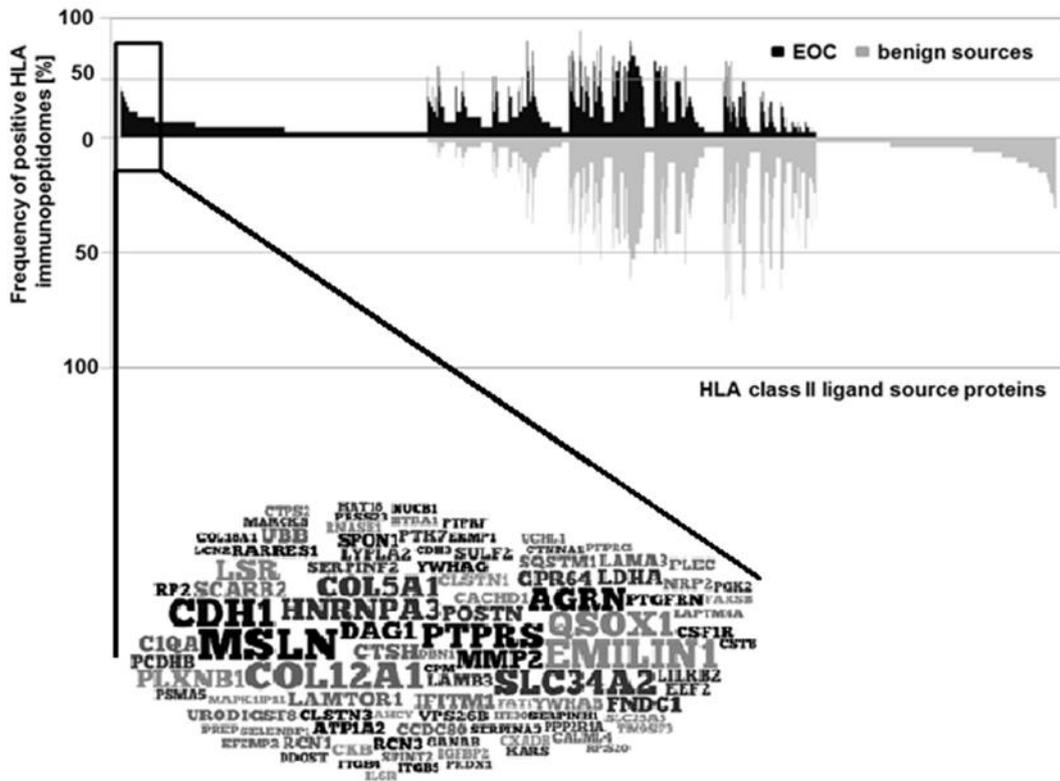


Abbildung 5: Proteine auf Liganden der MHC Klasse II von HGSC (schwarz) und benignem Gewebe (grau). Der markante Expressionsgipfel in HGSC, welcher in benignem Gewebe fehlt, wird in der Word-Cloud aufgeschlüsselt. Am höchsten repräsentiert ist das Mesothelin (Schuster et al., 2017).

1.7.1 CA-125

Das cell-surface MUC16:

Das CA-125 liegt als MUC16 Gen auf 19p13.2. Es wird physiologisch im Epithel von verschiedenen Organen, wie z.B. der Cornea, Conjunctiva, im Respirationstrakt und in den weiblichen Geschlechtsorganen exprimiert (Haridas et al., 2014). Es hat als zellmembran-gebundenes Muzin (csMUC16) die Funktion, einen protektiven Oberflächenfilm zu erzeugen, welcher anti-adhäsiv wirkt und vor pathogenen Keimen und physikalischer Beanspruchung schützt (Haridas et al., 2014, Yin and Lloyd, 2001, Argüeso et al., 2003). Vor allem im Tränenfilm ist dies eine essentielle Aufgabe.

Das shed MUC16:

Nach proteolytischer Abspaltung des MUC16 von der Zellmembran, kann es auch als sMUC16 (shed Mucin) ins periphere Blut gelangen (Tyler et al., 2012). Bei gesunden Frauen sind daher positive CA-125-Serumwerte normal, in der Regel jedoch unter 35 U/ml (Haridas et al., 2014). Erhöhung des CA-125 Serumwertes kann bei einer Reihe gutartiger Erkrankungen, bzw. Zustände, auftreten, wie z.B. bei Endometriose, Schwangerschaft oder der Menstruation (Jacobs and Bast, 1989), jedoch auch bei malignen Erkrankungen wie das Ovarialkarzinom. Daher haben sich CA-125 Serumwertkontrollen als Screening-Methode nicht bewährt (Reade et al., 2013), als Verlaufskontrolle sind sie jedoch zuverlässige Tumormarker zum Überprüfen des Ansprechens auf Chemotherapie, zur Rezidivkontrolle und zur Prognoseabschätzung (Bast et al., 2005).

MUC16 in der Schwangerschaft:

Das csMUC16 hat in der Endometriumschleimhaut eine Barrierefunktion, welches Zelladhäsion während der unfruchtbaren Zeit im Zyklus verhindert. Erst durch die Herunterregulierung des MUC16 ist eine Einnistung der Blastocyste möglich (Haridas et al., 2014, Gipson et al., 2008).

Das MUC16 ist zur Erhaltung der Schwangerschaft ebenfalls essenziell. Es kann über Siglec-9, ein Rezeptor auf der Oberfläche einiger Immunzellen, eine Inhibition der immunologischen Funktion bewirken. Durch diese Fähigkeit wird das fetale Gewebe, welches normalerweise als körperfremd erkannt und zerstört werden würde, vor der zytotoxischen Immunantwort geschützt (Belisle et al., 2010).

Deshalb steigen im Verlauf der Schwangerschaft die CA-125 Serumwerte stark an (Tyler et al., 2012).

CA-125 im serösen Ovarialkarzinom:

MUC16 wird im serösen Ovarialkarzinom in über 80 % überexprimiert, weshalb die Serumwerte des Tumormarkers CA-125 mit Progression der Erkrankung ansteigen (Reinartz et al., 2012).

Die Eigenschaft des csMUC16 als anti-Ädhäsionsmolekül trägt zum Immune-Escape bei, da Immunzellen daran gehindert werden den Tumor zu identifizieren und auch direkt die Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen inhibiert werden kann (Gubbels et al., 2010, Patankar et al., 2005, Belisle et al., 2010).

MUC16 scheint ebenfalls die Platinresistenz im Ovarialkarzinom zu fördern (Boivin et al., 2009), sowie eine große Rolle bei der Migration, Adhäsion und Invasion von Tumorzellen zu spielen (Reinartz et al., 2012).

Die Metastasierung, z.B. ins Peritoneum, kann unter anderem durch die hohe Bindungskinetik von MUC16 zu einem weiteren Tumor-assoziierten Antigen, dem Mesothelin (MSLN), welches physiologischerweise im Mesothel vorkommt, bedingt werden (Gubbels et al., 2006b).

1.7.2 Mesothelin

Mesothelin liegt als MSLN-Gen auf 16 p13.3. Aus dem 69 kDa umfassenden Precursor-Protein wird das 40 kDa Membran-gebundene Protein, Mesothelin, und ein 30 kDa sekretorisches Protein synthetisiert (Chang and Pastan, 1996). Mesothelin wird physiologischerweise auf dem Mesothel von Perikard, Peritoneum und Pleura exprimiert. Eine Überexpression kommt in verschiedenen Tumoren vor wie z.B. dem Mesotheliom und dem Adenokarzinom des Ovars und des Pankreas (Hassan et al., 2004, Chen et al., 2013, Chang and Pastan, 1996). Das sekretorische Protein des Mesothelins kann im Serum nachgewiesen werden (Chen et al., 2013). Bei verschiedenen Tumorerkrankungen, wie beim Ovarial- und Pankreaskarzinom, ist es deutlich höher als im Serum gesunder Frauen oder Frauen mit benignen gynäkologischen Tumoren (Huang et al., 2006).

Aus einigen Studien geht hervor, dass eine hohe Expression von Mesothelin mit einer sehr schlechten Prognose, erhöhtem Rezidivrisiko und Chemoresistenz verbunden ist (Cheng et al., 2009), da es zu erhöhter Zellmotilität und somit

erhöhten Metastasierungsraten und sogar zur Verhinderung Paclitaxel-induzierter Apoptose führen kann (Chang et al., 2012).

Aus diesen Gründen, könnte das Mesothelin als neuer Tumorbiomarker und Prognoseparameter für das seröse Ovarialkarzinom, dienen.

1.8. Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zum Verständnis der Wechselwirkung zwischen Tumorantigenen und der Immunantwort im high-grade serösen Ovarialkarzinom, zu leisten

Dabei wird insbesondere auf die Expression von CA-125 und Mesothelin, sowie der Infiltration von CD8+ und CD3+ Lymphozyten in den Primärtumoren, sowie in den Metastasen, eingegangen.

Ein wichtiger Aspekt ist, ob die Expression der Antigene, bzw. Infiltration der Lymphozyten, homogen innerhalb des Primärtumors und den Tumorabsiedlungen ist und ob sich diese im Laufe der Metastasierung verändert. Dies wären wichtige Fakten, die berücksichtigt werden müssten bei der Stichprobengewinnung, sowie Entwicklung und Anwendung von personalisierten Immuntherapien.

Ein weiterer Aspekt ist der prognostische Einfluss dieser Tumorantigene und der Infiltration von Lymphozyten, sowie die Korrelation dieser beiden Faktoren.

Damit sollen diese Erkenntnisse einen Beitrag zu einer genaueren Prognoseabschätzung und zum gezielteren Einsatz der personalisierten Therapie, liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Das Patientinnen-Kollektiv

Es wurde retrospektiv ein Kollektiv aus 157 Patientinnen erstellt, welche konsekutiv von 1999-2008 in der Universitäts-Frauenklinik in Tübingen in Behandlung waren. Follow-Up Daten wurden von der Patientenregistrierung des Tübinger Krebszentrums erfasst.

Bei allen Fällen war die Diagnose eines serösen Ovarialkarzinoms, überwiegend high-grade, gestellt worden (Siehe Tabelle 2). Das Alter der Patientinnen reichte von 31-92 Jahren, wobei der Mittelwert bei 66 Jahren lag (Siehe Abbildung 6). Sie ließen sich in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen nach den S3-Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie (AGO) operativ behandeln (Kommission Ovar A.G.O e.V., 2013).

Falls indiziert bekamen diese Patientinnen eine Carboplatin-haltige adjuvante Chemotherapie basierend auf den AGO-Empfehlungen.

Die histologischen Schnitte und Paraffinblöcke wurden im Institut für Pathologie Tübingen archiviert und nochmals überprüft durch eine Pathologin mit Zusatzausbildung in der Gynäkopathologie (PD Dr. med. Staebler) auf Tumorhistologie und Grading.

Tabelle 2: Klinische Daten unseres Kollektivs.

Seröse Adenokarzinome	n	%
Gesamt	157	100,0%
Alter		
<60J	43	27,4%
60J oder >60J	114	72,6%
FIGO-Stadium		
I	10	6,4%
II	24	15,3%
III	123	78,3%
R-Status		
R0	38	24,2%
R1	42	26,8%
R2	29	18,5%
k.A.	48	30,6%
Platin-Resistenz		
ja	53	33,8%
nein	103	65,6%
k.A.	1	0,6%
Primärtumore	157	100,0%
Metastasen		
Netz	87	55,4%
Peritoneum	87	55,4%
Lymphknoten	65	41,4%

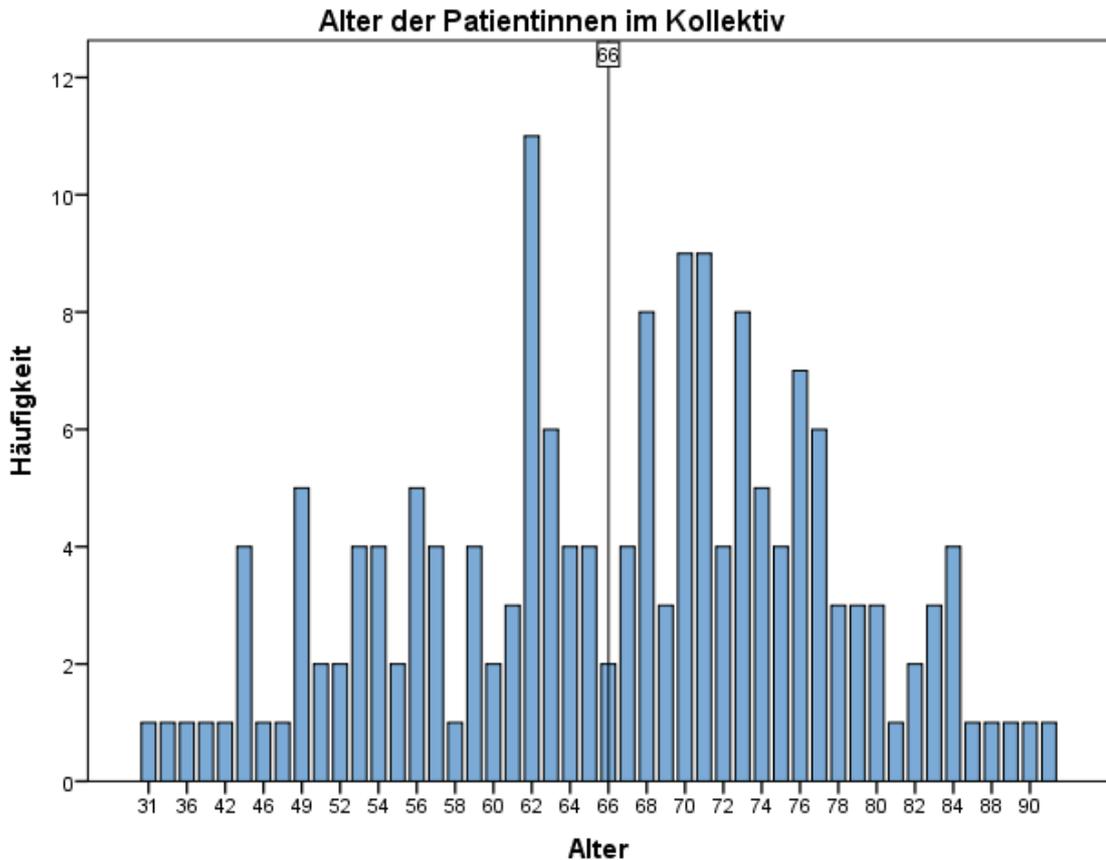


Abbildung 6: Alter der Patientinnen in unserem Kollektiv. Das Alter der Patientinnen reichte von 31-92 Jahren, wobei der Mittelwert bei 66 Jahren lag.

2.2 Erstellen des Tissue-Microarray (TMA)

Aus dem entfernten Gewebe (Ovar, Uterus, Omentum, Peritoneum und Lymphknoten) wurden zuallererst bestimmte Tumoranteile in Paraffinblöcken eingebettet. Aus diesen Paraffinblöcken wurden Schnitte mit einer Dicke von 4µm angefertigt und auf Objektträger gezogen, welche mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt wurden.

Auf diesen Schnitten wurden repräsentative Tumorbereiche markiert. Hier wurde differenziert zwischen Invasionsfront (Bereiche mit einer Gewebsinvasion und oft hoher Lymphozytenantwort) und dem Tumorzentrum (Bereiche mit solidem, exo- oder endophytem Wachstum ohne Gewebsinvasion).

Die Tumorbereiche wurden zum einen nach der Qualität der Fixierung und zum anderen nach der Darstellbarkeit von Invasionsfront und Tumorzentrum ausgesucht.

Anzahl der Stenzen pro Fall:

- Primärtumor: 3 Stenzen Tumorzentrum, 3 Stenzen Invasionsfront
- Netzmetastasen: 3 Stenzen Tumorzentrum, 3 Stenzen Invasionsfront
- LK-Metastasen: 3 Stenzen Tumorzentrum
- Peritonealmetastasen: 3 Stenzen Invasionsfront

Aus morphologischen Gründen war es schwierig bei LK- und Peritonealmetastasen zwischen Tumorzentrum und Infiltrationsfront weiter zu differenzieren.

Anhand der Markierungen wurden, mit einem halbautomatischen Gewebearray Instrument (Beecher Instruments Sun Prairie, WI, USA), die entsprechenden Stenzen aus dem Spenderblock entnommen. Die ausgestanzten Gewebezylinder, mit einem Durchmesser von 0,6mm, wurden dann auf einen vorgefertigten Paraffinempfängerblock in leere, 0,6mm große Stanzkanäle eingefügt.

Aus diesen TMA Blöcken wurden wiederum 4µm dicke Schnitte gemacht und auf superfrost-Objektträger gezogen. So erhielten wir ein ganzes Kollektiv kompakt auf 2-3 TMA Objektträgern komprimiert. Als allerletztes wurden die TMAs immunhistochemisch gefärbt (Siehe Abbildung 7).

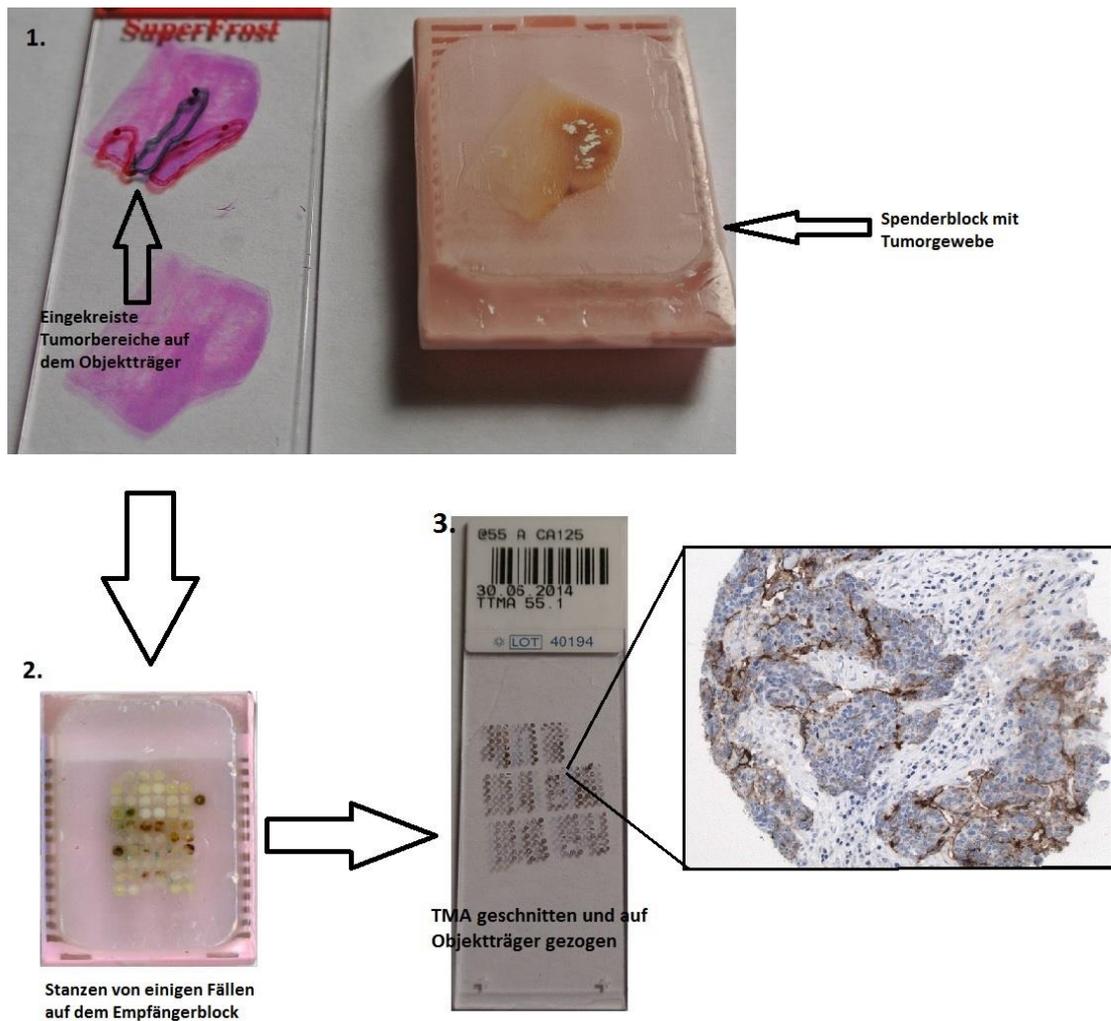


Abbildung 7: Erstellen des Tissue-Microarrays.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Allgemeine Immunhistochemie

In dieser Arbeit wurde die LAB- (engl.: labeled avidin-biotin) Methode angewendet (Siehe Abbildung 8). Nach Vorbehandlung des Präparats (Hitzebehandlung in einem Schnellkochtopf), wurde ein monoklonaler Primärantikörper benutzt, welcher eine hohe Affinität und Spezifität für das zu färbende Epitop besitzt. Nun bindet ein mit Biotin (Vitamin H) gekoppelter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Danach wird mit Peroxidase markiertes Avidin (aus Hühnereiweiß), dazugegeben. Avidin besitzt 4

Bindungsstellen und somit eine sehr hohe Affinität für Biotin, welches man sich für die Amplifikation des Primärsignals zunutze macht (Hsu et al., 1981). Als letzten Schritt wird ein Wasserstoffperoxid-Chromogen-Komplex hinzugefügt. Durch die Peroxidase wird das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu $H_2O + O_2$ gespalten und das Chromogen oxidiert, welches sich dann als brauner Farbstoff am gesamten Komplex abgelagert und das gewünschte Epitop sichtbar macht.

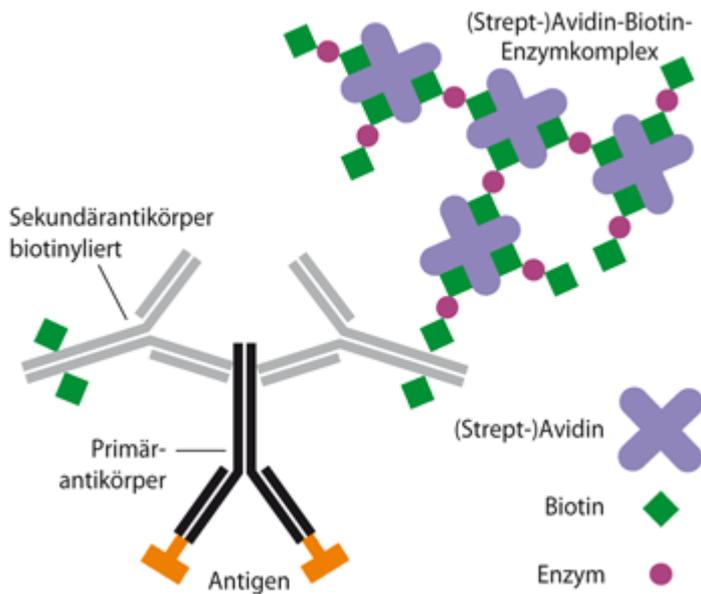


Abbildung 8: Prinzip der Immunhistochemie mit der LAB Methode. Der Primärantikörper koppelt sich an das gesuchte Antigen, woran sich dann der biotinylierte Sekundärantikörper zur Signalverstärkung heftet. Als nächstes bindet sich das mit Peroxidase gekoppelte Avidin an das Biotin. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid-Chromogen-Komplex, wird dieses vom Peroxid oxidiert, welcher dann als brauner Farbstoff sichtbar wird. Abbildung von (Mulisch, 2014).

