

Die Bedeutung des Paucimannose-Nachweises beim Ovarialkarzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Lina Sophie Adloff

aus Bergisch-Gladbach

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Michael Muders
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Ellinger

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.02.2025

Aus dem Institut für Pathologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Das Ovarialkarzinom	7
1.1.1 Epidemiologie und Prognose	7
1.1.2 Klassifikation und Ausbreitung	8
1.1.3 Pathogenese und Risikofaktoren	11
1.1.4 Klinisches Bild und Diagnostik	15
1.1.5 Früherkennung und prognostische Faktoren.....	16
1.1.6 Therapie	18
1.2 Der biochemische Prozess der Proteinglykosylierung	21
1.2.1 Grundlagen der Proteinglykosylierung	21
1.2.2 Paucimannose als Biomarker.....	24
1.3 Fragestellung	26
2. Material und Methoden	28
2.1 Patientinnenkollektiv	28
2.2 Klinische Datenerhebung	29
2.3 Gewebekollektion.....	31
2.4 Immunhistochemische Färbung	31
2.5 Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	36
2.6 Statistische Analyse	40
3. Ergebnisse	42
3.1 Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	42
3.2 Deskriptive Statistik.....	46
3.2.1 Paucimannose-spezifische Färbung mit dem Mannitou-Antikörper	46
3.2.2 Demographische Daten und allgemeiner Gesundheitszustand.....	51
3.2.3 Details zum operativen Eingriff.....	52
3.2.4 Staging	58
3.2.5 Durchgeführte Therapiemaßnahmen	60
3.3 5-Jahres-Überleben nach FIGO-Stadium.....	61
3.4 Überlebenszeitanalyse.....	63

3.5 Korrelationsanalyse.....	66
4. Diskussion.....	68
4.1 Überblick.....	68
4.2 Immunhistochemische Färbung.....	68
4.2.1 Methode und Antikörper.....	68
4.2.2 Paucimannoseexpression und Färbemuster.....	69
4.2.3 Immunzellfärbung.....	72
4.2.4 Weitere Zellfärbungen.....	74
4.3 Demographie und allgemeiner Gesundheitszustand.....	75
4.4 Operatives Staging und Therapie.....	76
4.4.1 Laparoskopische Diagnosesicherung.....	76
4.4.2 Operationsergebnis und Lokalisation des Resttumors.....	77
4.4.3 Darmanastomose bei intestinaler Tumorausbreitung.....	78
4.4.4 Lymphonodektomie.....	79
4.4.5 Peritonealkarzinoseindex (PCI).....	80
4.4.6 Neoadjuvante Chemotherapie.....	81
4.5 Limitationen.....	82
4.6 Stellenwert der Früherkennung beim Ovarialkarzinom und Ausblick.....	83
5. Zusammenfassung.....	86
6. Anhang.....	88
7. Abbildungsverzeichnis.....	90
8. Tabellenverzeichnis.....	91
9. Literaturverzeichnis.....	92
10. Danksagung.....	109

Abkürzungsverzeichnis

5YDFS	Krankheitsfreies 5-Jahres-Überleben (5-year disease-free survival)
5YOS	5-Jahres-Gesamtüberleben (5-year overall survival)
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ADNEX	IOTA Assessment of Different NEoplasias in the adneXa System
ASA	American Society of Anesthesiologists
BRCA	BReast CAncer
BSA	Bovines Serumalbumin
CA-125	Cancer-Antigen 125
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CD68	Cluster of Differentiation 68
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HE-4	Humanes Epididymis Protein 4
HGSOC	High-grade seröses Ovarialkarzinom (High-grade serous ovarian cancer)
IOTA	International Ovarian Tumour Analysis Group
IRS	Immunreaktiver Score
LacNAc	N-Acetyllactosamin

LGSOC	Low-grade seröses Ovarialkarzinom (Low-grade serous adneovarian cancer)
LNCaP	Lymphknotenkarzinom der Prostata (Lymph Node Carcinoma of the Prostate)
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered saline)
PCI	Peritonealkarzinoseindex (Peritoneal Cancer Index)
PET-CT	Kombination aus Positronenemissionstomographie und Computertomographie
RMI	Risk of Malignancy Index
ROCA	Risk of Ovarian Cancer Algorithm
ROMA	Risk of Malignancy Algorithm
SEE-FIM	Sectioning and Extensively Examining the FIMbriated End (Protokoll für die Aufarbeitung des Operationspräparats bei prophylaktischer Salpingo-Oophorektomie aufgrund Risikomutation)
Sf-9	Spodoptera frugiperda (Zelllinie einer Nachtfalterart)
STIC	Seröses tubares intraepitheliales Karzinom
TAM	Tumorassoziierte Makrophage
TVUS	Transvaginaler Ultraschall
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Prognose