2.3.2 Immunhistochemische Färbung für CA-125, Mesothelin und Lymphozyten

In dieser Arbeit wurden die Färbungen mit dem vollautomatischen Immunfärbesystem Ventana (Tucson, AZ, USA) Benchmark und dem XT iView DAB Detection Kit von selbiger Firma durchgeführt.

Die Paraffinblöcke mit den TMAs wurden als erstes geschnitten und auf superfrost-Objektträger gezogen, welche dann vorbehandelt wurden. Dazu wurden sie mit einem anorganischen Puffer zur Epitopdemaskierung hitzebehandelt (im Schnellkochtopf). Da die Antigene durch die Paraffinisierung quervernetzt (maskiert) werden, können sie durch Antikörper nicht mehr erkannt werden. Durch die Vorbehandlung mit einem leicht basischen Puffer erhalten sie ihre Immunreaktivität wieder.

Anschließend wurden jeweils folgende Primärantikörper verwendet:

Tabelle 3: In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper.

CA-125	Monoklonaler AK	M11	Mäuse Serum	Verdünnung 1:450	DAKO	Glostrup, Dänemark
Mesothelin	Monoklonaler AK	SPM143	Mäuse Serum	Verdünnung 1:100	Genetex	Irvine, CA, USA
CD3+	Monoklonaler AK	SP7	Ratten Serum	Verdünnung 1:100	DCS	Hamburg, Germany
CD8+	Monoklonaler AK	C8/144B	Mäuse Serum	Verdünnung 1:200	DAKO	Glostrup, Dänemark

Als nächstes wurde der biotinylierte Sekundärantikörper aufgetragen, woran sich dann das mit horse-radish Peroxidase markierte Avidin bindet. Für die durch die Peroxidase katalysierte Oxidierungsreaktion wurde das Chromogen Diaminobenzidin (I-VIEW DAB) mit H₂O₂ verwendet.

Um die IHC-markierten Zellen im umliegenden Gewebe zu lokalisieren, wurde dieses mit einer Hämatoxylin-Färbung gegengefärbt, mit einer aufsteigenden

Alkoholreihe dehydriert und abschließend mit dem Eindeckmedium Cytoseal abgedeckt.

2.3.3. Auswertung der Immunhistochemie

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen wurden mithilfe dem Immunreaktive Score (IRS), einem semiquantitativen Punktesystem, ausgewertet.

Zwei Werte wurden vergeben, miteinander multipliziert ergaben sie dann den IRS Score.

Wert 1: Färbeintensität

0 = Keine Färbung

1 = Diffuse, schwache Färbung

2 = mäßiggradige membranöse Färbung

3 = Starke Färbung der gesamten Zellmembran mit oder ohne zusätzlicher zytoplasmatischer Färbung.

Wert 2: Prozent der positiven Zellen:

0 = 0%

1 = 1-10%

2 = 11-50%

3 = 51-90%

4 = > 90%

Dieses Punktesystem wurde mit allen Gewebeproben durchgeführt von denen mindestens eine Gewebsstanze beurteilbar war. Die Auswertung wurde dabei nochmals unabhängig von einer erfahrenen Gynäkopathologin (PD Dr. med. Staebler) durchgeführt.

Jeder Tumorbereich war mit jeweils drei Stanzen im TMA vertreten.

Der Mittelwert dieser drei Stanzen ergab dann den endgültigen IRS-Score pro Fall. Als Kontrollgewebe haben wir gesunde Tuben verwendet.

Die Quantifizierung der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) wurde durchgeführt, indem pro Stanze die IHC-gefärbten Lymphozyten eines High Power Field (HPF=400x) ausgezählt wurden.

Danach wurde von jeweils 3 Stanzen pro Fall ebenfalls der Mittelwert errechnet. Bei den CD3+ und CD8+ Lymphozyten wurde nochmals unterschieden zwischen stromalen und intraepithelialen Lymphozyten.

2.4 Statistische Auswertung

Die Bilder von unseren Schnitten wurden mit dem Programm IMagic gemacht und anschließend mit Paint weiterbearbeitet.

Alle Graphiken und statistische Analysen wurden mit SPSS 23 oder Excel 2016 erstellt.

Die Streu- und Balkendiagramme, die Kaplan-Meier-Überlebensanalysen einschließlich der dazugehörigen Graphiken, sowie der T-Test wurden mit der SPSS Statistical Software (Version 23, IBM Corp., Armonk, NY, USA) erstellt, wobei P-Werte niedriger als 0,05 als signifikant bewertet wurden. Die Graphiken wurden anschließend teilweise mit Windows Paint überarbeitet.

Alle Häufigkeitsverteilungen in Tabellenform, Überlebenstabellen und Kreuztabellen wurden mit Excel erstellt.

Die verwendeten Cut-Offs wurden ermittelt, nach Auswertung der Primärtumoren in Gruppen nach Quartilen. Jeweils der Trennwert mit dem größten Unterschied zwischen den Quartilen in der Überlebensanalyse wurde als Trennwert zwischen hoher und niedriger Expression verwendet:

- CA 125: \geq IRS-Score 4
- Mesothelin: \geq IRS-Score 6
- CD3+ Lymphozyten: \geq 7 Lymphozyten pro HPF
- CD8+ Lymphozyten: \geq 1 Lymphozyt pro HPF

3. Ergebnisse

3.1 Expressionsstatus von CA-125 und Mesothelin

Voraussetzung für die Entwicklung zielgerichteter Immuntherapien ist die Kenntnis über die Verteilung verschiedener Antigene im gesamten Tumor, sowie in dessen Metastasen. Daher haben wir die Expression der Antigene CA-125 und Mesothelin, zum einen im Primärtumor des Ovars und zum anderen in den Metastasen des Netzes, Peritoneums und der Lymphknoten, high-grade seröser Ovarialkarzinome, untersucht.

Infolgedessen haben wir gefunden, dass CA-125 in allen Tumorregionen überwiegend eine hohe Expression über unserem festgelegten Cut-Off von IRS-Score 4 zeigte (Siehe Abbildungen 9 und 11). Wir konnten sogar eine Zunahme der positiven Fälle in Metastasen des Peritoneums (94,2%) und der Lymphknoten (98,4%), im Vergleich zu den Primärtumoren im Ovar (85,4%) und der Metastasen im Netz (86,6%), beobachten.

Die Mesothelinexpression zeigte ebenfalls eine Zunahme der Fälle, über unserem Cut-Off von IRS-Score ≥ 6 , in den Netz- (34,0%) und Peritonealmetastasen (40,2 %), im Vergleich zu den Primärtumoren im Ovar (23,4%) und den Metastasen in den Lymphknoten (29,2%) (Siehe Tabelle 4). Dabei fällt auf, dass weniger als die Hälfte dieser Fälle in allen Regionen eine Mesothelinexpression oberhalb unseres Cut-Offs aufweist (Siehe Abbildung 10 und 11).

Im Vergleich zur diffusen Expression üblich für die Karzinome, konnten wir im Kontrollgewebe gesunder Tuben eine gerichtete Expression zum Lumen hin, mit IRS-Scores von 6 bei CA-125 und 8 bei Mesothelin beobachten. (Siehe Abbildung 12).

Zusammenfassend können wir also sagen, dass CA-125 eine überwiegend hohe Expression in allen Tumorregionen aufweist, mit einer Steigerungstendenz im Prozess der Metastasierung vom Ovar zum Netz, dann

zum Peritoneum und schließlich zu den Lymphknoten. Die Mesothelinexpression weist in deutlich weniger Fällen eine Überexpression auf, bei einer Steigerung der Expression vom Ovar, in Richtung Lymphknoten, Netz und schließlich zum Peritoneum.

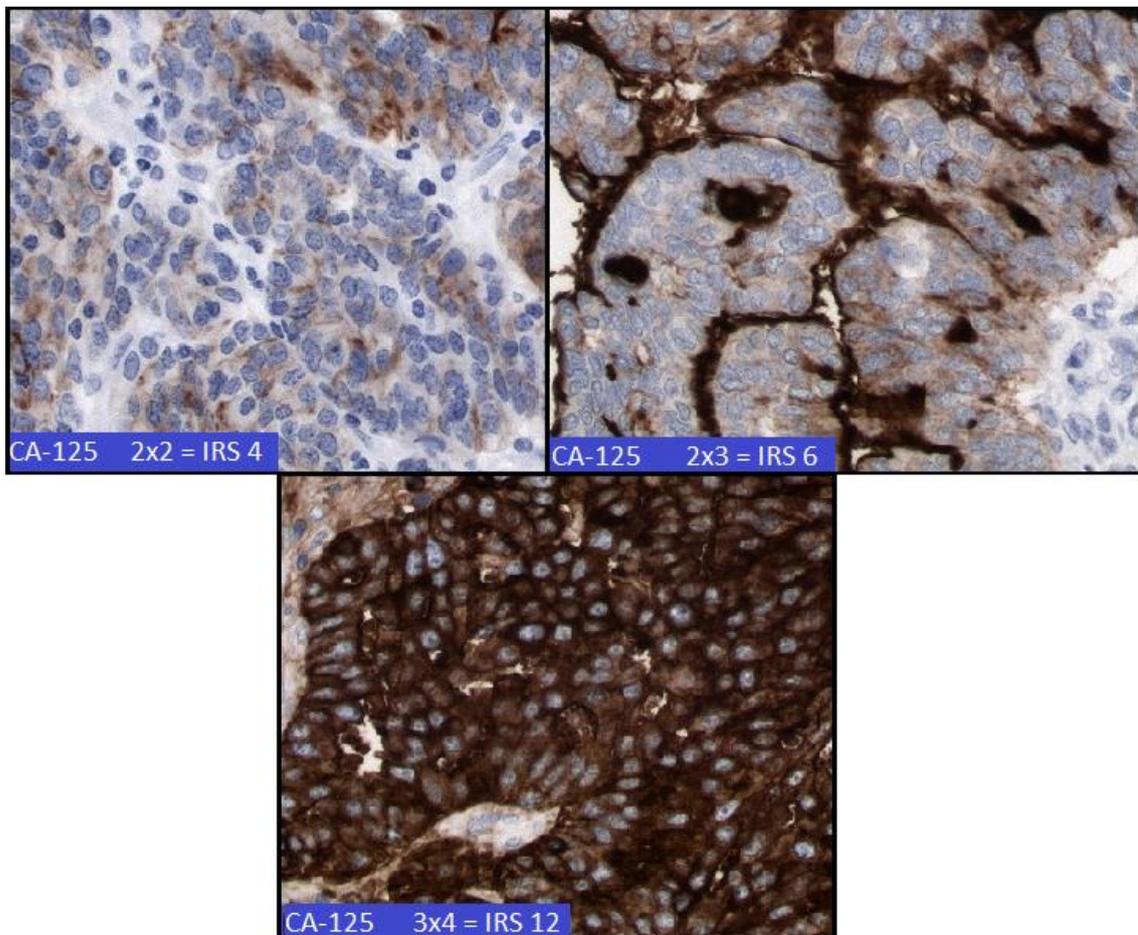


Abbildung 9: Beispiele des IRS-Scores von CA-125. Die linke Abbildung zeigt ein schwaches Färbemuster, die rechte ein Membranfärbemuster und die untere Abbildung eine starke Färbung mit zytoplasmatischem Anteil.

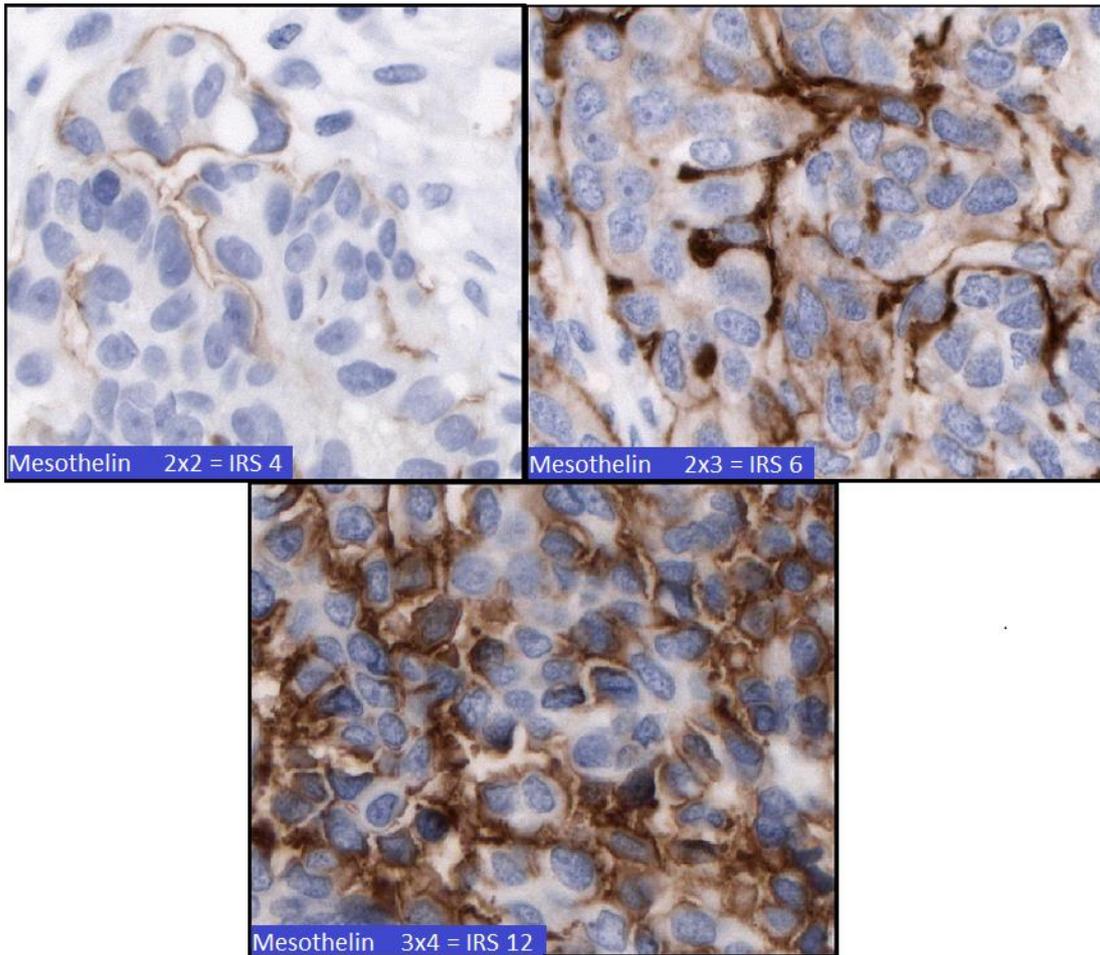


Abbildung 10: Beispiele des IRS-Scores von Mesothelin. Die linke Abbildung zeigt ein schwaches Färbemuster, die mittlere Abbildung eine mittleres und die rechte Abbildung ein starkes Färbemuster.

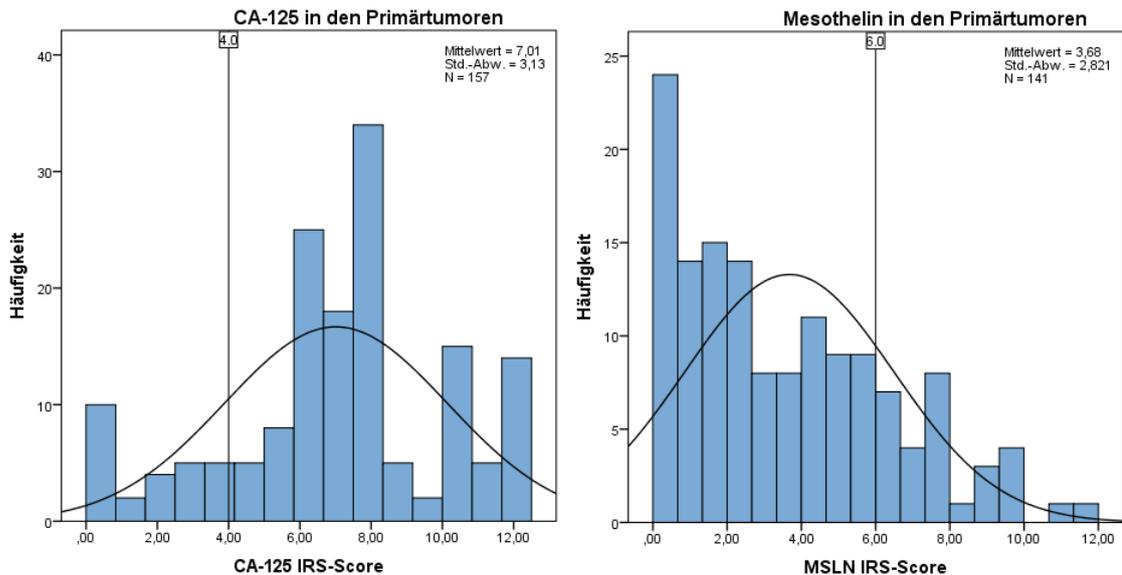


Abbildung 11: Häufigkeiten der IRS-Scores in den Primärtumoren des Ovars. Links: CA-125 (n=157). Der Cut-Off liegt bei IRS ≥ 4 . 85,35% der Fälle sind über dem Cut-Off, der Mittelwert liegt bei 7,01. Rechts: Mesothelin (n=141). Der Cut-Off liegt bei IRS ≥ 6 . 23,4% der Fälle liegen über dem Cut-Off, der Mittelwert liegt bei 3,68.

Tabelle 4: Häufigkeiten von CA-125 und Mesothelin in den Primärtumoren des Ovars und in den Metastasen. St. Abweichung = Standardabweichung.

CA-125	Ovar		Netz		Peritoneum		Lymphknoten	
	n	%	n	%	n	%	n	%
IRS < 4	23	14,6%	13	13,4%	5	5,8%	1	1,6%
IRS ≥ 4	134	85,4%	84	86,6%	81	94,2%	63	98,4%
Gesamt	157	100,0%	97	100,0%	86	100,0%	64	100,0%
Mittelwert	7,0		7,6		8,2		8,0	
Median	7,0		7,7		8,0		8,0	
St. Abweichung	3,1		3,1		2,7		2,3	
Mesothelin								
	n	%	n	%	n	%	n	%
IRS < 6	108	76,6%	64	66,0%	49	59,8%	46	70,8%
IRS ≥ 6	33	23,4%	33	34,0%	33	40,2%	19	29,2%
Gesamt	141	100,0%	97	100,0%	82	100,0%	65	100,0%
Mittelwert	3,7		4,4		4,6		3,5	
Median	3,0		3,5		4,2		2,7	
St. Abweichung	2,8		3,7		3,4		3,2	

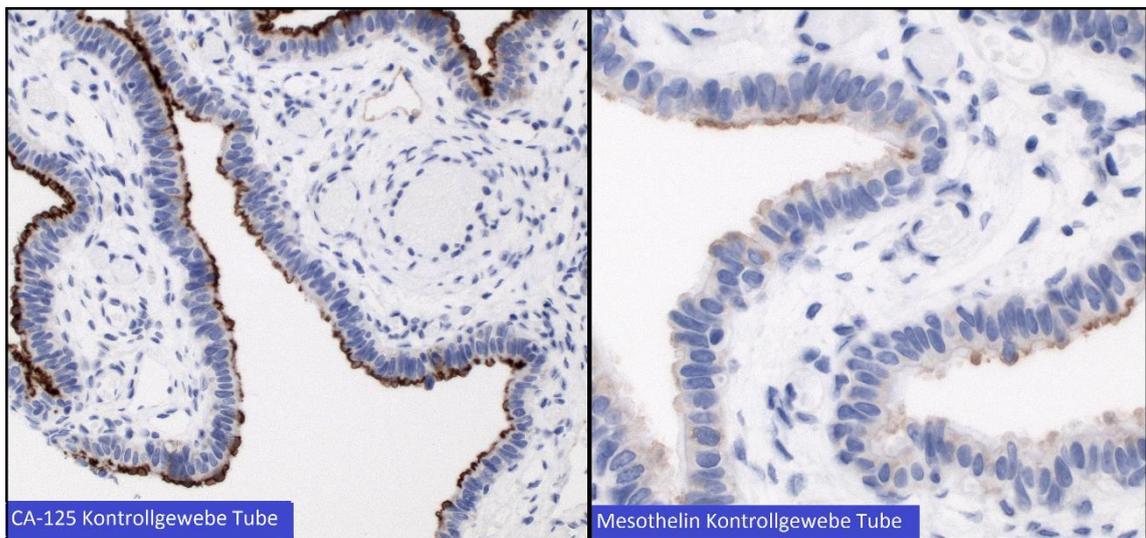


Abbildung 12: Immunhistochemie von gesunden Tuben als Kontrollgewebe mit CA-125 und Mesothelin. Die CA-125-Färbungen ergaben am häufigsten den IRS Score 8, die Mesothelin-Färbungen am häufigsten den IRS-Score 6.

3.2 Verteilung der Expression von CA-125 und Mesothelin

3.2.1 Homogenität der Expression innerhalb ausgewählter Tumorbereiche in Ovar und Netz

Um in klinischer Praxis möglichst exakte Proben gewinnen zu können, muss die Verteilung der Antigene innerhalb der einzelnen Tumorabsiedlungen berücksichtigt werden.

Wir haben dabei die Homogenität in zwei morphologisch und vom Wachstumsverhalten sehr unterschiedliche Tumorbereiche untersucht, dem Tumorzentrum und der Tumorperipherie (Infiltrationsfront) (Galon et al., 2012a). Ab einem P-Value von $p < 0,05$, sprechen wir von einem signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Lokalisationen.

Dabei haben wir gefunden, dass die CA-125 Expression in Ovar ($n=131$; $p=0,274$ T-Test) und Netz ($n=79$; $p=0,086$ T-Test) homogen ausgeprägt ist (Siehe Tabelle 5).

Exemplarisch für die Mesothelinexpression haben wir die Homogenität ausschließlich in den Netzmetastasen untersucht. Der T-Test für verbundene Stichproben zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen Tumorperipherie und Tumorzentrum ($p=0,909$; $n=80$) (Siehe Tabelle 6).

Wir können daher feststellen, dass es bei unserer Stichprobengröße im Mittel keinen Unterschied macht von wo Proben zur Untersuchung der CA-125- und Mesothelinexpression innerhalb des Ovars oder der Netzmetastasen gewonnen werden.

Table 5: T-Test for combined samples to the expression pattern of CA-125 in the tumor periphery and in the tumor center. The P-values in the Ovary $p=0,274$ and Netz $p=0,086$ indicate that there is no statistically significant difference in the expression between tumor center and infiltration front.

CA-125	N	Mittelwert	Mittelwert der Abweichung	95% Konfidenzintervall der Differenz	P-Wert (Sig.)
Ovar Zentral	131	7,5409	0,21023	Untere: -0,7885 Obere: 0,27557	0,274
Ovar Peripher	131	7,3307			
Netz Zentral	79	7,4008	-0,3333	Untere: -0,71535 Obere: 0,04868	0,086
Netz peripher	79	7,7342			

Table 6: -Test for combined samples to the expression pattern of Mesothelin in the tumor periphery and in the tumor center. The P-value indicates that there is no statistically significant difference in the expression between tumor center and infiltration front in the Netz.

Mesothelin	N	Mittelwert	Mittelwert der Abweichung	95% Konfidenzintervall der Differenz	P-Wert (Sig.)
Netz Zentral	80	4,2312	-0,02508	Untere: -0,45830 Obere: 0,40814	0,909
Netz Peripher	80	4,2563			

3.2.2 Heterogenität der Expression im Primärtumor verglichen mit den Metastasen

For two reasons, the knowledge of the distribution of antigens in the primary tumor and the metastases is of great importance. On the one hand, to determine how reliable a sample from a metastasis can be compared with a sample from the primary tumor, and on the other hand, to identify possible attack points of immunotherapy.

CA-125:

Folgende Erkenntnisse haben wir über die CA-125 Expression in den Primärtumoren und Metastasen gewonnen.

Eine homogen hohe oder homogen niedrige Expression des Antigens CA-125 konnten wir in 86,1% (74 von 86 Fällen) in Ovar und Netz und in 89,2% (66 von 74 Fällen) in Ovar und Peritoneum, feststellen (Siehe Tabelle 7). In 72,3% (34 von 47 Fällen) war die Expression in allen drei Lokalisationen homogen (Siehe Abbildung 14).

Eine lineare Korrelation konnten wir hingegen nur bei der Expression in Ovar und Netz ($r=0,616$; $p=0,000$), sowie Ovar und Peritoneum ($r=0,527$; $p=0,000$) beobachten, nicht jedoch bei der Expression in Ovar und Lymphknoten ($r=0,223$; $p=0,090$) (Siehe Abbildung 13). Diese Erkenntnis spiegelt sich in den absoluten Zahlen wider, da im Ovar die geringste (85,4%) und in den Lymphknoten die höchste (94,2%) Überexpression von CA-125 beobachtet wurde.

Anhand des T-Tests für verbundene Stichproben konnten wir Unterschiede in der Expression nur bei Vergleich des Mittelwerts der IRS-Scores aus dem Ovar mit dem Peritoneum ($p=0,000$; $n=74$) finden (Siehe Tabelle 8). Die absoluten Zahlen zeigen ebenfalls einen erheblichen Unterschied zwischen der Überexpression im Ovar (85,4%) und der im Peritoneum (94,2%) (Siehe Tabelle 4). Beim Vergleich der Expression in Ovar und Netz ($p=0,087$; $n=86$), sowie Ovar und Lymphknoten ($p=0,072$; $n=59$), konnten wir hingegen keinen signifikanten Unterschied feststellen.

Zusammenfassend können wir sagen, dass anhand der absoluten Fallzahlen, die Expression von CA-125 auch mit der Metastasierung eine homogene Ausprägung zeigt. Bei Untersuchung der Korrelation, sowie bei Hypothesentestung (T-Test) können wir eine teilweise Heterogenität in Ovar und Lymphknoten, sowie Ovar und Peritoneum nicht ausschließen. Unter Berücksichtigung unserer Fallgruppengröße müsste diese Erkenntnis jedoch mit größeren Fallgruppen verifiziert werden.

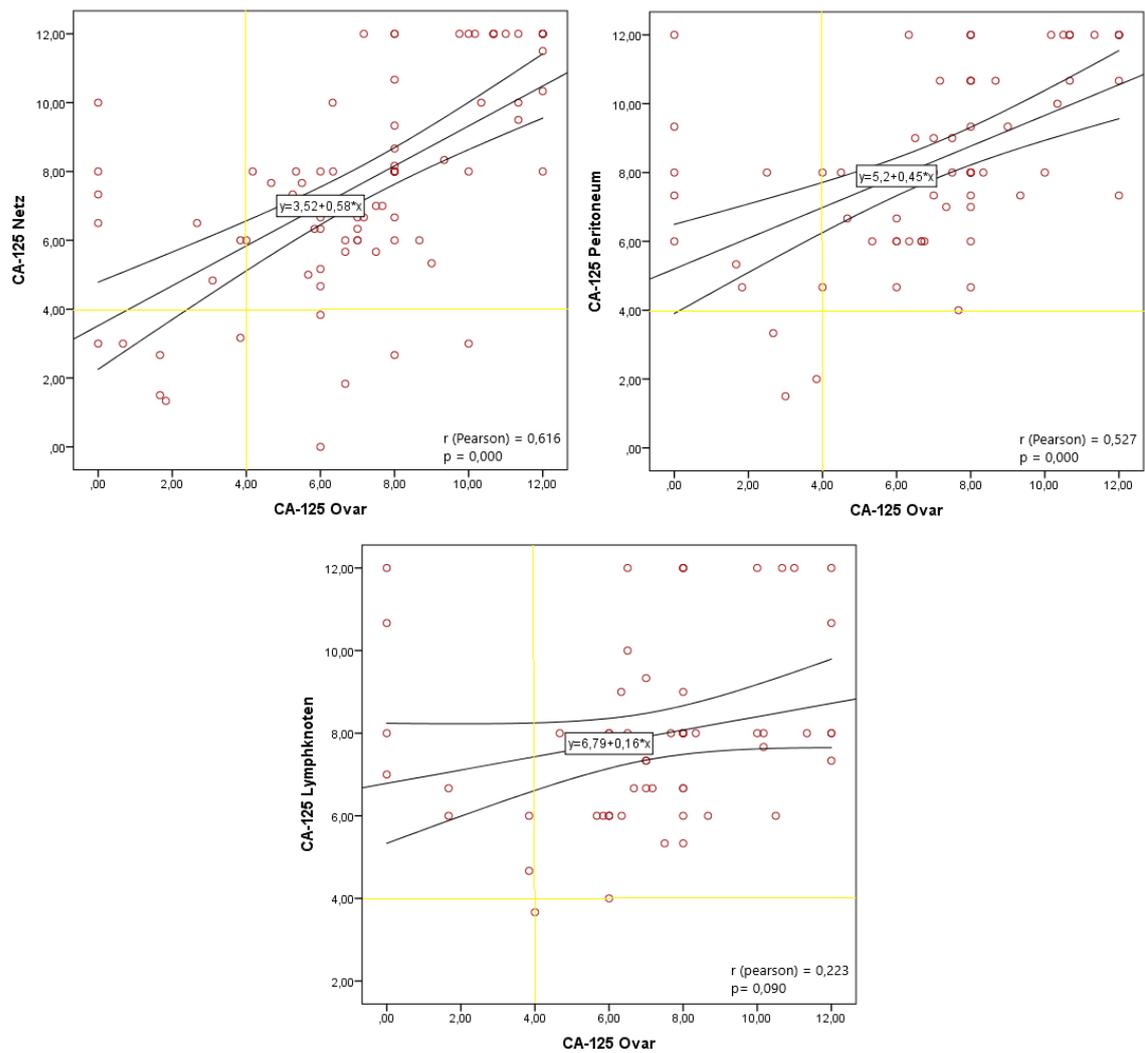


Abbildung 13: Streudiagramme zu den IRS-Scores von CA-125 im Ovar verglichen mit den Scores im Netz, Peritoneum und Lymphknoten. Die gelben Linien trennen die Werte über und unter dem Cut-Off von IRS 4 ab.

Tabelle 7: Kreuztabelle zur Darstellung der Absolut- und Prozentzahl der Fälle in Ovar und Netz, sowie Ovar und Peritoneum, welche als Punkte pro gelbem Quadrat in den obigen Streudiagrammen dargestellt sind. Gezeigt werden die Fälle der CA-125 Expression über oder unter dem Cut-Off von IRS 4

CA-125	Ovar IRS < 4		Ovar IRS ≥ 4	
	n	%	n	%
Netz IRS < 4	6	7,0%	5	5,8%
Netz IRS ≥ 4	7	8,1%	68	79,1%

CA-125	Ovar IRS < 4		Ovar IRS ≥ 4	
	n	%	n	%
Per IRS < 4	3	4,1%	0	0,0%
Per IRS ≥ 4	8	10,8%	63	85,1%

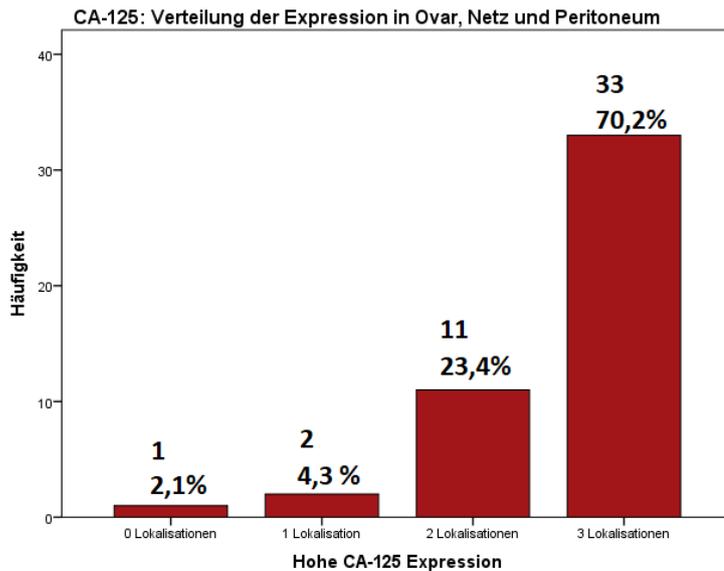


Abbildung 14: Balkendiagramm zur Verteilung der Expression von CA-125 in Ovar, Netz und Peritoneum. Die Balken zeigen an wie viele Fälle in jeweils 0,1,2 und in allen Lokalisationen einen IRS-Score ≥ 4 hatten. Die Zahlen über den Balken geben die jeweiligen Absolut- und Prozentwerte an.

Tabelle 8: T-Test für verbundene Stichproben zum Expressionsmuster von CA-125 im Ovar, Netz, Peritoneum und Lymphknoten. Der Vergleich von Ovar und Peritoneum ($p=0,000$) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied in der Expression. Der Vergleich von Ovar und Netz ($p=0,087$), sowie Ovar und Lymphknoten ($p=0,072$) zeigt keinen Unterschied.

CA-125	N	Mittelwert	Mittelwert der Abweichung	95% Konfidenzintervall der Differenz	P-Wert (Sig.)
Ovar	86	7,1692	-0,51105	Untere: -1,09881	0,087
Netz	86	7,6802		Obere: 0,07671	
Ovar	74	7,0204	-1,31068	Untere: -1,96455	0,000
Peritoneum	74	8,3311		Obere: -0,65680	
Ovar	59	7,1397	-0,79819	Untere: -1,66928	0,072
Lymphknoten	59	7,9379		Obere: 0,07289	

Mesothelin:

Die Erkenntnisse über die Expression von Mesothelin in den Primärtumoren und Metastasen waren wie folgt.

Homogenität bei der Expression von Mesothelin, konnten wir in 79,8% (63 von 79 Fällen) in Ovar und Netz, sowie in 72,1% (44 von 61 Fällen) in Ovar und Peritoneum, feststellen (Siehe Tabelle 9). Beim Betrachten aller drei Lokalisationen war die Expression in 65,2% (24 von 37 Fällen) homogen (Siehe Abbildung 16).

Beim Vergleich der Expression in Metastasen aus verschiedenen Lokalisationen mit der Expression im korrespondierenden Ovarialtumor, zeigte sich jeweils eine positive und signifikante Korrelation (Ovar und Netz ($r=0,650$; $p=0,000$), Ovar und Peritoneum ($r=0,425$; $p=0,000$), Ovar und Lymphknoten ($r = 0,359$; $p = 0,008$)). (Siehe Abbildung 15).

Beim paarweisen Vergleich der Proben (T-Test), konnten wir einen signifikanten Unterschied in der Expression von Ovar und Netz ($p=0,039$; $n=79$) feststellen, wobei die Expression im Netz (34,0% Mesothelin-Überexpression) höher ausfiel als im Ovar (23,4% Mesothelin-Überexpression) (Siehe Tabelle 4). Die Expression in Ovar und Peritoneum ($p=0,399$; $n=61$), sowie in Ovar und Lymphknoten ($p=0,197$; $n=53$), zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied (Siehe Tabelle 10).

Zusammengefasst konnten wir also in allen Lokalisationen Homogenität in der Expression von Mesothelin erkennen. Auch wenn die Expression in den einzelnen Fällen eine signifikante Zunahme in den Netzmetastasen zeigte, so beobachteten wir insgesamt eine positive Korrelation zwischen Primärtumor und Metastasen.

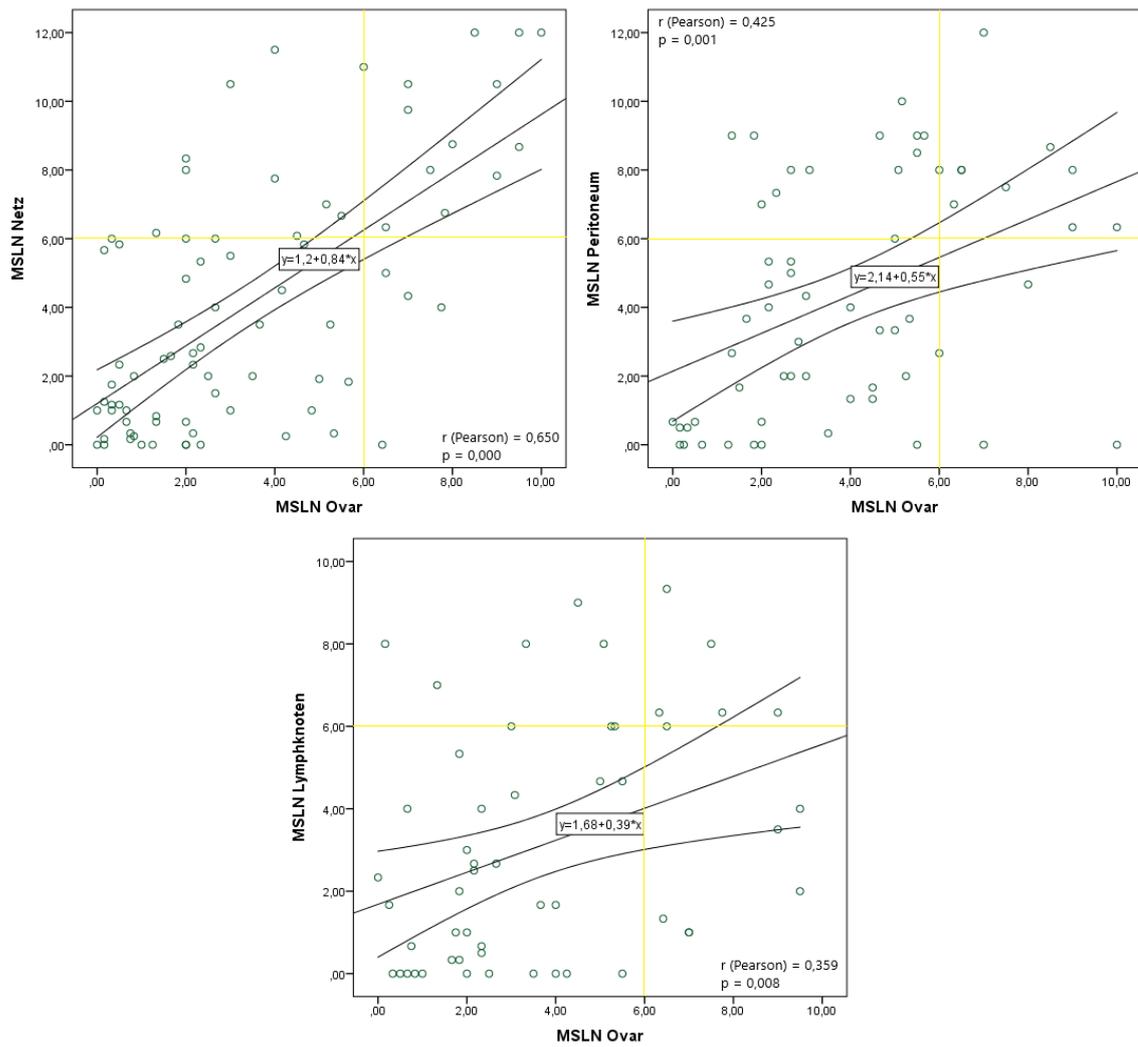


Abbildung 15: Streudiagramme zu den IRS-Scores von Mesothelin im Ovar verglichen mit den Scores im Netz, Peritoneum und Lymphknoten. Die gelben Linien trennen die Werte über und unter dem Cut-Off von IRS 6 ab.

Tabelle 9: Kreuztabelle zur Darstellung der Absolut- und Prozentzahl der Fälle in Ovar und Netz, sowie Ovar und Peritoneum, welche als Punkte pro gelbem Quadrat in den obigen Streudiagrammen dargestellt sind. Gezeigt werden die Fälle der Mesothelinexpression über oder unter dem Cut-Off IRS 6.

Mesothelin	Ovar IRS < 6		Ovar IRS ≥ 6	
	n	%	n	%
Netz IRS < 6	50	63,3%	4	5,1%
Netz IRS ≥ 6	12	15,2%	13	16,5%

Mesothelin	Ovar IRS < 6		Ovar IRS ≥ 6	
	n	%	n	%
Per IRS < 6	34	55,7%	4	6,6%
Per IRS ≥ 6	13	21,3%	10	16,4%

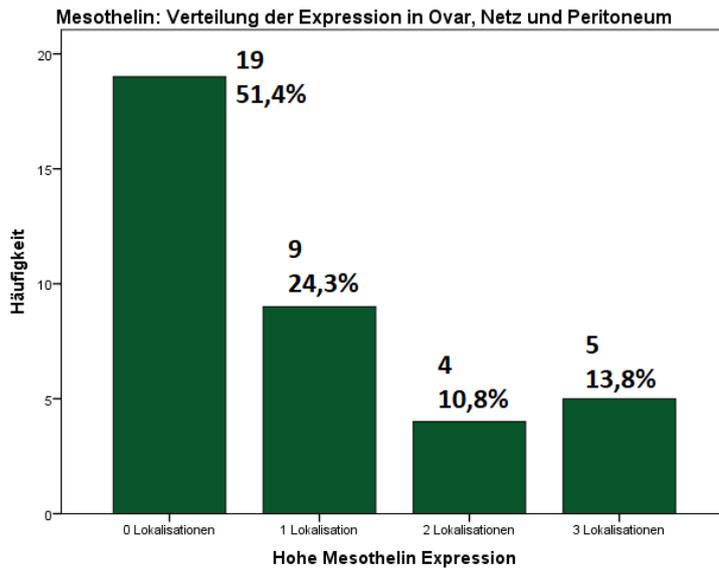


Abbildung 16: Balkendiagramm zur Verteilung der Expression von Mesothelin in Ovar, Netz und Peritoneum. Die Balken zeigen wie viele Fälle in jeweils 0,1,2 und in allen Lokalisationen einen IRS-Score ≥ 6 hatten. Die Zahlen über den Balken geben die jeweiligen Absolut- und Prozentwerte an.

Tabelle 10: T-Test für verbundene Stichproben zum Expressionsmuster von Mesothelin im Ovar, Netz, Peritoneum und Lymphknoten. Der Vergleich von Ovar und Netz ($p=0,039$) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied in der Expression. Die Expression in Ovar und Peritoneum ($p=0,399$), sowie Ovar und Lymphknoten ($p=0,197$) zeigt keinen Unterschied.

Mesothelin	N	Mittelwert	Mittelwert der Abweichung	95% Konfidenzintervall der Differenz	P-Wert (Sig.)
Ovar	79	3,3997	-0,6625	Untere: -1,28925	0,039
Netz	79	4,0622		Obere: -0,3564	
Ovar	61	3,9800	-0,3588	Untere: -1,20366	0,399
Peritoneum	61	4,3388		Obere: 0,48606	
Ovar	53	3,6758	0,5658	Untere: -0,30363	0,197
Lymphknoten	53	3,1101		Obere: 1,43520	

3.3 Infiltrationsstatus der CD3- und CD8-Lymphozyten.

Als Surrogat-Marker für die Immunantwort auf den Tumor haben wir die Infiltration von verschiedenen Lymphozytenpopulationen untersucht. Hier ist es, wiederum für die Entwicklung einer Immuntherapie, essentiell zu überprüfen wie die Lymphozyteninfiltration in den unterschiedlichen Tumor-Lokalisationen ausfällt.

Die hierbei untersuchten Lymphozytenpopulationen ließen folgendes Infiltrationsmuster erkennen.

CD3-Lymphozyten welche im Epithel des Tumors vorkommen (CD3E, Siehe Abbildung 17 links), zeigten, bei einem Cut-Off von ≥ 7 , insgesamt seltener eine hohe Infiltration. Im Ovar beispielsweise präsentierten nur 21,2% (33 von 156 Fällen) eine hohe Infiltration von CD3E. In den anderen Lokalisationen verhielt es sich ähnlich.

Im Gegensatz hierzu zeigten CD3-Lymphozyten welche im Stroma des Tumors vorkommen (CD3S, Siehe Abbildung 19 rechts), in 55,8% (87 von 156 Fällen) eine hohe Infiltration im Ovar. Bei der Metastasierung ins Peritoneum war die Infiltrationsquote mit 82,8% (72 von 87 Fällen), sowie ins Netz mit 95,9% (94 von 98 Fällen), sogar noch höher.

Da CD8 Lymphozyten insgesamt seltener vorkamen, wählten wir einen weitaus niedrigeren Cut-Off bei ≥ 1 Lymphozyt pro HPF.

Die Anzahl der CD8E-Lymphozyten, die Untergruppe der CD8 welche im Tumorepithel vorkommen, verringerte sich vom Ovar in 71,2% (109 von 153 Fällen), zum Netz in 66,3% (63 von 95 Fällen) und schließlich zum Peritoneum in 43,5% (37 von 85 Fällen).

Invers hierzu verhielt es sich mit den CD8-Lymphozyten, welche nur im Tumorstroma vorkamen, den CD8S-Lymphozyten. Bei insgesamt ebenfalls hoher Infiltrationsquote, zeigte sich eine Steigerungstendenz im Anzahl der Fälle mit hoher Infiltration, vom Ovar in 78,4% (120 von 153 Fällen), zum Netz in 94,8% (92 von 97 Fällen) und schließlich im Peritoneum in 97,7% (85 von 87 Fällen) (Siehe Tabelle 11).

Aufgrund der natürlich vorkommenden hohen Lymphozytendichte in den Lymphknoten, waren diese Färbungen nicht auswertbar. Als Kontrollgewebe haben wir gesunde Tuben verwendet, in denen man vereinzelt Lymphozyten, größtenteils im Epithel erkennen kann (Siehe Abbildung 18).

Zusammenfassend konnten wir beobachten, dass CD3E Lymphozyten eine geringe, aber homogene Infiltration zeigten. Im Unterschied zu den anderen Lymphozytenpopulationen (CD8E, CD8S, sowie CD3S Lymphozyten), welche

bei insgesamt höhere Infiltration eine Veränderung der Infiltrationsdichte mit der Metastasierung zeigten.

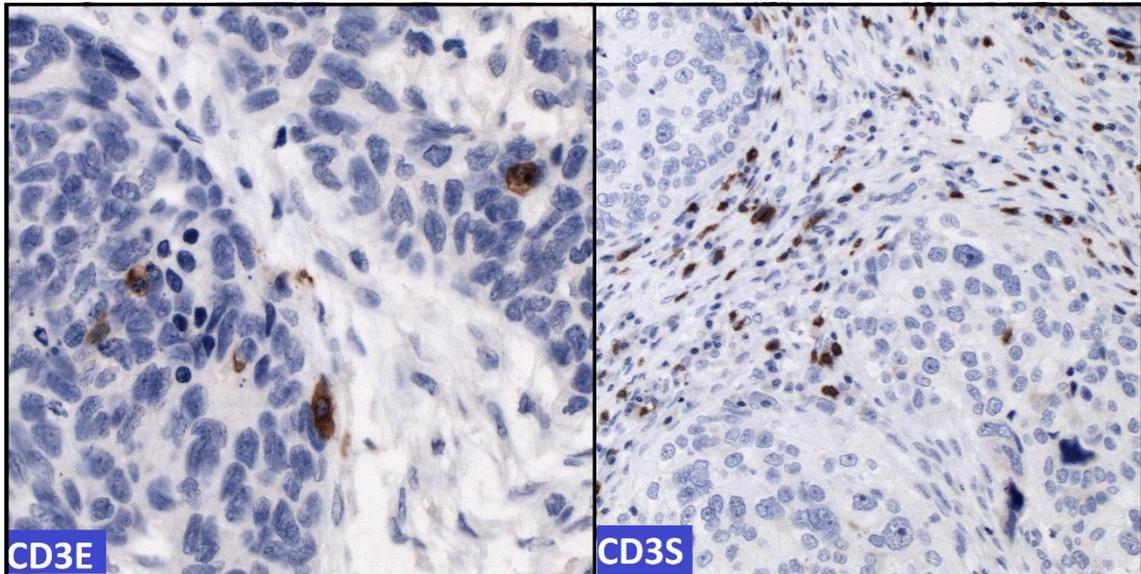


Abbildung 17: Links CD3E (epitheliale) Lymphozyten. Rechts CD3S (stromale) Lymphozyten.

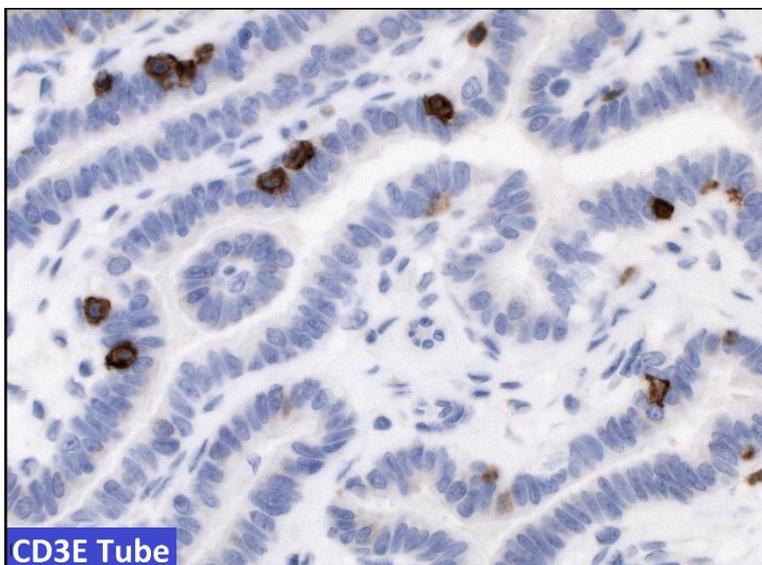


Abbildung 18: Immunhistochemie von CD3E (epitheliale) Lymphozyten aus der Tube als Kontrollgewebe.

Tabelle 11: Verteilung der verschiedenen Lymphozytenpopulationen in Ovar, Netz und Peritoneum. CD3E: Epitheliale CD3-Lymphozyten. CD3S: Stromale CD3-Lymphozyten. CD8E: Epitheliale CD8-Lymphozyten. CD8S: Stromale CD8-Lymphozyten.

Häufigkeiten der Lymphozyten							
		Ovar		Netz		Peritoneum	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
CD3E	<i>niedrig < 7</i>	123	78,80%	68	70,80%	68	79,10%
	<i>hoch ≥ 7</i>	33	21,20%	28	29,20%	18	20,90%
	<i>Gesamt</i>	156	100%	96	100%	86	100%
CD3S	<i>niedrig < 7</i>	69	44,20%	4	4,10%	15	17,20%
	<i>hoch ≥ 7</i>	87	55,80%	94	95,90%	72	82,80%
	<i>Gesamt</i>	156	100%	98	100%	87	100%
CD8E	<i>niedrig < 1</i>	44	28,80%	32	33,70%	48	56,50%
	<i>hoch ≥ 1</i>	109	71,20%	63	66,30%	37	43,50%
	<i>Gesamt</i>	153	100%	95	100%	85	100%
CD8S	<i>niedrig < 1</i>	33	21,60%	5	5,20%	2	2,30%
	<i>hoch ≥ 1</i>	120	78,40%	92	94,80%	85	97,70%
	<i>Gesamt</i>	153	100%	97	100%	87	100%

3.4 Heterogenität der Lymphozyteninfiltration im Primärtumor und in den Metastasen

Um die Vergleichbarkeit von Proben unterschiedlichen Ursprungs zu überprüfen, ist die Kenntnis um eine mögliche Heterogenität der Lymphozyteninfiltration unerlässlich.

Hierbei haben wir lediglich CD3E- und CD8E-Lymphozyten untersucht, da diese Populationen den größten Einfluss auf die Prognose zeigten.

CD3E:

Dabei ließ die Infiltration von CD3E Lymphozyten eine homogene Verteilung in den Lokalisationen Ovar und Netz in 73,8% (62 von 84 Fällen) und in den

Lokalisationen Ovar und Peritoneum sogar in 80,8% (59 von 84 Fällen), erkennen (Siehe Tabelle 12).

Beim Vergleich aller drei Lokalisationen miteinander konnten wir in 63,4% (26 von 41 Fällen) eine homogen niedrige Infiltration feststellen (Siehe Abbildung 20).

Eine signifikante lineare Korrelation zeigte sich bei der Infiltration von CD3E in Ovar und Netz ($r=0,542$, $p=0,000$), sowie Ovar und Peritoneum ($r=0,385$; $p=0,001$) (Siehe Abbildung 19).

Beim paarweisen Vergleich (T-Test) der CD3E-Lymphozyten in Ovar und Netz ($n=84$), konnten wir einen signifikanten Unterschied beobachten ($p=0,001$), wobei die Infiltration im Netz mit 29,2% höher ausfiel als im Ovar (21,2%) (Siehe Tabelle 11). In den Lokalisationen Ovar und Peritoneum konnten wir jedoch eine ähnliche Lymphozyteninfiltration ($p=0,526$) feststellen. (Siehe Tabelle 13).

Letztendlich deuten unsere Ergebnisse auf eine homogene Infiltration von CD3E in den Tumorproben aus dem Ovar, Netz und Peritoneum. Lediglich beim paarweisen Vergleich mittels T-Test, kann ein Unterschied der Infiltration zwischen Proben aus dem Ovar und Netz beobachtet werden, wobei dieser Unterschied durch unsere Fallgruppengröße bedingt sein könnte.

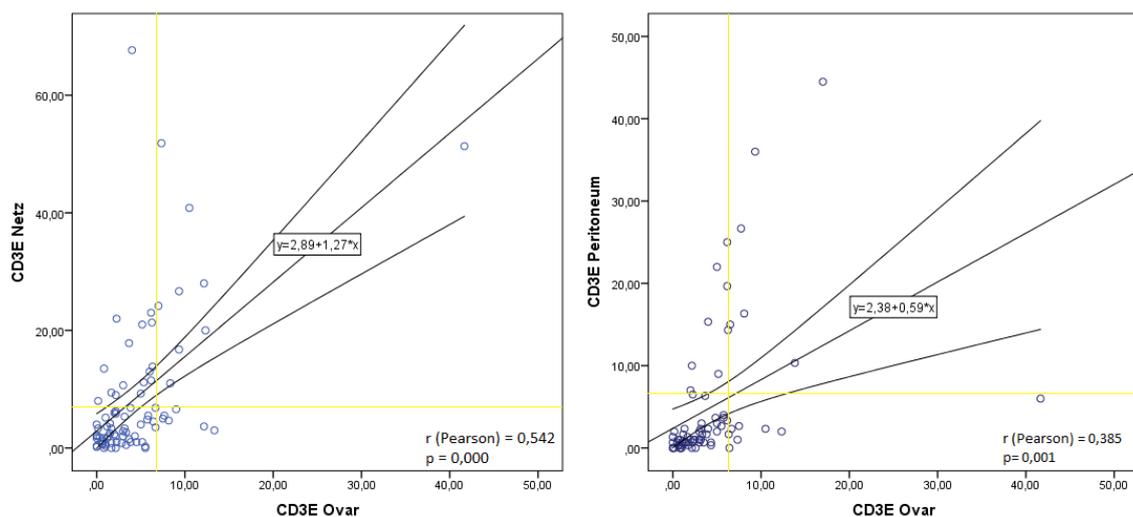


Abbildung 19: Streudiagramme zur Infiltration von CD3E im Ovar verglichen mit der im Netz und Peritoneum. Die gelben Linien trennen die Werte über und unter dem Cut-Off von 7/HPF.

Tabelle 12: Kreuztabelle zur Darstellung der Absolut- und Prozentzahl der Fälle in Ovar und Netz, sowie Ovar und Peritoneum, welche als Punkte pro gelbem Quadrat in den obigen Streudiagrammen dargestellt sind. Gezeigt werden die Fälle der Infiltration von CD3E Lymphozyten welche über oder unter dem Cut-Off 7/HPF waren.

CD3E	Ovar < 7/HPF		Ovar ≥ 7/HPF	
	n	%	n	%
Netz < 7/HPF	53	63,1%	6	7,1%
Netz ≥ 7/HPF	16	19,0%	9	10,7%

CD3E	Ovar < 7/HPF		Ovar ≥ 7/HPF	
	n	%	n	%
Per < 7/HPF	54	74,0%	5	6,8%
Per ≥ 7/HPF	9	12,3%	5	6,8%

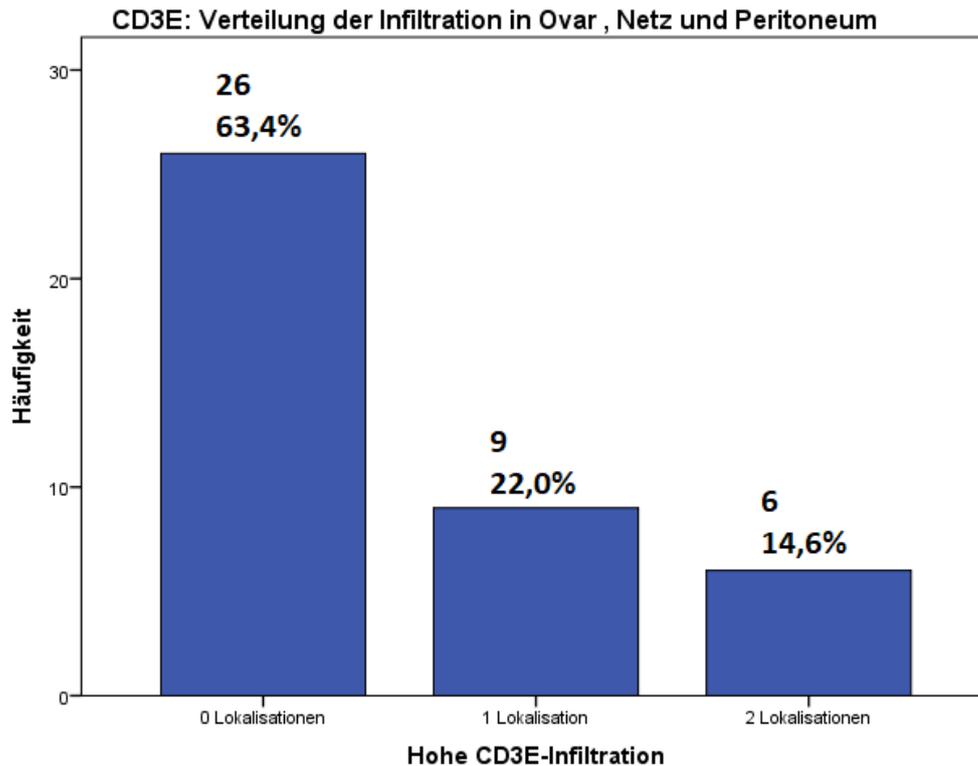


Abbildung 20: Balkendiagramm zur Verteilung der Infiltration von CD3E in Ovar, Netz und Peritoneum. Die Balken zeigen wie viele Fälle in jeweils 0,1 und 2 Lokalisationen eine Infiltration von ≥ 7 CD3E/HPF hatten. Es gab keine Fälle die eine hohe CD3E-Infiltration in allen drei Lokalisationen zeigten. Die Zahlen über den Balken geben die jeweiligen Absolut- und Prozentwerte an.

Tabelle 13: T-Test für verbundene Stichproben zur Heterogenität der Infiltration von CD3E Lymphozyten in den Primärtumoren des Ovars und den Metastasen in Netz und Peritoneum.

CD3E	N	Mittelwert	Mittelwert der Abweichung	95% Konfidenzintervall der Differenz	P-Wert (Sig.)
Ovar	84	4,3875	-4,05893	Untere: -6,32463	0,001
Netz	84	8,4464		Obere: -1,79323	
Ovar	73	4,3464	-0,61018	Untere: -2,51976	0,526
Peritoneum	73	4,9566		Obere: 1,29939	

CD8E:

Die Infiltration von CD8E im Tumorgewebe zeigte in 71,4% (59 von 83 Fällen) eine homogene Ausprägung in den Lokalisationen Ovar und Netz, sowie in 72,5% (45 von 83 Fällen) im Ovar und Peritoneum (Siehe Tabelle 14).

Beim Vergleich der drei Lokalisationen Ovar, Netz und Peritoneum miteinander, konnten wir in 50% (20 von 40 Fällen) eine Homogene Infiltration von CD8E feststellen (Siehe Abbildung 22).

Eine signifikante lineare Korrelation konnten wir bei der Infiltration von CD8E im Ovar und Netz ($r=0,271$; $p=0,013$), sowie Ovar und Peritoneum ($r=0,319$; $p=0,006$) beobachten (Siehe Abbildung 21).

Auch der paarweise Vergleich mittels T-Test ergab bei CD8E Lymphozyten in Ovar und Netz ($n=84$), sowie Ovar und Peritoneum ($n=72$), keinen signifikanten Unterschied ($p=0,257$ und $p=0,102$). Demnach scheint sich die Infiltration von CD8E in diesen beiden Lokalisationen nicht zu unterscheiden (Siehe Tabelle 15).

Abschließend können wir also sagen, dass CD8E Lymphozyten homogen in der Infiltration sind, wenn man zwei Lokalisationen miteinander vergleicht. Möchte man jedoch Proben von allen drei Lokalisationen miteinander vergleichen, muss man in 50% mit einem abweichenden Ergebnis rechnen.

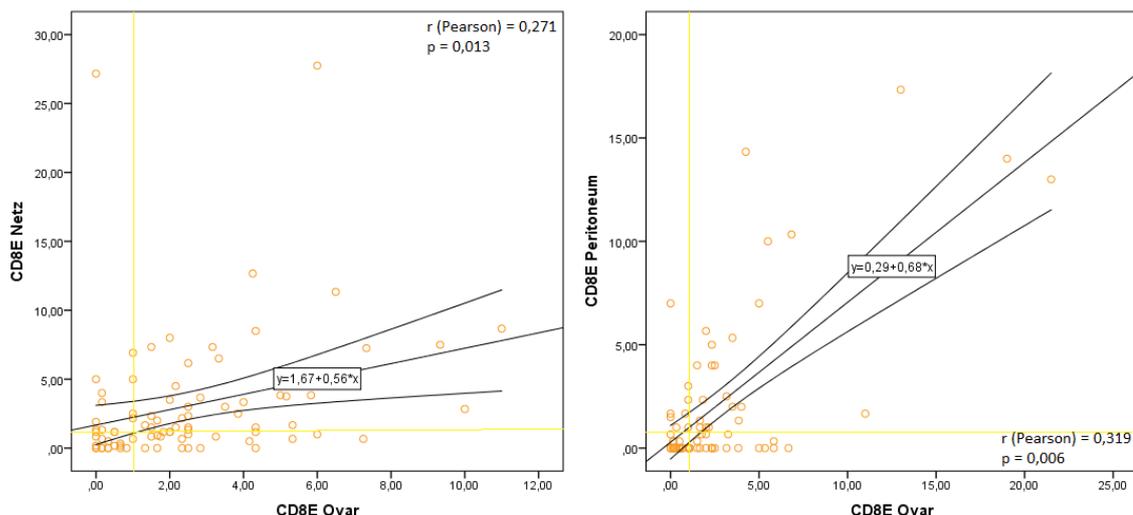


Abbildung 21: Streudiagramme zur Infiltration von CD8E im Ovar verglichen mit der im Netz und Peritoneum. Die gelben Linien trennen die Werte über und unter dem Cut-Off von 1/HPF.

Tabelle 14: Kreuztabelle zur Darstellung der Absolut- und Prozentzahl der Fälle in Ovar und Netz, sowie Ovar und Peritoneum, welche als Punkte pro gelbem Quadrat in den obigen Streudiagrammen dargestellt sind. Gezeigt werden die Fälle der Infiltration von CD8E Lymphozyten welche über oder unter dem Cut-Off 1/HPF waren.

CD8E	Ovar < 1/HPF		Ovar ≥ 1/HPF	
	n	%	n	%
Netz < 1/HPF	15	18,1%	14	16,9%
Netz ≥ 1/HPF	10	12,0%	44	53,0%

CD8E	Ovar < 1/HPF		Ovar ≥ 1/HPF	
	n	%	n	%
Per < 1/HPF	19	26,4%	22	30,6%
Per ≥ 1/HPF	5	6,9%	26	36,1%

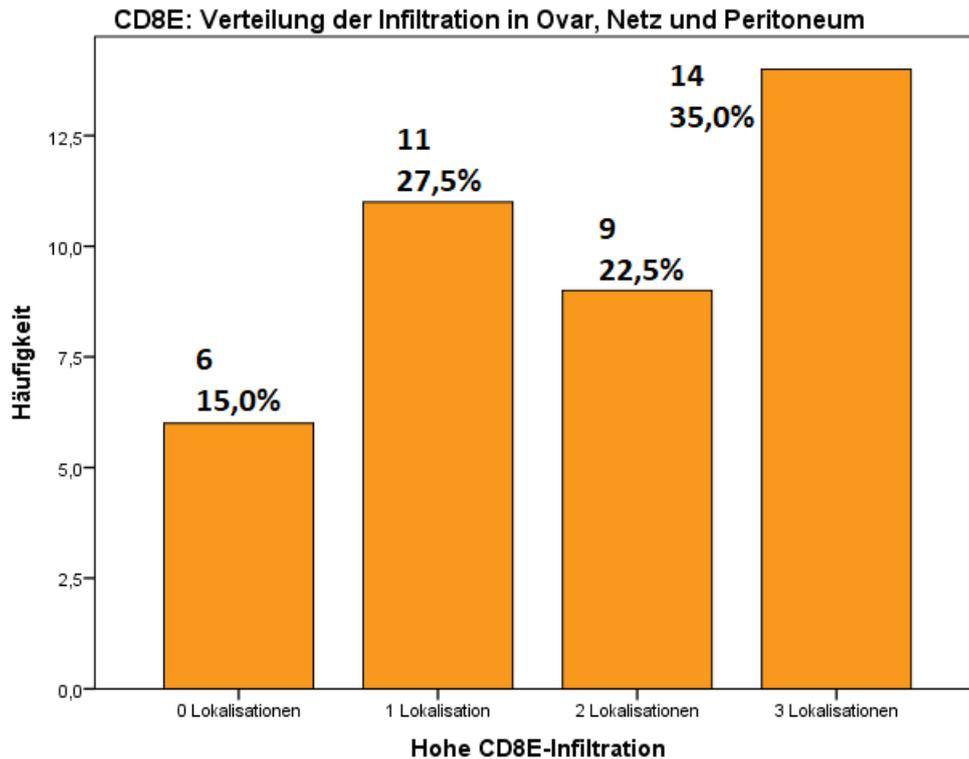


Abbildung 22: Balkendiagramm zur Verteilung der Infiltration von CD8E in Ovar, Netz und Peritoneum. Die Balken zeigen wie viele Fälle in jeweils 0, 1, 2 und in allen Lokalisationen eine Infiltration von ≥ 1 CD8E/HPF hatten. Die Zahlen über den Balken geben die jeweiligen Absolut- und Prozentwerte an.

Tabelle 15: Homogenität der Infiltration CD8E-positiver Lymphozyten in den Primärtumoren des Ovars und den Metastasen in Netz und Peritoneum. T-Test für verbundene Stichproben.

CD8E	N	Mittelwert	Mittelwert der Abweichung	95% Konfidenzintervall der Differenz	P-Wert (Sig.)
Ovar	84	2,4742	-0,57940	Untere: -1,58911	0,257
Netz	84	3,0536		Obere: 0,43030	
Ovar	72	2,7318	-0,59755	Untere: -0,12125	0,102
Peritoneum	72	2,1343		Obere: 1,31634	

3.5 Überlebensanalyse

In den nächsten Abschnitten haben wir die prognostische Bedeutung der Tumorantigene CA-125 und Mesothelin, sowie der Infiltration von CD3 und CD8 positiven Lymphozyten erforscht. Als letzten Schritt haben wir diese Faktoren in Korrelation zueinander gesetzt, um ebenfalls Aussagen über die Prognose machen zu können.

3.5.1 Wie beeinflussen CA-125 und Mesothelin das Überleben?

Wir haben die prognostische Bedeutung dieser zwei Antigene erforscht, indem wir zum einen die Expression im Ovar und zum anderen die Expressionsverteilung in allen Lokalisationen untersucht haben.

Unsere Analysen der Tumorantigene CA-125 und Mesothelin im Ovar ergaben keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Überleben.

Die Fünfjahresüberlebensrate stieg lediglich von 23,2% bei niedriger CA-125-Expression, auf 35,6% bei hoher Expression im Ovar ($p=0,083$; Siehe Abbildung 23, links). Die Mesothelinexpression im Ovar zeigte hingegen eine Verringerung der Fünfjahresüberlebensrate von 39,6% bei niedriger, auf 29,9% bei hoher Expression ($p=0,252$; Siehe Abbildung 24, links).

Des Weiteren haben wir analysiert wie sich die Überlebensdaten verändern, je nachdem in wie vielen Lokalisationen eine hohe Expression von CA-125 und Mesothelin vorhanden war. Auch diese Analyse zeigte keine statistische Signifikanz, weder für CA-125 ($p=0,548$) noch für Mesothelin ($p=0,103$) (Siehe Abbildungen 23 und 24, rechts).

Allerdings konnten wir eine Verbesserung der Fünfjahresüberlebensrate von 0% auf 27,6% beobachten, wenn CA-125 in mehr als einer Lokalisation hoch exprimiert war. Invers dazu konnten wir eine Verschlechterung der Fünfjahresüberlebensrate von 32,5% auf 0% beobachten bei hoher

Mesothelinexpression in über einer Lokalisation. Bedingt durch unsere Fallgruppengröße konnten wir jedoch keine statistische Signifikanz feststellen.

Wir haben demnach die Beobachtung gemacht, dass eine niedrige Mesothelinexpression, bzw. hohe CA-125 Expression in allen Lokalisationen, mit einem verbesserten Überleben einherzugehen scheint, obwohl von keiner statistischen Signifikanz gesprochen werden kann.

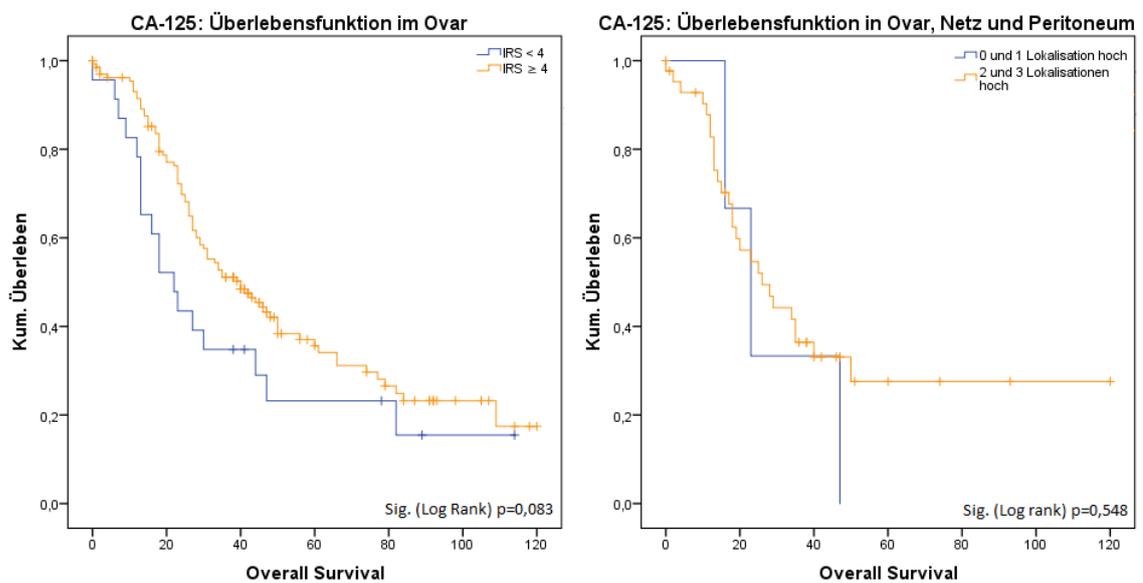


Abbildung 23: Kaplan-Meier Überlebenskurve für die CA-125 Expression im Ovar (links), sowie in Ovar, Netz und Peritoneum (rechts).

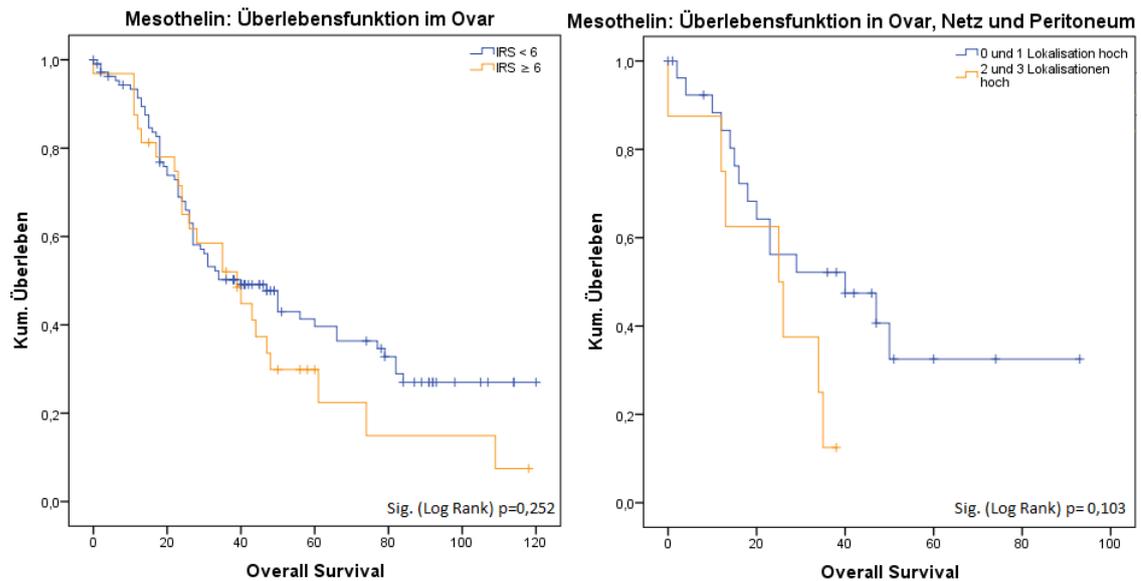


Abbildung 24: Kaplan-Meier Überlebenskurve für die Mesothelin Expression im Ovar (links), sowie in Ovar, Netz und Peritoneum (rechts).

3.5.2 Wie beeinflusst die Lymphozyteninfiltration das Überleben?

Wir haben die prognostische Bedeutung der epithelialen und stromalen CD3- und CD8-Lymphozyteninfiltration untersucht. Dabei wurde jede Lokalisation einzeln betrachtet. Um, in Anlehnung an den Immune-Score von Galon (Galon et al., 2012b), alle Lokalisationen in ihrer Infiltration zu berücksichtigen, müsste mit einer größeren Fallgruppe gearbeitet werden.

Bei hoher Infiltration von CD3E im Ovar konnte ein positiver Einfluss auf die Prognose nachgewiesen werden ($p=0,003$ Log Rank). Das Fünfjahresüberleben bei hoher CD3E-Infiltration lag bei 58,1% (10-Jahres-Überleben 51,6%) verglichen mit 27,9% (10-Jahres-Überleben 9,8%) bei niedriger CD3E-Infiltration (Siehe Abbildung 25). Die anderen Lokalisationen ließen einen ähnlichen Trend beobachten, jedoch waren die Fallgruppen zu klein um eine statistische Signifikanz zu erzielen.

Die Populationen der stromalen CD3, sowie der stromalen und epithelialen CD8 ließen in allen Regionen, bei unserer Fallgruppengröße, keine prognostische Relevanz erkennen.

Abschließend konnten wir also zeigen, dass nur die CD3E-Lymphozyteninfiltration im Ovar einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hat (Siehe Tabelle 16).

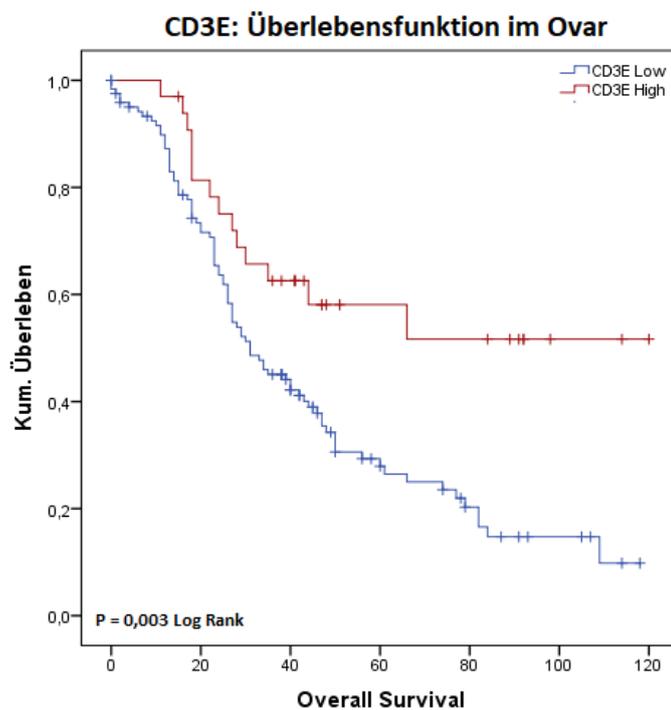


Abbildung 25: Kaplan-Meier Überlebenskurve von CD3E mit hoher und niedriger Lymphozyteninfiltration im Ovar. Die rote Kurve zeigt die Fälle mit hoher und die blaue mit niedriger Lymphozyteninfiltration. Mit $p=0,003$ besteht eine statistische Signifikanz.

Tabelle 16: Überlebenstabelle nach Kaplan Meier bei hoher und niedriger Lymphozyteninfiltration in Ovar, Netz und Peritoneum. Med. Überl. = Medianes Überleben; Sig. LR = Signifikanz Log Rank; 5, 10 Jahre = Überleben zu diesem Zeitpunkt.

Überlebenstabelle nach Infiltrationsdichte der verschiedenen Lymphozytenpopulationen

Ovar	Überleben				
	N	5 Jahre	10 Jahre	Med. Überl.	Sig. LR
CD3E Low	122	27,9%	0,0%	30 Monate	0,003
CD3E High	33	51,6%	51,6%	/	
CD3S Low	68	28,8%	11,2%	31 Monate	0,513
CD3S High	87	35,9%	22,1%	34 Monate	
CD8E Low	43	22,2%	0,0%	26 Monate	0,182
CD8E High	109	49,2%	19,7%	34 Monate	
CD8S Low	33	18,0%	12,0%	34 Monate	0,32
CD8S High	119	38,5%	20,2%	33 Monate	

Netz	Überleben				
	N	5 Jahre	10 Jahre	Med. Überl.	Sig. LR
CD3E Low	64	20,9%	0,0%	27 Monate	0,581
CD3E High	26	31,7%	21,1%	30 Monate	
CD3S Low	4	0,0%	0,0%	46 Monate	0,859
CD3S High	88	29,7%	0,0%	28 Monate	
CD8E Low	31	21,5%	21,5%	29 Monate	0,804
CD8E High	58	30,1%	0,0%	29 Monate	
CD8S Low	5	0,0%	0,0%	42 Monate	0,866
CD8S High	86	31,2%	0,0%	28 Monate	

Peritoneum	Überleben				
	N	5 Jahre	10 Jahre	Med. Überl.	Sig. LR
CD3E Low	63	23,2%	12,4%	24 Monate	0,866
CD3E High	16	29,0%	29,0%	23 Monate	
CD3S Low	14	27,8%	0,0%	24 Monate	0,848
CD3S High	66	23,1%	23,1%	25 Monate	
CD8E Low	45	15,2%	0,0%	23 Monate	0,181
CD8E High	34	33,9%	33,9%	25 Monate	
CD8S Low	1	/	/	/	0,910
CD8S High	79	24,7%	16,9%	25 Monate	

3.5.3 Wie beeinflusst die CA-125-Expression in Korrelation mit der Lymphozytendichte das Überleben?

Wie bereits erwähnt, haben die Patientinnen mit hoher CD3E-Lymphozyteninfiltration im Ovar bisher die beste Prognose. Diese Gruppe lässt sich nochmals in zwei Gruppen aufteilen, nämlich nach hoher und niedriger CA-125-Expression. Für sich alleine zeigte die CA-125 Expression keine prognostische Relevanz, aber in Korrelation mit hoher CD3E-Lymphozyteninfiltration konnten wir eine Gruppe von Langzeitüberlebenden feststellen (Siehe Abbildung 26). Diese Aufteilung in Gruppen haben wir in allen Lokalisationen untersucht.

In der Gruppe mit hoher CA-125 Expression und gleichzeitig hoher CD3E Infiltration im Ovar (n=25) war das Fünfjahresüberleben bei 66,8% (Zehnjahresüberleben 58,4%). Im direkten Vergleich hierzu war bei einer niedrigen CA-125 Expression bei gleichzeitig hoher CD3E Infiltration das fünfjahresüberleben bei 25,0% (Siehe Tabelle 17). Allerdings kann man hier nur von einem Trend sprechen, da durch die zu geringe Fallzahl keine statistische Relevanz ($p=0,183$) gegeben ist.

Im Netz und Peritoneum haben wir denselben Zusammenhang zwischen CA-125-Expression und CD3E-Lymphozyteninfiltration untersucht., allerdings waren die Fallzahlen noch geringer, sodass eine statistische Auswertung nicht möglich war.

Zusammenfassend konnten wir also ein verbessertes Überleben feststellen, wenn im Ovar eine hohe Infiltration von CD3E und eine hohe Expression von CA-125 vorhanden war.

Tabelle 17: Überlebenstabelle nach CA-125-Expression und CD3E-Infiltration im Ovar. Med. Überl. = Medianes Überleben; Sig. LR = Signifikanz Log Rank; 5, 10 Jahre = Überleben zu diesem Zeitpunkt.

Überlebenstabelle CA-125 und CD3E					
Ovar	N	5-JÜR	10-JÜR	Med. Überl.	Sig. Log rank
CD3E Low + CA-125 Low	14	28,6%	0,8%	34 Monate	0,190
CD3E Low + CA-125 High	108	21,4%	10,7%	13 Monate	0,190
CD3E High + CA-125 Low	8	25,0%	/	30 Monate	0,183
CD3E High + CA-125 High	25	66,8%	58,4%	/	0,183

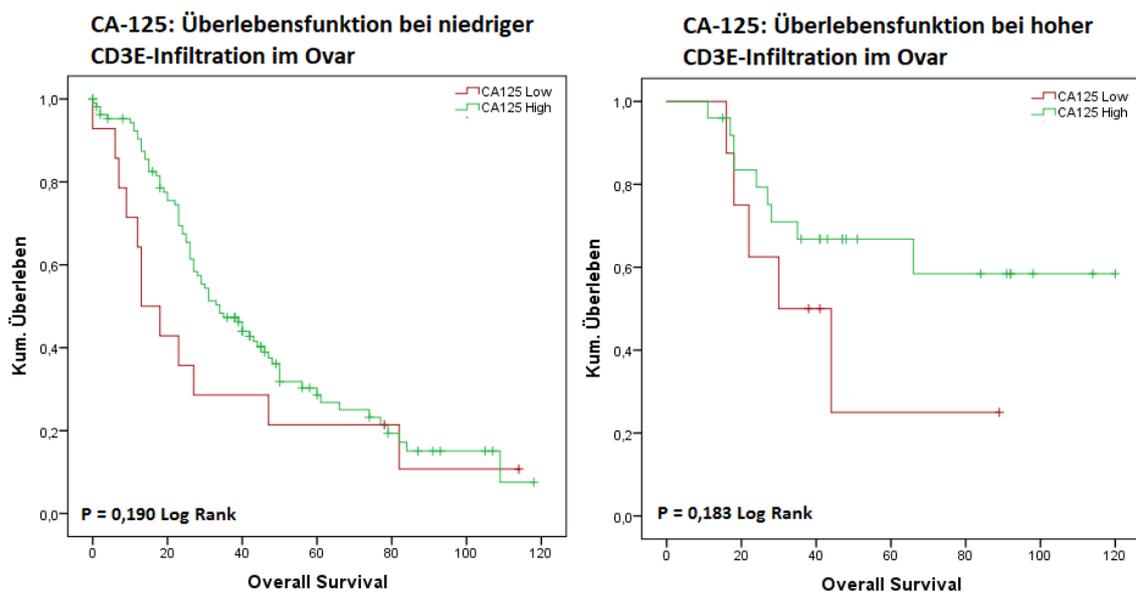


Abbildung 26: Kaplan-Meier Überlebenskurve von CA-125 im Ovar mit niedriger (rot) und hoher (grün) Expression bei niedriger CD3E-Infiltration (links) und hoher CD3E-Infiltration (rechts).

3.5.4 Wie beeinflusst die Mesothelin-Expression in Korrelation mit der Lymphozytendichte das Überleben?

Die Untersuchung der Mesothelinexpression konnte ebenfalls deutlich zeigen, dass die Patientinnen, welche mit hoher CD3E-Infiltration eine insgesamt

bessere Prognose zeigen, je nach Mesothelin-Expressionsstatus, sich nochmals stark hinsichtlich ihrer Prognose unterschieden (Siehe Abbildung 27).

Hier verhält sich die Prognose invers zu der von CA-125 im Primärtumor. Die Gruppe der Langzeitüberleber weist eine niedrige Expression von Mesothelin bei hoher CD3E-Lymphozyteninfiltration auf. Das Fünfjahresüberleben beträgt in dieser Gruppe 76,0% (Zehnjahresüberleben 67,6%), im Gegensatz zu 0% bei hoher Mesothelinexpression und gleichzeitig hoher CD3E Infiltration (Siehe Tabelle 18). Mit $p=0,000$ können wir auch von einer deutlichen statistischen Signifikanz sprechen.

Im Netz und Peritoneum haben wir denselben Zusammenhang untersucht., allerdings waren die Fallzahlen noch geringer, sodass eine statistische Auswertung, wie bei CA-125, nicht möglich war.

Abschließend konnten wir also ein verbessertes Überleben bei Patientinnen mit hoher CD3E-Infiltration und niedriger Mesothelinexpression feststellen.

Tabelle 18: Überlebenstabelle nach Mesothelin-Expression und CD3E-Infiltration. Med. Überl. = Medianes Überleben; Sig. LR = Signifikanz Log Rank; 5, 10 Jahre = Überleben zu diesem Zeitpunkt.

Überlebenstabelle Mesothelin und CD3E					
Ovar	N	5-JÜR	10-JÜR	Med. Überl.	Sig. Log rank
CD3E Low + MSLN Low	83	28,9%	15,1%	30 Monate	0,694
CD3E Low + MSLN High	27	34,0%	0,9%	43 Monate	0,694
CD3E High + MSLN Low	25	76,0%	67,6%	/	0,000
CD3E High + MSLN High	5	0,0%	0,0%	17 Monate	0,000

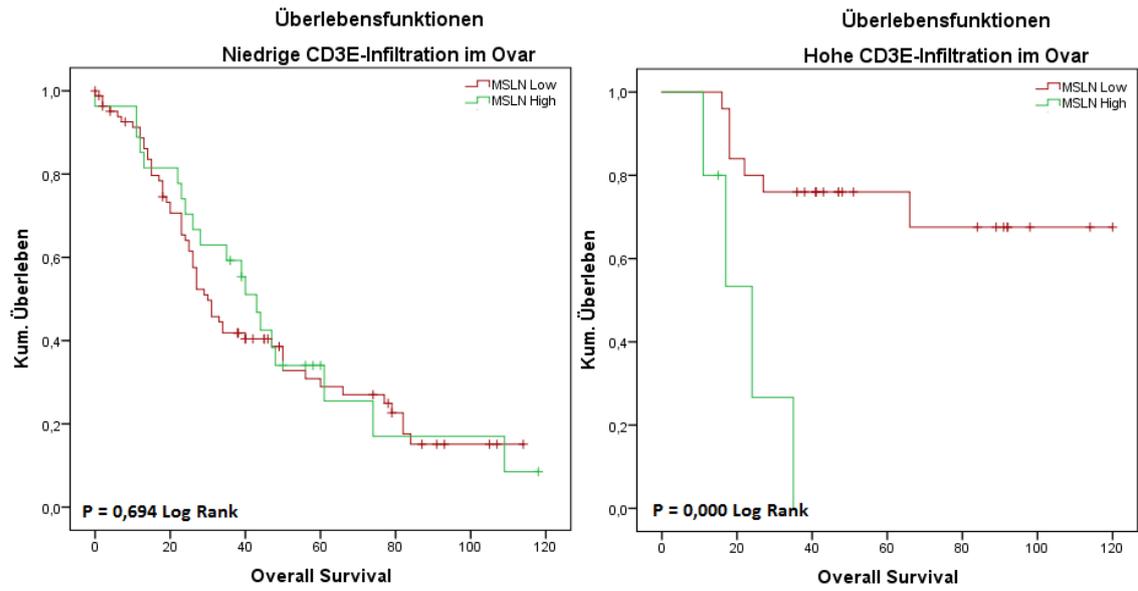


Abbildung 27: Kaplan-Meier Überlebenskurve von Mesothelin im Ovar mit niedriger (rot) und hoher (grün) Expression bei niedriger CD3E-Infiltration (links) und hoher CD3E-Infiltration (rechts).

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass das Expressionsprofil von CA-125 und Mesothelin in HGSC, kombiniert mit der Tumor-infiltration von CD3E-Lymphozyten, einen wesentlichen Einfluss auf die Prognose der Patientinnen hat und zudem, dass diese Antigene als mögliche Ziele zukünftiger Immuntherapien dienen können.

In den meisten Fällen der Primärtumoren und Metastasen, in über 85%, war das Tumorantigen CA-125 hoch exprimiert, wohingegen die Mesothelinexpression in deutlich weniger Fällen, unter 40,2%, hoch ausfiel. Außerdem haben wir, in unterschiedlichen Bereichen innerhalb des Primärtumors und der Netzmetastasen, eine homogene Expression von CA-125 und Mesothelin festgestellt. Wird die Expression dieser zwei Antigene in allen Tumorabsiedlungen verglichen, konnten wir jedoch eine teilweise Heterogenität nicht ausschließen. Diese Tumorantigene zeigten, für sich alleine, keine prognostische Relevanz. Eine hohe Infiltration von CD3E-Lymphozyten im Primärtumor, in 21,2% der Fälle, hingegen zeigte eine deutlich verbesserte Fünfjahresüberlebensrate, verglichen mit Patientinnen mit niedriger Lymphozyteninfiltration ($p=0,003$). Noch beeindruckender verbesserte sich die Überlebensrate, wenn zusätzlich zu hohen TILs noch eine Überexpression von CA-125 (nicht signifikant mit $p=0,183$), oder invers dazu eine niedrige Expression von Mesothelin (signifikant mit $p=0,000$), hinzukam.

In den wenigen bisherigen Studien zu Expressionsprofilen von Tumorantigenen im Primärtumor des Ovars, konnte gezeigt werden, dass CA-125 im Großteil der serösen Ovarialkarzinome überexprimiert wird und dass sich die Expression in den low-grade- genauso wie in den high-grade Entitäten ähnlich präsentiert (Köbel et al., 2008, Loy et al., 1992, Lagendijk et al., 1998, Høgdall et al., 2007). Die physiologische Expression von CA-125 im Epithel von verschiedenen Organen, wie z.B. der Cornea, Conjunctiva, dem Respirationstrakt und der weiblichen Geschlechtsorgane fällt dabei wesentlich niedriger aus als die

Überexpression im HGSC (Haridas et al., 2014). Um diesen Unterschied zu berücksichtigen wählten wir einen höheren Cut-Off (IRS-Score 4) als in den meisten momentanen Studien und konnten trotzdem eine CA-125-Überexpression in über 85,4% (134 von 157 Fällen) der Primärtumore beobachten.

Auch die Mesothelinexpression zeigt sich in low- sowie in high-grade Entitäten homogen (Köbel et al., 2008), wobei wir nur in 23,4% (33 von 141 Fällen) der Primärtumore eine starke Färbung beobachten konnten. Die in der momentanen Literatur als höher beschriebenen Fallzahlen positiver Mesothelinexpression (Chang et al., 1992, Ordóñez, 2003, Hassan and Ho, 2008, Hassan et al., 2005), kann durch unseren höheren cut-off Wert (IRS-Score 6), sowie durch unsere spezifischere Untersuchung nur der high-grade serösen Ovarialkarzinome, erklärt werden. Verglichen mit gesundem Gewebe, z.B. des Perikards, der Pleura oder des Peritoneums, und allen anderen bisher untersuchten Karzinomen, zeigt das Mesothelin auf mRNA- und Proteinebene, die höchste Expressionsrate im serösen Ovarialkarzinom und ebenfalls im serösen Pankreaskarzinom (Frierson Jr et al., 2003).

Die high- und low-grade Entität des serösen Ovarialkarzinoms zeigt ein ähnliches Antigenexpressionsmuster von Mesothelin und CA-125. Diese Beobachtung trifft jedoch nicht für alle Antigene zu. Untersuchungen vieler anderer Antigene haben ergeben, dass ausgehend von den Entstehungstheorien, von zwei unterschiedlichen Erkrankungen ausgegangen werden sollte und dass diese zwei Typen, genauso wie das muzinöse, klarzellige und endometrioides Ovarialkarzinom, ein ansonsten unterschiedliches Antigenexpressionsmuster aufweisen (Gilks et al., 2008, Köbel et al., 2008).

Als Verlaufsparmeter hat sich der Biomarker CA-125 im Serum bewährt, da es aufgrund der signifikanten Korrelation mit der CA-125-Expression im Tumorgewebe ($p < 0,0001$), als Surrogat-Parameter für die Tumormasse verwendet werden kann (Høgdall et al., 2007). Allerdings ist auch hier die genaue Entität des Tumors wichtig zu beachten, da jede Entität eine andere Neigung hat CA-125 zu exprimieren (Gilks et al., 2008, Mircea et al., 2009). Das seröse Ovarialkarzinom steht, bei einer Studie zur Untersuchung positiver Expression von CA-125 (n=584 Fälle), mit 85% an erster Stelle, gefolgt vom papillären (68%), dem endometrioiden (65%), dem klarzelligen (40%) und dem

undifferenzierten Karzinom (36%). An letzter Stelle steht mit niedrigster Expression das muzinöse Karzinom mit nur 12% (Høgdall et al., 2007).

In unserer Studie haben wir neben der CA-125- und Mesothelin-Expression im Primärtumor auch die der Metastasen untersucht. Vergleichbare Arbeiten zum Ovarialkarzinom liegen nach unserem Wissen momentan noch nicht vor.

Das Tumorantigen CA-125 zeigte eine überwiegend hohe Expression in allen Tumorregionen, mit einer Steigerungstendenz im Prozess der Metastasierung vom Ovar (85,4%) zum Netz (86,6%), dann zum Peritoneum (94,2%) und schließlich zu den Lymphknoten (98,4%).

Die Mesothelinexpression zeigte in deutlich weniger Fällen eine Überexpression, bei einer Steigerung der Expression vom Ovar (23,4%), zu den Lymphknoten (29,2%), zum Netz (34,0%) und schließlich zum Peritoneum (40,2%).

Diese Dynamik könnte Ausdruck der steigenden MUC16-Mesothelin-Interaktion sein, welches die Metastasierung zu begünstigen scheint (Gubbels et al., 2006a).

Um eine zuverlässige Vergleichbarkeit von Proben unterschiedlichen Ursprungs zu gewährleisten, ist das Wissen um die Verteilung der Tumorantigene essentiell. Dabei haben wir zwischen zwei morphologisch und vom Wachstumsverhalten sehr unterschiedliche Tumorbereiche unterschieden, dem Tumorzentrum und der Tumorperipherie (Infiltrationsfront). Dieselbe morphologische Differenzierung wurde erstmals von Galon et al. als „invasive margin“ (IM) und „center of tumor“ (CT) beschrieben, da sich hier die meisten Immunezellinfiltrate befinden. (Galon et al., 2012a). In diesen Regionen ist die Expression von CA-125 im Primärtumor des Ovars (n=131; p=0,274 T-Test) und in den Metastasen des Netzes (n=79; p=0,086 T-Test) homogen. Die Mesothelinexpression, welche wir ausschließlich in den Netzmetastasen untersucht haben, war in diesen Regionen ebenfalls homogen (n=80; p=0,909 T-Test). Wir können daher feststellen, dass es bei unserer Stichprobengröße im Mittel keinen Unterschied macht von wo Proben zur Untersuchung der CA-125- und Mesothelinexpression innerhalb des Ovars oder der Netzmetastasen gewonnen werden.

Um mögliche Angriffspunkte einer Immuntherapie zu eruieren, ist es ebenfalls wichtig, zu untersuchen ob sich die Antigenexpression in den Metastasen einer Tumorerkrankung verändert.

Eine homogene Expression des Antigens CA-125 konnten wir in 86,1% (74 von 86 Fällen) in Ovar und Netz und in 89,2% (66 von 74 Fällen) in Ovar und Peritoneum, feststellen. In 72,1% (34 von 47 Fällen) war die Expression in allen drei Lokalisationen homogen. Bei weiteren statistischen Analysen können wir jedoch eine teilweise Heterogenität in Ovar und Lymphknoten ($r=0,223$ Korrelationsanalyse; $p=0,090$), sowie Ovar und Peritoneum ($p=0,000$ T-Test; $n=74$) nicht ausschließen. Unter Berücksichtigung unserer Fallgruppengröße müsste diese Erkenntnis jedoch mit größeren Fallgruppen überprüft werden.

Homogenität bei der Expression von Mesothelin, konnten wir in 79,8% (63 von 79 Fällen) in Ovar und Netz, sowie in 72,1% (44 von 61 Fällen) in Ovar und Peritoneum, feststellen. Beim Betrachten aller drei Lokalisationen war die Expression in 64,9% (24 von 37 Fällen) homogen. Außerdem konnten wir in allen Lokalisationen, Ovar und Netz ($r=0,650$; $p=0,000$), Ovar und Peritoneum ($r=0,425$; $p=0,000$), sowie Ovar und Lymphknoten ($r = 0,359$; $p = 0,008$), eine lineare Korrelation erkennen. Allerdings können wir eine Heterogenität in den Lokalisationen Ovar und Netz ($p=0,039$ T-Test; $n=79$) nicht ausschließen.

Wir können hiermit also zeigen, dass es keinen Unterschied macht wo innerhalb des Primärtumors oder einer Netzmetastase eine Stichprobe gewonnen wird, dass es aber einen Unterschied machen könnte, ob eine Stichprobe aus einer Metastase mit einer aus dem Primärtumor verglichen wird.

Die anfangs beschriebene Divergenz zwischen high- und low-grade Entität schlägt sich ebenfalls in der Untersuchung der prognostischen Bedeutung des Expressionsmusters von CA-125 und Mesothelin, nieder. Es konnte gezeigt werden, dass im HGSC eine hohe CA-125 Expression mit einer signifikant günstigeren Prognose und eine niedrige mit einer schlechteren Prognose ($p=0,0003$) einhergeht (Høgdall et al., 2007). Im low-grade serösen Karzinom konnte kein Zusammenhang beobachtet werden. Wir konnten in unserem Kollektiv hingegen keinen signifikanten Einfluss ($p= 0,083$) von CA-125 im HGSC auf das Überleben der Patientinnen feststellen, allerdings war unser

Kollektiv mit 157 Fällen um mehr als die Hälfte kleiner. Im Gegensatz zu diesen beiden Ergebnissen wurde in einer weiteren Studie ein 2-mal höheres Mortalitätsrisiko bei hoher CA-125 Expression, im Vergleich zu keiner Expression, festgestellt (de la Cuesta et al., 1999). Diese Aussage hat jedoch ihre Limitation da die Fallgruppe mit 50 EOC sehr klein ist und zudem aus unterschiedlichen Entitäten besteht. Wenn wir davon ausgehen, dass eine hohe CA-125-Expression im Tumor eine günstigere Prognose bedingen könnte, würde es zu der Annahme passen, dass dieses Tumorantigen das Immunsystem zu einer stärkeren Immunantwort gegen den Tumor anregen kann.

Yen et al. haben in einer Studie mit 167 high-grade und 31 low-grade serösen Ovarialkarzinomen die Mesothelinexpression in den Primärtumoren immunhistochemisch untersucht und mit dem Überleben korreliert. Eine Gruppe von 105 dieser Patienten mit optimalem chirurgischem Ergebnis und postoperativer Chemotherapie wurden aufgeteilt in zwei Gruppen, eine mit diffuser und stärkerer Mesothelinexpression (n=29) und eine mit niedrigerer, fokaler Expression (n=76). Das Mediane Überleben der ersten Gruppe war mit 60 Monaten signifikant besser als das der zweiten Gruppe mit 34 Monaten (p=0,023) (Yen et al., 2006). Dieses Ergebnis konnten wir mit unserer Arbeit nicht verifizieren. Wir haben sogar einen gegenteiligen Effekt beobachtet. Bei hoher Mesothelinexpression (33 von 144 Fällen) beobachteten wir eine Fünfjahresüberlebensrate von 39,6%, im Gegensatz zu 29,9% bei niedriger Expression (108 von 144 Fällen), allerdings ohne statistische Signifikanz (p=0,252). Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten damit zusammenhängen, dass Yen et al. einen cut-off bei >5% gefärbten Zellen, vergleichbar mit einem IRS-Score von 1 wählten, wobei unser cut-off bei IRS \geq 6 lag. Außerdem haben wir keine Fälle nach Resektionsstatus ausgeschlossen. Anhand unseren Ergebnissen erscheint es uns daher sinnvoll, nicht nur nach dem Vorhandensein einer Mesothelin-Expression zu unterscheiden, sondern einen cut-off festzulegen der eine stark positive Färbung von einer schwächeren trennt, da manch gesundes Gewebe Mesothelin in geringeren Mengen ebenfalls exprimieren kann (Hassan et al., 2004). Eine hohe Mesothelinexpression als negativer Prognoseparameter würde mit dem

momentanen Wissensstand einhergehen, da es die Zellmotilität und Metastasierung zu begünstigen scheint (Chang et al., 2012).

Wie schon in einigen Arbeiten beschrieben, scheint die Anzahl, die Zellart und der Ort von Immunzellinfiltraten, die sog. „Immune contexture“ eine wesentliche Rolle zum overall- und disease free Survival zu spielen (Galon et al., 2007, Fridman et al., 2012). Diese Beobachtung wurde erstmals am kolorektalen Karzinom und später an vielen anderen Krebserkrankungen, unter anderem dem Ovarialkarzinom, beschrieben (Pages et al., 2010, Ascierto et al., 2011). Vor allem T-Lymphozyten (CD3+) und zytotoxische T-Zellen (CD8+), sowie Memory T-Zellen (CD45RO+) scheinen dabei einen prognostischen Einfluss zu haben (Galon et al., 2012a). In unserer Studie haben wir deshalb zusätzlich zu den Tumorantigenen auch die Infiltration von CD8+ und CD3+ Lymphozyten untersucht und konnten einen prognostischen Effekt lediglich für die CD3+-Lymphozyten im Epithel (CD3E) feststellen.

Wiederum zur exakten Probengewinnung und um mögliche Angriffspunkte einer Immuntherapie zu eruieren, haben wir deshalb die Verteilung der CD3E-Lymphozyten, mit einem cut-off bei ≥ 7 Lymphozyten pro HPF, im Primärtumor und den Metastasen untersucht.

Im Ovar zeigten nur 21,2% (33 von 156 Fällen), im Netz 29,2% (28 von 96 Fällen) und im Peritoneum 20,9% (18 von 86 Fällen) der Fälle eine hohe Infiltration von CD3E-Lymphozyten. Eine homogene Verteilung konnten wir in den Lokalisationen Ovar und Netz in 73,8% (62 von 84 Fällen) und in den Lokalisationen Ovar und Peritoneum sogar in 80,8% (59 von 84 Fällen), feststellen. Beim Vergleich aller drei Lokalisationen miteinander konnten wir in 63,4% (26 von 41 Fällen) eine homogene Infiltration erkennen. Eine signifikante lineare Korrelation zeigte sich bei der Infiltration von CD3E in Ovar und Netz ($r=0,542$, $p=0,000$), sowie Ovar und Peritoneum ($r=0,385$; $p=0,001$). Allerdings konnten wir in den Lokalisationen Ovar und Netz eine Heterogenität nicht vollständig ausschließen ($p=0,001$ T-Test).

Arbeiten von Galon et al. zum kolorektalen Karzinom zeigten, dass die Verwendung eines „Immunoscores“, eine bessere prognostische Aussagekraft

besitzt als das AJCC/UICC und TNM System (Galon et al., 2012b, Galon et al., 2012a). Dabei werden einmal im IM und im CT eines Tumors zwei Lymphozytenpopulationen (CD8+, CD3+ oder CD45RO+) ausgezählt und in einem Score von „I0“ bis „I4“ eingeteilt. In einer weiteren Studie zum kolorektalen Karzinom (n= 602) wurde aufgezeigt, dass nur 4,8% der Patienten mit einem hohen Immunoscore, dagegen aber 72% der Patienten mit einem niedrigen Immunoscore, nach fünf Jahren ein Rezidiv aufzeigten (Pages et al., 2009). Hier wurden CD8+ und Memory CD45RO T-Lymphozyten ausgezählt. Im malignen Melanom wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Erdag et al. haben in einer Studie 183 Melanom Metastasen untersucht und in 3 Immungruppen unterteilt: Gruppe A mit keiner Infiltration von Immunzellen, Gruppe B mit Immunzellinfiltration ausschließlich in der Nähe von intratumoralen Gefäßneubildungen und Gruppe C mit diffuser Infiltration. Diese Gruppen zeigten ein medianes Überleben von 15, 23 und 130 Monaten (Erdag et al., 2012).

In Anlehnung an den „Immunoscore“ haben wir unsere Überlebensanalysen mit CD3E TILs gerechnet. Die Patientinnen mit hoher CD3E-Infiltration hatten eine Fünfjahresüberlebensrate von 51,6% gegenüber einer von 27,9% bei niedriger Lymphozyteninfiltration ($p=0,003$).

Diese Überlebensrate verbesserte sich nochmals auf 66,8%, wenn zusätzlich zur hohen CD3E-Infiltration noch eine positive Expression von CA-125 vorlag. Im direkten Vergleich hierzu war bei einer niedrigen CA-125 Expression bei gleichzeitig hoher CD3E Infiltration das fünfjahresüberleben bei 25,0%. So könnte also eine Überexpression von CA-125 gekoppelt mit einer hohen Lymphozyteninfiltration einen positiven prognostischen Effekt haben, obwohl wir keine statistische Signifikanz erreichen konnten ($p=0,183$). Aus dieser Beobachtung können wir jedoch trotzdem vermuten, dass eine hohe Expression von CA-125 eine verstärkte anti-tumor-Immunantwort anregen kann. Matsushita et al. haben bei Fällen mit hoher Infiltration von CD8+ Lymphozyten in Korrelation mit hoher CA-125 Expression ebenfalls eine verbesserte Prognose feststellen können. In dieser Arbeit schien eine hohe CA-125 Expression, wie bei Høgdall et al., für sich alleine schon eine bessere Prognose zu haben. Die durchschnittliche Lymphozyteninfiltration war in CA-125 positiven Tumoren

außerdem höher als in CA-125 negativen Tumoren (Matsushita et al., 2003). Da diese Beobachtungen jedoch an einem Kollektiv von nur 31 Fällen, mit 20 Serösen, 7 Muzinösen und 4 Klarzelligen Karzinomen, gemacht wurden, kann eine limitierte Aussagekraft vermutet werden.

Auch die Mesothelinexpression haben wir mit dem Vorhandensein von CD3E TILs korreliert. Die Gruppe mit vielen TILs haben wir in zwei weitere Gruppen nach hoher und niedriger Mesothelinexpression aufgeteilt, und erhielten zwei prognostisch vollkommen unterschiedliche Krankheitsverläufe. Die erste Gruppe hatte eine Fünfjahresüberlebensrate von 0% (Medianes Überleben 17 Monate), die zweite hingegen eine wesentlich und signifikant bessere Prognose mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 67,6% ($p=0,000$). Somit konnten wir eine Gruppe von Langzeitüberleber feststellen, nämlich die mit hohen TILs und niedriger Mesothelinexpression.

Mit diesen Beobachtungen konnten wir also zeigen, dass eine hohe Infiltration von CD3E-Lymphozyten, sprich eine starke Immunantwort der Patientin, zu einem verbesserten Überleben führt. Wenn dazu noch eine hohe CA-125 Expression oder niedrige Mesothelinexpression, also eine bestimmte Tumorbiologie, vorhanden ist, verbessert sich die Prognose nochmals.

Eine Arbeit von Leong Huei San et al., welche anhand genexpressions-Microarray 4 verschiedene Subtypen (C1, C2, C4, C5) des HGSC beschreibt, geht mit diesen Beobachtungen einher. Der Subtyp C2 (immunoreaktiver Typ) zeigt eine hohe T-Zell-Infiltration und eine günstige Prognose. Der Subtyp C5 (proliferativer Typ) zeigt eine niedrige CA-125-Expression und ist prognostisch ungünstig. Weiterhin werden noch der Subtyp C1 (mesenchymaler Typ), mit myofibroblastischer Infiltration und schlechter Prognose und der Subtyp C4 (differenzierter Typ) mit Ähnlichkeiten zu serösen borderline Tumoren und mittlerer Prognose, beschrieben (San et al., 2015).

Die Größe unseres Kollektivs, bestehend aus 157 Patientinnen mit 97-64 Proben dazugehöriger Metastasen, schränkt die Aussagekraft manch unserer Ergebnisse etwas ein. Vor allem bei Aufspaltung des Kollektivs nach

Metastasenregion, Status der Antigenexpression sowie der Lymphozyteninfiltration, waren die einzelnen Gruppen zu klein um verwertbare statistische Analysen machen zu können.

In unserer Arbeitsgruppe wurden einige Tumorantigene identifiziert, welche im Ligandom HGSC vorhanden sind. Genauer gesagt, Tumorantigene welche nicht nur als Protein auf der Zelloberfläche, sondern auch auf MHC I und MHC II Liganden überexprimiert werden (Schuster et al., 2017). Da wir lediglich die zwei Antigene mit der höchsten Expression untersucht haben, gäbe es noch weitere Antigene, welche genauer untersucht werden könnten.

Da es sich in unserer Arbeit um eine retrospektive Studie handelt, zeigen unsere Beobachtungen einen Zusammenhang zwischen verschiedenen Parametern, wobei wir nicht auf direkte Kausalität schließen können und ebenso wenig alle Störfaktoren berücksichtigen können. Da der Großteil der Patientinnen ebenfalls eine adjuvante Chemotherapie erhielten, können wir unsere Beobachtungen nicht auf die reine Tumorbiologie übertragen, sondern müssen diese therapeutischen Einflüsse berücksichtigen. Es wäre daher von großem Interesse diese Hypothesen mit weiterführenden prospektiven Studien und einem größeren Kollektiv zu überprüfen.

Der momentane Wissensstand kann einen Ausblick über andere Tumor-assoziierte Antigene beim epithelialen Ovarialkarzinom liefern:

Der Serologisch Verlauf, sowie der immunhistochemische Nachweis von z.B. Her2/neu zeigt beim Ovarialkarzinom, im Gegensatz zu seiner wichtigen klinischen Rolle beim Mammakarzinom, keine prognostische Relevanz (Hoopmann et al., 2005). MUC-1, respektive CA 15-3 (Van Elssen et al., 2010, Dong et al., 1997, Wang et al., 2007), Galectin-1 (van den Brûle et al., 2003) und SOX2 (Pham et al., 2013) hingegen werden vom epithelialen Ovarialkarzinom, im Gegensatz zum gesunden Ovar, überexprimiert und könnten somit ein weiteres potentielles Ziel für eine Immuntherapie darstellen.

Trotz allem gäbe es noch genügend weitere Tumorantigene die in diesem Zusammenhang untersucht werden könnten (Schuster et al., 2017).

Für zukünftige Arbeiten wäre es außerdem interessant die prognostische Bedeutung der Tumorantigene CA-125, Mesothelin und weitere, für sich alleine

weiter zu untersuchen, da die Ergebnisse verschiedener Arbeiten teilweise weit auseinandergehen.

Würde die Antigenexpression jedes einzelnen Subtyps der epithelialen Ovarialkarzinome identifiziert werden, könnten perspektivisch exaktere Verlaufskontrollen, verbesserte screening Methoden, sowie eine genauere Prognosebestimmung, vorgenommen werden.

Ein größeres Ziel hingegen könnte, in Anlehnung an die Arbeiten von Galon et al. zum kolorektalen Karzinom, die Entwicklung eines Immunoscores für das HGSC sein (Galon et al., 2006, Galon et al., 2012a). Die genauere Untersuchung weiterer Lymphozytenpopulationen, beispielsweise CD8+, CD103+, CD45RO+ und TReg, wäre in diesem Zusammenhang ebenfalls interessant.

Auch der Zusammenhang zwischen Tumorantigenexpression und der Infiltration von intratumoralen Lymphozyten könnte zu einer genaueren Prognosebestimmung, sowie zur Entwicklung spezifischer Immuntherapien beitragen.

Bisherige Ansätze von Monotherapien verschiedener peptid-Vakzine bei fortgeschrittenen immunogenen Tumoren konnten lediglich eine limitierte Wirksamkeit aufzeigen (Rosenberg et al., 2004). Daher wird momentan verstärkt nach spezifischeren Tumorantigenen gesucht, sowie eine Verbesserung der Verabreichungsform der Vakzine und der Entwicklung von Kombinationstherapien mit beispielsweise Immunmodulatoren erprobt (Kandalaft et al., 2011). Beispielsweise wurde eine duale Peptidvakzine mit tumor-assoziierten Kohlenhydrat- und Muzin-Antigenen entwickelt, in der Annahme, dass mehrere Angriffspunkte am Tumor zu einer verstärkten Immunstimulation führen kann (Zhu et al., 2009). In einer klinischen Studie wurde die Wirksamkeit, sowie die Nebenwirkungen einer Multipeptidvakzine aus den Tumorantigenen MAGE-A1, FBP, und Her2/neu an Patientinnen mit Ovarial-Ca, Peritoneal-Ca oder Tubenkarzinom erprobt. Die Nebenwirkungen konnten als sehr gering eingestuft werden, bei trotzdem vorhandener Immunstimulation gegen die geimpften Antigene (Chianese-Bullock et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse lieferte eine weitere klinische Studie mit der Verabreichung einer Vakzine mit NY-ESO-1, einem cancer testis Antigen, an

Patientinnen mit Ovarialkarzinom (Diefenbach et al., 2008). Das Ausmaß der Immunstimulation ließ jedoch noch zu wünschen übrig, sodass die Kombination von Multipeptidvakzinen mit weiteren Immunmodulatoren vielversprechend sein könnte (Liu et al., 2010). Bei Patientinnen mit Ovarial-, Mamma- und nicht-keinzelligem Bronchial-Ca und entsprechender Überexpression im Tumorgewebe, wurde Her2/neu als Vakzine mit einem Adjuvans erprobt und eine verbesserte Prognose abhängig von der T-Zell-Antwort festgestellt (Disis et al., 2002).

Daher kann unsere Arbeit ebenfalls einen Beitrag zur Entschlüsselung des Antigenexpressionsmusters in unterschiedlichen Absiedlungen des high-grade serösen Ovarialkarzinoms, sowie zur Tumorummunantwort, liefern. Hieran können weitere Arbeiten anknüpfen um beispielsweise die personalisierte Immuntherapie gegen das high-grade seröse Ovarialkarzinom voranzutreiben.

5. Zusammenfassung

Zielsetzung: Das Ovarialkarzinom ist der zweithäufigste gynäkologische Tumor mit der höchsten Letalitätsrate. Die epithelialen Karzinome machen fast 90% aller malignen Ovarialtumoren aus. Davon ist das high-grade seröse Ovarialkarzinom (HGSC), welches von dem low-grade serösen, dem endometrioiden, dem klarzelligen und muzinösen Karzinom unterschieden wird, der häufigste Histotyp. Das Fünfjahresüberleben bei HGSC, welches in dieser Arbeit untersucht wird, liegt derzeit bei 30-40%.

Das HGSC ist mit der Expression Tumor-spezifischer Antigene, welche vom Immunsystem erkannt werden, intrinsisch immunogen. In aktuellen Studien unserer Arbeitsgruppe wurden in umfassenden proteomischen Analysen des HLA-Ligandoms CA-125 und Mesothelin als die am häufigsten überexprimierten HLA-Liganden identifiziert. In dieser Arbeit haben wir deshalb zum einen das Expressionsmuster von CA-125 und Mesothelin, sowie die CD3+ und CD8+ tumor infiltrierenden Lymphozyten (TILs) in Primärtumor und Metastasen, und zum anderen deren prognostische Bedeutung, untersucht.

Material und Methoden: Es wurde ein retrospektives Patientinnenkollektiv von 1999-2008, bestehend aus 154 Patientinnen mit HGSC mit Follow-Up Daten von bis zu 10 Jahren erstellt. Von diesem Kollektiv haben wir Tissue-microarrays (TMAs) erstellt und immunhistochemische Färbungen von CA-125, Mesothelin, CD3+ und CD8+ Lymphozyten angefertigt, welche nach einem semiquantitativen Scoring-System, bzw. Anzahl der Lymphozyten pro HPF, ausgewertet wurden.

Ergebnisse: In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass das Expressionsprofil von CA-125 und Mesothelin in HGSC, kombiniert mit der Tumor-infiltration von epithelialen CD3+ Lymphozyten (CD3E), einen wesentlichen Einfluss auf die Prognose der Patientinnen hat.

In über 85% der Primärtumoren und Metastasen war das CA-125 hoch exprimiert, wohingegen die Mesothelinexpression in deutlich weniger Fällen, in

40,2%, hoch ausfiel. Außerdem haben wir, in unterschiedlichen Bereichen innerhalb des Primärtumors und der Netzmetastasen, eine homogene Expression von CA-125 und Mesothelin festgestellt. Wird die Expression dieser zwei Antigene in allen Tumorabsiedlungen verglichen, lässt sich eine teilweise Heterogenität in 27,9% bzw. 35,9% der Fälle zeigen. Diese Tumorantigene zeigten, für sich alleine, keine prognostische Relevanz. Eine hohe Infiltration von CD3E-Lymphozyten im Primärtumor, in 21,2% der Fälle, hingegen zeigte eine deutlich verbesserte Fünfjahresüberlebensrate von 58,1% im Gegensatz zu 27,9% bei Patientinnen mit niedriger Lymphozyteninfiltration ($p=0,003$).

Diese prognostisch günstigere Gruppe mit hoher Lymphozyteninfiltration haben wir nach Antigenexpressionsstatus weiter aufgeteilt:

Die Fünfjahresüberlebensrate verbesserte sich nochmals, wenn zusätzlich zu hohen TILs noch eine Überexpression von CA-125 (Fünfjahresüberlebensrate 66,8%) hinzukam. Im Vergleich dazu lag bei gleichzeitig niedriger CA-125-Expression das Fünfjahresüberleben bei 25,0% (nicht signifikant mit $p=0,183$).

Bei niedriger Mesothelinexpression verbessert sich die Prognose der Gruppe mit hohen TILs nochmals, mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 76,0% im Vergleich zu 0% bei hoher Mesothelinexpression (signifikant mit $p=0,000$).

Schlussfolgerung: Aus unserer Arbeit geht hervor, dass Proben aus unterschiedlichen Bereichen im Netz und Ovar zuverlässig vergleichbar sind. Proben aus den Metastasen können jedoch nicht zuverlässig mit Proben aus dem Ovar verglichen werden, da wir eine Heterogenität der Antigenexpression in einem Teil der Fälle zeigen konnten (bei 27,9% für CA-125 bzw. 35,9% für Mesothelin). Diese Heterogenität ist von Bedeutung, wenn es darum geht mögliche Angriffspunkte einer Immuntherapie festzustellen. Um den Tumor einer Patientin ausreichend zu charakterisieren, sollten mehrere Lokalisationen untersucht werden.

Aus unseren Ergebnissen schließen wir weiterhin, dass eine hohe Infiltration von CD3-positiven Lymphozyten mit einer signifikant besseren Prognose einhergeht. Durch die zusätzlich hohe Expression von CA-125 verbessert sich die Prognose nochmals (jedoch ohne statistische Signifikanz), vermutlich durch die damit verbundene Immunstimulation. Eine zusätzlich hohe Mesothelinexpression zeigte sich als negativer Prognoseparameter (statistisch

signifikant), da es vermutlich durch erhöhte Zellmotilität und Chemoresistenz die Metastasierung und Krankheitsprogredienz begünstigt.

Eine Heterogenität dieser Parameter in der Expression zwischen Primärtumoren und Metastasen könnte die Aussagekraft dieser Biomarker beeinflussen, zum Beispiel im Hinblick auf die Entwicklung und den Einsatz von personalisierten Multipeptidvakzinen.

An diese Ergebnisse können weitere Arbeiten anknüpfen, um zur personalisierten Immuntherapie gegen das high-grade seröse Ovarialkarzinom einen Beitrag zu leisten.

6. Literaturverzeichnis

- ADAMS, S. F., LEVINE, D. A., CADUNGOG, M. G., HAMMOND, R., FACCIABENE, A., OLVERA, N., RUBIN, S. C., BOYD, J., GIMOTTY, P. A. & COUKOS, G. 2009. Intraepithelial T cells and tumor proliferation: impact on the benefit from surgical cytoreduction in advanced serous ovarian cancer. *Cancer*, 115, 2891-2902.
- ARGÜESO, P., SPURR-MICHAUD, S., RUSSO, C. L., TISDALE, A. & GIPSON, I. K. 2003. MUC16 Mucin Is Expressed by the Human Ocular Surface Epithelia and Carries the H185 Carbohydrate Epitope. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 2487-2495.
- ASCIERTO, M. L., DE GIORGI, V., LIU, Q., BEDOGNETTI, D., SPIVEY, T. L., MURTAS, D., UCCELLINI, L., AYOTTE, B. D., STRONCEK, D. F. & CHOUCANE, L. 2011. An immunologic portrait of cancer. *Journal of Translational Medicine*, 9.
- BAST, R. C., BADGWELL, D., LU, Z., MARQUEZ, R., ROSEN, D., LIU, J., BAGGERLY, K. A., ATKINSON, E. N., SKATES, S., ZHANG, Z., LOKSHIN, A., MENON, U., JACOBS, I. & LU, K. 2005. New tumor markers: CA125 and beyond. *International Journal of Gynecological Cancer*, 15, 274-281.
- BATZLER, W. U., GIERSIEPEN, K., HENTSCHEL, S., HUSMANN, G., KAATSCH, P., KATALINIC, A., KIESCHKE, J., KRAYWINKEL, K., MEYER, M., STABENOW, R., STEGMAIER, C. & BERTZ, J. 2008. Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut.
- BELISLE, J. A., HORIBATA, S., JENNIFER, G. A., PETRIE, S., KAPUR, A., ANDRÉ, S., GABIUS, H.-J., RANCOURT, C., CONNOR, J., PAULSON, J. C. & PATANKAR, M. S. 2010. Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes. *Molecular Cancer*, 9, 118.
- BOIVIN, M., LANE, D., PICHÉ, A. & RANCOURT, C. 2009. CA125 (MUC16) tumor antigen selectively modulates the sensitivity of ovarian cancer cells to genotoxic drug-induced apoptosis. *Gynecologic Oncology*, 115, 407-413.
- BÖSMÜLLER, H.-C., WAGNER, P., PEPPER, J. K., SCHUSTER, H., PHAM, D. L., GREIF, K., BESCHORNER, C., RAMMENSEE, H.-G., STEVANOVIC, S., FEND, F. & STAEBLER, A. 2016. Combined Immunoscore of CD103 and CD3 Identifies Long-Term Survivors in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 26, 671-679.
- BRISTOW, R. E., TOMACRUZ, R. S., ARMSTRONG, D. K., TRIMBLE, E. L. & MONTZ, F. J. 2002. Survival Effect of Maximal Cytoreductive Surgery for Advanced Ovarian Carcinoma During the Platinum Era: A Meta-Analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 20, 1248-1259.
- BURGESS, A. & SCHMALFELDT, B. 2011. Ovarialkarzinom: Diagnostik und Therapie. *Dtsch Arztebl International*, 108, 635-641.
- CARLSON, J. W., MIRON, A., JARBOE, E. A., PARAST, M. M., HIRSCH, M. S., LEE, Y., MUTO, M. G., KINDELBERGER, D. & CRUM, C. P. 2008. Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma: Its Potential Role in Primary Peritoneal Serous Carcinoma and Serous Cancer Prevention. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 4160-4165.

- CHANG, K. & PASTAN, I. 1996. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 136-140.
- CHANG, K., PASTAN, I. & WILLINGHAM, M. C. 1992. Isolation and characterization of a monoclonal antibody, K1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium. *International Journal of Cancer*, 50, 373-381.
- CHANG, M. C., CHEN, C. A., CHEN, P. J., CHIANG, Y. C., CHEN, Y. L., MAO, T. L., LIN, H. W., LIN CHIANG, W. H. & CHENG, W. F. 2012. Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways. *Biochem J*, 442, 293-302.
- CHEN, S.-H., HUNG, W.-C., WANG, P., PAUL, C. & KONSTANTOPOULOS, K. 2013. Mesothelin Binding to CA125/MUC16 Promotes Pancreatic Cancer Cell Motility and Invasion via MMP-7 Activation. *Scientific Reports*, 3.
- CHENG, W. F., HUANG, C. Y., CHANG, M. C., HU, Y. H., CHIANG, Y. C., CHEN, Y. L., HSIEH, C. Y. & CHEN, C. A. 2009. High mesothelin correlates with chemoresistance and poor survival in epithelial ovarian carcinoma. *British Journal of Cancer*, 100, 1144-1153.
- CHI, D. S., EISENHAUER, E. L., ZIVANOVIC, O., SONODA, Y., ABU-RUSTUM, N. R., LEVINE, D. A., GUILLE, M. W., BRISTOW, R. E., AGHAJANIAN, C. & BARAKAT, R. R. 2009. Improved progression-free and overall survival in advanced ovarian cancer as a result of a change in surgical paradigm. *Gynecologic Oncology*, 114, 26-31.
- CHIANESE-BULLOCK, K. A., IRVIN, W. P. J., PETRONI, G. R., MURPHY, C., SMOLKIN, M., OLSON, W. C., COLEMAN, E., BOERNER, S. A., NAIL, C. J., NEESE, P. Y., YUAN, A., HOGAN, K. T. & SLINGLUFF, C. L. J. 2008. A Multi-peptide Vaccine is Safe and Elicits T-cell Responses in Participants With Advanced Stage Ovarian Cancer. *Journal of Immunotherapy*, 31, 420-430.
- CHU, C. S., KIM, S. H., JUNE, C. H. & COUKOS, G. 2008. Immunotherapy opportunities in ovarian cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 8, 243-257.
- CLARKE, B., TINKER, A. V., LEE, C. H., SUBRAMANIAN, S., VAN DE RIJN, M., TURBIN, D., KALLOGER, S., HAN, G., CEBALLOS, K., CADUNGOG, M. G., HUNTSMAN, D. G., COUKOS, G. & GILKS, C. B. 2009. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Mod Pathol*, 22, 393-402.
- COLEMAN, R. L., MONK, B. J., SOOD, A. K. & HERZOG, T. J. 2013. Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 10, 211-224.
- CUI, H. 2016. Die Rolle von TIMP-1 in der tumorfördernden Stressantwort in Tumorzelle und Wirt *Unv. Diss.* Universität München.
- DE LA CUESTA, R., MAESTRO, M. L., SOLANA, J., VIDART, J. A., ESCUDERO, M., IGLESIAS, E. & VALOR, R. 1999. Tissue quantification of CA 125 in epithelial ovarian cancer. *The International journal of biological markers*, 14, 106-114.
- DIEBOLD, J. 2014. Seröse Tumoren des Ovars. *Der Pathologe*, 35, 314-321.
- DIEFENBACH, C. S. M., GNJATIC, S., SABBATINI, P., AGHAJANIAN, C., HENSLEY, M. L., SPRIGGS, D. R., IASONOS, A., LEE, H., DUPONT, B., PEZZULLI, S., JUNGBLUTH, A. A., OLD, L. J. & DUPONT, J. 2008. Safety and Immunogenicity Study of NY-ESO-1b Peptide and Montanide ISA-51

- Vaccination of Patients with Epithelial Ovarian Cancer in High-Risk First Remission. *Clinical Cancer Research*, 14, 2740-2748.
- DISIS, M. L., GOOLEY, T. A., RINN, K., DAVIS, D., PIEPKORN, M., CHEEVER, M. A., KNUTSON, K. L. & SCHIFFMAN, K. 2002. Generation of T-Cell Immunity to the HER-2/neu Protein After Active Immunization With HER-2/neu Peptide-Based Vaccines. *Journal of Clinical Oncology*, 20, 2624-2632.
- DONG, Y., WALSH, M. D., CUMMINGS, M. C., WRIGHT, R. G., KHOO, S. K., PARSONS, P. G. & MCGUCKIN, M. A. 1997. Expression of MUC1 and MUC2 mucins in epithelial ovarian tumours. *The Journal of Pathology*, 183, 311-317.
- DUBEAU, L. 1999. The Cell of Origin of Ovarian Epithelial Tumors and the Ovarian Surface Epithelium Dogma: Does the Emperor Have No Clothes? *Gynecologic Oncology*, 72, 437-442.
- EARLE, C. C., SCHRAG, D., NEVILLE, B. A., YABROFF, K. R., TOPOR, M., FAHEY, A., TRIMBLE, E. L., BODURKA, D. C., BRISTOW, R. E., CARNEY, M. & WARREN, J. L. 2006. Effect of Surgeon Specialty on Processes of Care and Outcomes for Ovarian Cancer Patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 172-180.
- ENGEL, J., ECKEL, R., SCHUBERT-FRITSCHLE, G., KERR, J., KUHN, W., DIEBOLD, J., KIMMIG, R., REHBOCK, J. & HÖLZEL, D. 2002. Moderate progress for ovarian cancer in the last 20 years: prolongation of survival, but no improvement in the cure rate. *European Journal of Cancer*, 38, 2435-2445.
- ERDAG, G., SCHAEFER, J. T., SMOLKIN, M. E., DEACON, D. H., SHEA, S. M., DENGEL, L. T., PATTERSON, J. W. & SLINGLUFF, C. L. 2012. Immunotype and Immunohistologic Characteristics of Tumor-Infiltrating Immune Cells Are Associated with Clinical Outcome in Metastatic Melanoma. *Cancer Research*, 72, 1070.
- ERICKSON, B. K., CONNER, M. G. & LANDEN, C. N. 2013. The role of the fallopian tube in the origin of ovarian cancer. *American journal of obstetrics and gynecology*, 209, 409-414.
- FATHALLA, M. F. 1971. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*, 2, 163.
- FRIDMAN, W. H., PAGES, F., SAUTES-FRIDMAN, C. & GALON, J. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 12, 298-306.
- FRIERSON JR, H. F., MOSKALUK, C. A., POWELL, S. M., ZHANG, H., CERILLI, L. A., STOLER, M. H., CATHRO, H. & HAMPTON, G. M. 2003. Large-scale molecular and tissue microarray analysis of mesothelin expression in common human carcinomas. *Human Pathology*, 34, 605-609.
- GALON, J., COSTES, A., SANCHEZ-CABO, F., KIRILOVSKY, A., MLECNIK, B., LAGORCE-PAGÈS, C., TOSOLINI, M., CAMUS, M., BERGER, A., WIND, P., ZINZINDOHOUE, F., BRUNEVAL, P., CUGNENC, P.-H., TRAJANOSKI, Z., FRIDMAN, W.-H. & PAGÈS, F. 2006. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science*, 313, 1960-1964.
- GALON, J., FRIDMAN, W.-H. & PAGÈS, F. 2007. The Adaptive Immunologic Microenvironment in Colorectal Cancer: A Novel Perspective. *Cancer Research*, 67, 1883-1886.
- GALON, J., PAGÈS, F., MARINCOLA, F. M., ANGELL, H. K., THURIN, M., LUGLI, A., ZLOBEC, I., BERGER, A., BIFULCO, C., BOTTI, G.,

- TATANGELO, F., BRITTEN, C. M., KREITER, S., CHOUCANE, L., DELRIO, P., ARNDT, H., ASSLABER, M., MAIO, M., MASUCCI, G. V., MIHM, M., VIDAL-VANACLOCHA, F., ALLISON, J. P., GNJATIC, S., HAKANSSON, L., HUBER, C., SINGH-JASUJA, H., OTTENSMEIER, C., ZWIERZINA, H., LAGHI, L., GRIZZI, F., OHASHI, P. S., SHAW, P. A., CLARKE, B. A., WOUTERS, B. G., KAWAKAMI, Y., HAZAMA, S., OKUNO, K., WANG, E., O'DONNELL-TORMEY, J., LAGORCE, C., PAWELEC, G., NISHIMURA, M. I., HAWKINS, R., LAPOINTE, R., LUNDQVIST, A., KHLEIF, S. N., OGINO, S., GIBBS, P., WARING, P., SATO, N., TORIGOE, T., ITOH, K., PATEL, P. S., SHUKLA, S. N., PALMQVIST, R., NAGTEGAAL, I. D., WANG, Y., D'ARRIGO, C., KOPETZ, S., SINICROPE, F. A., TRINCHIERI, G., GAJEWSKI, T. F., ASCIERTO, P. A. & FOX, B. A. 2012a. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of Translational Medicine*, 10, 205.
- GALON, J., PAGÈS, F., MARINCOLA, F. M., THURIN, M., TRINCHIERI, G., FOX, B. A., GAJEWSKI, T. F. & ASCIERTO, P. A. 2012b. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *Journal of Translational Medicine*, 10, 1.
- GATTI, E. & PIERRE, P. 2003. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Current Opinion in Cell Biology*, 15, 468-473.
- GILKS, C. B., IONESCU, D. N., KALLOGER, S. E., KÖBEL, M., IRVING, J., CLARKE, B., SANTOS, J., LE, N., MORAVAN, V. & SWENERTON, K. 2008. Tumor cell type can be reproducibly diagnosed and is of independent prognostic significance in patients with maximally debulked ovarian carcinoma. *Human Pathology*, 39, 1239-1251.
- GIPSON, I. K., BLALOCK, T., TISDALE, A., SPURR-MICHAUD, S., ALLCORN, S., STAVREUS-EVERS, A. & GEMZELL, K. 2008. MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biol Reprod*, 78, 134-142.
- GRIFFITHS, C. T. 1975. Surgical resection of tumor bulk in the primary treatment of ovarian carcinoma. *Natl Cancer Inst Monogr*, 42, 101-104.
- GRONROOS, M., NIEMINEN, U., KAUPPILA, A., KAUPPILA, O., SAKSELA, E. & VAYRYNEN, M. 1984. A prospective, randomized, national trial for treatment of ovarian cancer: the role of chemotherapy and external irradiation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 17, 33-42.
- GROSS, A. L., KURMAN, R. J., VANG, R., SHIH, I.-M. & VISVANATHAN, K. 2010. Precursor Lesions of High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: Morphological and Molecular Characteristics. *Journal of Oncology*, 2010, 1-9.
- GUBBELS, J., BELISLE, J., ONDA, M., RANCOURT, C., MIGNEAULT, M., HO, M., BERA, T., CONNOR, J., SATHYANARAYANA, B., LEE, B., PASTAN, I. & PATANKAR, M. 2006a. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Molecular Cancer*, 5, 50.
- GUBBELS, J., FELDER, M., HORIBATA, S., BELISLE, J. A., KAPUR, A., HOLDEN, H., PETRIE, S., MIGNEAULT, M., RANCOURT, C. & CONNOR, J. P. 2010. MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells. *Mol Cancer*, 9, 1476-4598.
- GUBBELS, J. A., BELISLE, J., ONDA, M., RANCOURT, C., MIGNEAULT, M., HO, M., BERA, T. K., CONNOR, J., SATHYANARAYANA, B. K., LEE, B.,

- PASTAN, I. & PATANKAR, M. S. 2006b. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Mol Cancer*, 5, 50.
- HAMANISHI, J., MANDAI, M., IWASAKI, M., OKAZAKI, T., TANAKA, Y., YAMAGUCHI, K., HIGUCHI, T., YAGI, H., TAKAKURA, K., MINATO, N., HONJO, T. & FUJII, S. 2007. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3360-3365.
- HARIDAS, D., PONNUSAMY, M. P., CHUGH, S., LAKSHMANAN, I., SESHACHARYULU, P. & BATRA, S. K. 2014. MUC16: molecular analysis and its functional implications in benign and malignant conditions. *The FASEB Journal*, 28, 4183-4199.
- HASSAN, R., BERA, T. & PASTAN, I. 2004. Mesothelin A New Target for Immunotherapy. *Clinical cancer research*, 10, 3937-3942.
- HASSAN, R. & HO, M. 2008. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*, 44, 46-53.
- HASSAN, R., KREITMAN, R. J., PASTAN, I. & WILLINGHAM, M. C. 2005. Localization of Mesothelin in Epithelial Ovarian Cancer. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 13, 243-247.
- HAVRILESKY, L. J., MOORMAN, P. G., LOWERY, W. J., GIERISCH, J. M., COEYTAUX, R. R., URRUTIA, R. P., DINAN, M., MCBROOM, A. J., HASSELBLAD, V., SANDERS, G. D. & MYERS, E. R. 2013. Oral contraceptive pills as primary prevention for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 122, 139-147.
- HEINTZ, A. P. M., ODICINO, F., MAISONNEUVE, P., QUINN, M. A., BENEDET, J. L., CREASMAN, W. T., NGAN, H. Y. S., PECORELLI, S. & BELLER, U. 2006. Carcinoma of the Ovary. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 95, Supplement 1, S161-S192.
- HERMANEK, P. 1989. Dysplasie-Karzinom-Sequenz, 45-55, In: MATEK, W. (ed.) *Früherkennung und Nachsorge des Dickdarmkrebses*. Springer Berlin Heidelberg.
- HINKULA, M., PUKKALA, E., KYRÖNEN, P. & KAUPPILA, A. 2006. Incidence of ovarian cancer of grand multiparous women—A population-based study in Finland. *Gynecologic Oncology*, 103, 207-211.
- HØGDALL, E. V. S., CHRISTENSEN, L., KJAER, S. K., BLAAGAARD, J., KJÆRBYE-THYGESEN, A., GAYTHER, S., JACOBS, I. J. & HØGDALL, C. K. 2007. CA125 expression pattern, prognosis and correlation with serum CA125 in ovarian tumor patients: From The Danish “MALOVA” Ovarian Cancer Study. *Gynecologic Oncology*, 104, 508-515.
- HOOPMANN, M., SACHSE, K., SCHÖNDORF, T., VALTER, M., BECKER, M., NEUMANN, G. R., ORTMANN, M., GÖHRING, U. J. & MALLMANN, P. 2005. Prognostischer Stellenwert serologischer und immunhistochemischer Her-2/neu-Messungen beim Ovariakarzinom. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 66, 8.
- HSU, S.-M., RAINE, L. & FANGER, H. 1981. A Comparative Study of the Peroxidase-antiperoxidase Method and an Avidin-Biotin Complex Method for Studying Polypeptide Hormones with Radioimmunoassay Antibodies. *American Journal of Clinical Pathology*, 75, 734-738.
- HUANG, C.-Y., CHENG, W.-F., LEE, C.-N., SU, Y.-N., CHIEN, S.-C., TZENG, Y.-L., HSIEH, C.-Y. & CHEN, C.-A. 2006. Serum Mesothelin in Epithelial

- Ovarian Carcinoma: A New Screening Marker and Prognostic Factor. *Anticancer Research*, 26, 4721-4728.
- HWANG, W.-T., ADAMS, S. F., TAHIROVIC, E., HAGEMANN, I. S. & COUKOS, G. 2012. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecologic Oncology*, 124, 192-198.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER 2014. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. IARC/WHO.
- JACOBS, I. & BAST, R. C. 1989. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Human Reproduction*, 4, 1-12.
- KAMRADT, T. & FERRARI-KÜHNE, K. 2011. Das adaptive Immunsystem. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 136, 1678-1683.
- KANDALAFT, L. E., POWELL, D. J., SINGH, N. & COUKOS, G. 2011. Immunotherapy for Ovarian Cancer: What's Next? *Journal of Clinical Oncology*, 29, 925-933.
- KARST, A. M. & DRAPKIN, R. 2010. Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution. *Journal of Oncology*, 2010, 13.
- KAST, K., RHIEM, K., SCHMUTZLER, R. K., PRIESHOF, B. & COSTA, S. D. 2013. Genetische Beratung bei gynäkologischen Erkrankungen, 757-766, In: KAUFMANN, M., COSTA, S. & SCHARL, A. (eds.) *Die Gynäkologie*. Springer Berlin Heidelberg.
- KINDELBERGER, D. W., LEE, Y., MIRON, A., HIRSCH, M. S., FELTMATE, C., MEDEIROS, F., CALLAHAN, M. J., GARNER, E. O., GORDON, R. W., BIRCH, C., BERKOWITZ, R. S., MUTO, M. G. & CRUM, C. P. 2007. Intraepithelial Carcinoma of the Fimbria and Pelvic Serous Carcinoma: Evidence for a Causal Relationship. *The American Journal of Surgical Pathology*, 31, 161-169
- KÖBEL, M., KALLOGER, S. E., BOYD, N., MCKINNEY, S., MEHL, E., PALMER, C., LEUNG, S., BOWEN, N. J., IONESCU, D. N., RAJPUT, A., PRENTICE, L. M., MILLER, D., SANTOS, J., SWENERTON, K., GILKS, C. B. & HUNTSMAN, D. 2008. Ovarian Carcinoma Subtypes Are Different Diseases: Implications for Biomarker Studies. *PLOS Medicine*, 5, 232.
- KOMMISSION OVAR A.G.O E.V. 2013. *S3-Leitlinie. Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren* [Online]. Available: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/ovar/Diakit_S3_Ovar_OL.pdf [Accessed].
- KURMAN, R. J., HEDRICK ELLENSON, L. & RONETT, B. M. 2011. surface epithelial tumors of the ovary, 791-905, In: *Blaustein's Pathology of the female genital trakt*. 5 ed.
- KURMAN, R. J. & SHIH IE, M. 2010. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*, 34, 433-443.
- LAGENDIJK, J. H., MULLINK, H., VAN DIEST, P. J., MEIJER, G. A. & MEIJER, C. J. L. M. 1998. Tracing the origin of adenocarcinomas with unknown primary using immunohistochemistry: Differential diagnosis between colonic and ovarian carcinomas as primary sites. *Human Pathology*, 29, 491-497.
- LEEPER, K., GARCIA, R., SWISHER, E., GOFF, B., GREER, B. & PALEY, P. 2002. Pathologic Findings in Prophylactic Oophorectomy Specimens in High-Risk Women. *Gynecologic Oncology*, 87, 52-56.

- LIU, B., NASH, J., RUNOWICZ, C., SWEDE, H., STEVENS, R. & LI, Z. 2010. Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges. *J Hematol Oncol*, 3, 7.
- LOY, T. S., QUESENBERRY, J. T. & SHARP, S. C. 1992. Distribution of CA 125 in Adenocarcinomas: An Immunohistochemical Study of 481 Cases. *American Journal of Clinical Pathology*, 98, 175-179.
- MALPICA, A., DEEVERS, M. T., LU, K., BODURKA, D. C., ATKINSON, E. N., GERSHENSON, D. M. & SILVA, E. G. 2004. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol*, 28, 496-504.
- MATSUSHITA, N., GHAZIZADEH, M., KONISHI, H. & ARAKI, T. 2003. Association of ovarian tumor epithelium coexpressing HLA-DR and CA-125 antigens with tumor infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *J Nippon Med Sch*, 70, 40-44.
- MCGUIRE, W. P., ROWINSKY, E. K., ROSENSHEIN, N. B., GRUMBINE, F. C., ETTINGER, D. S., ARMSTRONG, D. K. & DONEHOWER, R. C. 1989. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med*, 111, 273-279.
- MEDEIROS, F., MUTO, M. G., LEE, Y., ELVIN, J. A., CALLAHAN, M. J., FELTMATE, C., GARBER, J. E., CRAMER, D. W. & CRUM, C. P. 2006. The Tubal Fimbria Is a Preferred Site for Early Adenocarcinoma in Women With Familial Ovarian Cancer Syndrome. *The American Journal of Surgical Pathology*, 30, 230-236.
- MEINHOLD-HEERLEIN, I., ZEPPERLICK, F., STRAUSS, A., MAASS, N. & HAUPTMANN, S. 2011. Die Heterogenität des Ovarialkarzinoms. *Der Gynäkologe*, 44, 708-716.
- MILLER, C. 2017. Die Zukunftsvision der Krebsimmuntherapie mit natürlichen Killerzellen. 7-26, GRIN Verlag.
- MILNE, K., ALEXANDER, C., WEBB, J. R., SUN, W., DILLON, K., KALLOGER, S. E., GILKS, C. B., CLARKE, B., KÖBEL, M. & NELSON, B. H. 2012. Absolute lymphocyte count is associated with survival in ovarian cancer independent of tumor-infiltrating lymphocytes. *Journal of Translational Medicine*, 10, 33.
- MIRCEA, R., FRINCUI, D. L. & DUMITRACHE, F. 2009. Expression of CA-125 in ovarian cancer. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 113, 1191-1194.
- MULISCH, M. 2014. Nachweisverfahren und Detektion. *Verfahren der Immunlokalisation: Ein Überblick*. 11-25, Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- MURDOCH, W. J. & MARTINCHICK, J. F. 2004. Oxidative damage to DNA of ovarian surface epithelial cells affected by ovulation: carcinogenic implication and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)*, 229, 546-552.
- ORDÓÑEZ, N. G. 2003. Application of Mesothelin Immunostaining in Tumor Diagnosis. *The American Journal of Surgical Pathology*, 27, 1418-1428.
- PAGES, F., GALON, J., DIEU-NOSJEAN, M. C., TARTOUR, E., SAUTES-FRIDMAN, C. & FRIDMAN, W. H. 2010. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29, 1093-1102.
- PAGES, F., KIRILOVSKY, A., MLECNIK, B., ASSLABER, M., TOSOLINI, M., BINDEA, G., LAGORCE, C., WIND, P., MARLIOT, F. & BRUNEVAL, P. 2009. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 27, 5944-5951.

- PATANKAR, M. S., JING, Y., MORRISON, J. C., BELISLE, J. A., LATTANZIO, F. A., DENG, Y., WONG, N. K., MORRIS, H. R., DELL, A. & CLARK, G. F. 2005. Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecol Oncol*, 99, 704-713.
- PHAM, D. L., SCHEBLE, V., BAREISS, P., FISCHER, A., BESCHORNER, C., ADAM, A., BACHMANN, C., NEUBAUER, H., BOESMUELLER, H., KANZ, L., WALLWIENER, D., FEND, F., LENGGERKE, C., PERNER, S., FEHM, T. & STAEBLER, A. 2013. SOX2 Expression and Prognostic Significance in Ovarian Carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*, 32, 358-367.
- PICCART, M. J., BERTELSEN, K., JAMES, K., CASSIDY, J., MANGIONI, C., SIMONSEN, E., STUART, G., KAYE, S., VERGOTE, I., BLOM, R., GRIMSHAW, R., ATKINSON, R. J., SWENERTON, K. D., TROPE, C., NARDI, M., KAERN, J., TUMOLO, S., TIMMERS, P., ROY, J. A., LHOAS, F., LINDVALL, B., BACON, M., BIRT, A., ANDERSEN, J. E., ZEE, B., PAUL, J., BARON, B. & PECORELLI, S. 2000. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst*, 92, 699-708.
- PIEK, J. M. J., VAN DIEST, P. J., ZWEEMER, R. P., JANSEN, J. W., POORT-KEESOM, R. J. J., MENKO, F. H., GILLE, J. J. P., JONGSMA, A. P. M., PALS, G., KENEMANS, P. & VERHEIJEN, R. H. M. 2001. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *The Journal of Pathology*, 195, 451-456.
- POTHURI, B. & HERZOG, T. J. 2006. Ovarian cancer: a focus on management of recurrent disease. *Nature Clinical Practice Oncology*, 3, 604-611.
- PRAT, J. 2014. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet*, 124, 1-5.
- READE, C. J., RIVA, J. J., BUSSE, J. W., GOLDSMITH, C. H. & ELIT, L. 2013. Risks and benefits of screening asymptomatic women for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*, 130, 674-681.
- REINARTZ, S., FAILER, S., SCHUELL, T. & WAGNER, U. 2012. CA125 (MUC16) gene silencing suppresses growth properties of ovarian and breast cancer cells. *European Journal of Cancer*, 48, 1558-1569.
- RESTA, L., RUSSO, S., COLUCCI, G. A. & PRAT, J. 1993. Morphologic Precursors of Ovarian Epithelial Tumors. *Obstetrics & Gynecology*, 82, 181-186.
- ROBBINS, P. F. & KAWAKAMI, Y. 1996. Human tumor antigens recognized by T cells. *Current Opinion in Immunology*, 8, 628-636.
- ROSENBERG, S. A., YANG, J. C. & RESTIFO, N. P. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature medicine*, 10, 909-915.
- SALVADOR, S., REMPEL, A., SOSLOW, R. A., GILKS, B., HUNTSMAN, D. & MILLER, D. 2008. Chromosomal instability in fallopian tube precursor lesions of serous carcinoma and frequent monoclonality of synchronous ovarian and fallopian tube mucosal serous carcinoma. *Gynecol Oncol*, 110, 408-417.
- SAN, L. H., LAURA, G., DARIUSH, E., JOSHY, G., MARTIN, K., J, R. S. & DAVID, B. 2015. Efficient molecular subtype classification of high-grade serous ovarian cancer. *The Journal of Pathology*, 236, 272-277.
- SATO, E., OLSON, S. H., AHN, J., BUNDY, B., NISHIKAWA, H., QIAN, F., JUNGBLUTH, A. A., FROSINA, D., GNJATIC, S., AMBROSONE, C., KEPNER, J., ODUNSI, T., RITTER, G., LELE, S., CHEN, Y. T., OHTANI, H., OLD, L. J. & ODUNSI, K. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating

- lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18538-18543.
- SCHMIDT, N. 2013. *Tumorantigen-spezifische CD8+ T-Zellen bei Patienten mit hepatozellulaerem Karzinom*. Universität.
- SCHÜLER, S., PONNATH, M., LATTRICH, C. & ORTMANN, O. 2013. Reproductive Factors and Risk of Ovarian Cancer. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 6, 640-648.
- SCHUSTER, H., PEPPER, J. K., BÖSMÜLLER, H.-C., RÖHLE, K., BACKERT, L., BILICH, T., NEY, B., LÖFFLER, M. W., KOWALEWSKI, D. J., TRAUTWEIN, N., RABSTEYN, A., ENGLER, T., BRAUN, S., HAEN, S. P., WALZ, J. S., SCHMID-HORCH, B., BRUCKER, S. Y., WALLWIENER, D., KOHLBACHER, O., FEND, F., RAMMENSEE, H.-G., STEVANOVIĆ, S., STAEBLER, A. & WAGNER, P. 2017. The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, 9942-9951.
- SCULLY, R. E. 1995. Pathology of ovarian cancer precursors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 59, 208-218.
- SHIH, I.-M. & KURMAN, R. J. 2004. Ovarian Tumorigenesis: A Proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis. *The American Journal of Pathology*, 164, 1511-1518.
- SIEGEL, R., MA, J., ZOU, Z. & JEMAL, A. 2014. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 64, 9-29.
- STAEBLER, A. 2011. Preneoplasias of ovarian carcinoma. *Der Pathologe*, 32, 265.
- STAEBLER, A. & DIEBOLD, J. 2007. Molekularpathologie der epithelialen Ovarialneoplasien. *Der Pathologe*, 28, 180-186.
- TUMORREGISTER MÜNCHEN Maligne gynäkologische Tumoren aus klinisch epidemiologischer Sicht.
- TYLER, C., KAPUR, A., FELDER, M., BELISLE, J. A., TRAUTMAN, C., GUBBELS, J. A. A., CONNOR, J. P. & PATANKAR, M. S. 2012. The Mucin MUC16 (CA125) Binds to NK Cells and Monocytes from Peripheral Blood of Women with Healthy Pregnancy and Preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*, 68, 28-37.
- UTE, W., STEFAN, M., MATTHIAS, E. & CHRISTOPH, S. 2009. Dermatologie im Darwin- Jahr. Teil 2: Die Evolution des hautassoziierten Immunsystems. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 7, 862-870.
- VAN DEN BRÛLE, F., CALIFICE, S., GARNIER, F., FERNANDEZ, P. L., BERCHUCK, A. & CASTRONOVO, V. 2003. Galectin-1 Accumulation in the Ovary Carcinoma Peritumoral Stroma Is Induced by Ovary Carcinoma Cells and Affects Both Cancer Cell Proliferation and Adhesion to Laminin-1 and Fibronectin. *Laboratory Investigation*, 83, 377-386.
- VAN ELSEN, C. H. M. J., FRINGS, P. W. H., BOT, F. J., VAN DE VIJVER, K. K., HULS, M. B., MEEK, B., HUPPERETS, P., GERMERAAD, W. T. V. & BOS, G. M. J. 2010. Expression of aberrantly glycosylated Mucin-1 in ovarian cancer. *Histopathology*, 57, 597-606.
- WANG, L., MA, J., LIU, F., YU, Q., CHU, G., PERKINS, A. C. & LI, Y. 2007. Expression of MUC1 in primary and metastatic human epithelial ovarian cancer and its therapeutic significance. *Gynecologic Oncology*, 105, 695-702.
- WEBB, J. R., MILNE, K., WATSON, P., DELEEuw, R. J. & NELSON, B. H. 2014. Tumor-Infiltrating Lymphocytes Expressing the Tissue Resident Memory

- Marker CD103 Are Associated with Increased Survival in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*, 20, 434-444.
- WEINZIERL, A. O. 2008. New approaches in tumour immunology: Implications from mass spectrometric analyses of HLA-ligands. *Unv. Diss.*: Universität Tübingen.
- WIMBERGER, P., WEHLING, M., LEHMANN, N., KIMMIG, R., SCHMALFELDT, B., BURGESS, A., HARTER, P., PFISTERER, J. & DU BOIS, A. 2010. Influence of residual tumor on outcome in ovarian cancer patients with FIGO stage IV disease: an exploratory analysis of the AGO-OVAR (Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group). *Ann Surg Oncol*, 17, 1642-1648.
- YEN, M. J., HSU, C.-Y., MAO, T.-L., WU, T.-C., RODEN, R., WANG, T.-L. & SHIH, I.-M. 2006. Diffuse Mesothelin Expression Correlates with Prolonged Patient Survival in Ovarian Serous Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 12, 827-831.
- YIGIT, R., MASSUGER, L. F. A. G., FIGDOR, C. G. & TORENSMA, R. 2010. Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination. *Gynecologic Oncology*, 117, 366-372.
- YIN, B. W. & LLOYD, K. O. 2001. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*, 276, 27371-27375.
- ZHANG, L., CONEJO-GARCIA, J. R., KATSAROS, D., GIMOTTY, P. A., MASSOBRIO, M., REGNANI, G., MAKRIGIANNAKIS, A., GRAY, H., SCHLIENGER, K. & LIEBMAN, M. N. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, 348.
- ZHU, J., WAN, Q., RAGUPATHI, G., GEORGE, C. M., LIVINGSTON, P. O. & DANISHEFSKY, S. J. 2009. Biologics through Chemistry: Total Synthesis of a Proposed Dual-Acting Vaccine Targeting Ovarian Cancer by Orchestration of Oligosaccharide and Polypeptide Domains. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 4151-4158.

Anhang

FIGO Klassifikation und TNM-Stadium

Tabelle A 1: Einteilung der Ovarialkarzinome nach TNM- und FIGO-Stadien (Prat, 2014).

TNM	FIGO		
T1	I		Tumor auf die Ovarien beschränkt
T1a		A	Auf ein Ovar beschränkt, Kapsel intakt, Ovarialoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1b		B	Befall beider Ovarien
T1c		C	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien, mit iatrogene Kapselruptur, präoperative Kapselruptur, Tumor auf der Ovarialoberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II		Tumor auf einem oder beiden Ovarien mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a		A	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben
T2b		B	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3	III		Tumor auf einem oder beiden Ovarien mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3a		A	retroperitoneale Lymphknotenmetastasen und/oder mikroskopische Metastasen außerhalb des kleinen Beckens
T3b		B	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und die Milz

			ein
T3c und/ oder N1		C	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und die Milz ein
M1	IV		Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
		A	Pleuraerguß mit positiver Zytologie
		B	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen zu außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Universitätsklinik Tübingen am Institut für Pathologie und Neuropathologie unter Betreuung von Frau PD Dr. med. Annette Staebler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie und die wissenschaftliche Leitung erfolgte durch Frau PD Dr. med. Annette Staebler.

Das Patientinnenkollektiv mit Primärtumoren von HGSC wurde von Deborah Lan Pham zusammengestellt. Die dazugehörigen klinischen Daten stammen von AG Wagner der Universitäts-Frauenklinik Tübingen. Von mir wurde das Kollektiv ergänzt nach Patientinnen, welche Metastasen entwickelten und weiterhin ein Kollektiv zusammengestellt, dessen Daten in die Veröffentlichung des Papers „*The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas*“, (Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, vol. 114, 9942-9951 von Schuster et al.) eingegangen sind.

Das Archivmaterial wurde von mir, mit Unterstützung von Karen Greif und Christine Beschorner, verwaltet. Sämtliche HE- und immunhistochemische Färbungen, sowie Anfertigungen von Schnitten, wurden von Karen Greif ausgeführt. Die TMAs wurden von Christine Beschorner verwaltet und erstellt.

Die histologischen Schnitte für meine Arbeit, sowie für obengenanntes Paper, wurden von mir gesichtet und ausgewertet und danach unabhängig von PD Dr. med. Annette Staebler überprüft. Ausgenommen hiervon sind die immunhistochemischen Färbungen der Primärtumore von CD3E, CD3S, CD8E, CD8S, CD108 und Mesothelin, welche von Dr. med. Hans Bösmüller ausgewertet wurden. Die Lymphozytenauswertung der dazugehörigen Metastasen wurden von mir ausgeführt und danach unabhängig von Dr. med. Hans Bösmüller überprüft.

Die Identifikation von CA-125 und Mesothelin als HLA-Liganden bei HGSC geschah durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee und PD Dr. Stefan Stevanovic der Universitätsklinik Tübingen, Institut für Immunologie.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich, mit Beratung und Überprüfung von PD. Dr. med. Annette Staebler.

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

Tübingen, den 28.09.2018

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Falko Fend, unter dessen Leitung als Ärztlicher Direktor des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Tübingen die Untersuchungen für diese Arbeit erst möglich waren.

Außerordentlichem Dank bin ich Frau PD Dr. Annette Staebler verpflichtet, die es als zuverlässige Doktormutter, Betreuerin und Lehrerin verstand, die Faszination für die Pathologie zu vermitteln, und auf dessen Unterstützung ich mich zu jeder Zeit verlassen konnte. Sie führte mich langsam an die Herausforderungen dieser Arbeit, sodass ich Zeit hatte an ihnen zu wachsen und letztendlich in Form von Kongressbeiträgen und Vorträgen über mich hinauszuwachsen.

Daneben gilt mein Dank Herrn Dr. med Hans Bösmüller der für mich, als weiterer Betreuer dieser Arbeit ein zuverlässiger Ansprechpartner war und es verstand mir bei großer Arbeitsbelastung Mut zu machen. Auf den Kongressen war es stets eine große Freude mit ihm zusammen zu arbeiten.

Herzlichen Dank lasse ich auch Christine Beschorner und Karen Greif zukommen, die mir bei den oft schwierigen Archivverwaltungen geduldig zur Seite standen, halfen und mich mit viel Hilfsbereitschaft unterstützten.

Ebenfalls danke ich den Mitarbeitern des immunhistochemischen Labors des Pathologischen Instituts, die uns bei der Anfertigung der verschiedenen Färbungen unterstützten.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, Dr. Heiko Schuster und Janet Peper des immunologischen Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit und vielen Erklärungen zu Ihrer Arbeit zur Ligandomanalyse.

Der Arbeitsgruppe von Dr. med. Phillip Wagner und Prof. Dr. Stefan Kommos aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen danke ich ebenfalls für die

Zusammenarbeit bei der Zusammenstellung der klinischen Daten für unser Kollektiv.

Meinem Vater danke ich für die Ermutigung ein Thema für meine Doktorarbeit nur unter der Bedingung anzufangen, wenn mich das Thema von Herzen interessiert, mit dem Risiko eventuell gar keine Doktorarbeit gemacht zu haben. Meiner Familie im Ganzen, insbesondere meiner Mutter, Danke ich für die bedingungslose Unterstützung in dem langen Prozess meiner Doktorarbeit und in der Ermutigung zur Teilnahme, sowie finanzieller Unterstützung einiger Kongresse, auch im Ausland.

Ingrid Stenger und Achim Viohl danke ich ganz besonders für die Korrekturhilfe in fachlicher sowie sprachlicher Hinsicht.

Ebenso möchte ich mich bei Leonie Thöne und Marieke Hölting bedanken, welche in derselben Zeit wie ich ihre medizinische Doktorarbeit gemacht haben und daher oft am besten verstehen konnten welche Schwierigkeiten zeitweise bewältigt werden müssen.