Das Ovarialkarzinom liegt in Deutschland mit einem Anteil von 3,1 % auf dem achten Platz der häufigsten Malignome und ist nach dem Mammakarzinom die gynäkologische Tumorerkrankung mit der höchsten Mortalität. Mit einem Anteil von 5 % an allen Krebstodesfällen in Deutschland belegt das Ovarialkarzinom den fünften Platz aller Krebstodesfälle (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2023). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei 68 Jahren. Bis zum 85. Lebensjahr steigen die Neuerkrankungen stetig an. Insgesamt nehmen Erkrankungs- und Sterberaten jährlich ab. Während die absolute Zahl der Neuerkrankungen deutlich rückläufig ist, liegt die absolute Zahl der Sterbefälle in Deutschland seit der Jahrtausendwende mit nur leicht abnehmender Tendenz bei über 5.000. 2020 gab es in Deutschland 7180 Neuerkrankungen an einem bösartigen Tumor der Eierstöcke; dies entsprach etwa einer von 74 Frauen. 5265 Frauen starben im selben Jahr an dieser Erkrankung. In 73 % der Fälle erfolgt die Diagnose erst in einem der fortgeschrittenen Stadien III oder IV. In über 30 % der Fälle liegen zum Diagnosezeitpunkt bereits ein maligner Pleuraerguss oder Fernmetastasen vor, was einem Stadium IV entspricht. Die späte Diagnose bedingt die schlechten Überlebensaussichten von Patientinnen mit Eierstockkrebs. Im Stadium III liegt das relative 5-Jahres-Überleben aktuell bei 42 % und sinkt im Stadium IV auf 21 %. Überlebenschancen von 90 % bestehen bei einer frühen Diagnose der Erkrankung im Stadium I (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2023).

Global befindet sich das Ovarialkarzinom auf Platz 7 der häufigsten Malignome und ist die 8. häufigste Krebstodesursache. 2020 wurden weltweit 313.959 Neuerkrankungen und 207.252 durch das Ovarialkarzinom bedingte Sterbefälle verzeichnet. Die Mortalität des Ovarialkarzinoms ist in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen am höchsten, während Länder mit hohem Einkommen abhängig vom sozioökonomischen Status die höchsten Inzidenzen haben. Seit 1980 lässt sich auch global ein Rückgang der Neuerkrankungs- und Sterberaten feststellen. Bei jungen Frauen unter 40 Jahren zeigten sich

jedoch zuletzt steigende Inzidenzen des Ovarialkarzinoms (Gaona-Luviano et al., 2020; Huang et al., 2022).

1.1.2 Klassifikation und Ausbreitung

Alle malignen epithelialen und nicht-epithelialen Ovarialtumore, Borderline-Tumore sowie Tuben- und Peritonealkarzinome werden nach der TNM-Klassifikation der Union for International Cancer Control (UICC) klassifiziert, die in der 2017 aktualisierten 8. Auflage vorliegt (UICC, 2017). Entsprechend der Ausdehnung des Primärtumors (T), des Lymphknotenbefalls (N) und der Fernmetastasierung (M) werden die Tumore einem Schweregrad zugeordnet. Die Klassifikation der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) wurde 2014 nach über 25 Jahren angepasst und wird für die systematische Einteilung gynäkologischer Tumoren verwendet (Meinhold-Heerlein et al., 2015). Stadium I beschreibt ein auf die Ovarien oder Tuben limitiertes Tumorgeschehen, wobei das Stadium IC je nach Auftreten einer Kapselruptur und Zelnachweis auf der Tumoroberfläche oder in der Spülzytologie in die Kategorien IC1 bis IC3 untergliedert ist. Stadium II umfasst einen Befall des Beckens inklusive eines primären peritonealen Karzinoms. Im Vergleich zur Klassifikation von 1988 existiert nun kein Stadium IIC mehr. Im Stadium III liegt eine peritoneale Ausbreitung über das Becken hinaus und/oder eine Beteiligung retroperitonealer Lymphknoten vor. Das Stadium IIIA weist entsprechend des Vorliegens retroperitonealer Lymphknotenmetastasen oder der mikroskopischen Ausbreitung jenseits des Beckens zusätzliche Unterkategorien auf. Neben der makroskopisch extrapelvinen Ausbreitung beinhaltet das Stadium IIIC auch eine Beteiligung der Leber- oder Milzkapsel. Im Stadium IV liegen schließlich Fernmetastasen außerhalb des Abdomens vor. In der 2014 aktualisierten FIGO-Klassifikation existiert zudem ein Stadium IVA, welches Pleuraergüsse mit positiver Spülzytologie beschreibt. TNM- und FIGO-Klassifikation sind zueinander konkordant (Tab. 1).

Tab. 1: TNM und FIGO Klassifikation der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms entsprechend des Leitlinienprogramms Onkologie 2022. Die Klassifikation ist für alle malignen epithelialen und nicht-epithelialen Tumore des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms gültig.

TNM	FIGO	Definition
Tx		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien oder Tuben
T1a	IA	Tumor auf ein Ovar oder eine Tube begrenzt (Kapsel oder Serosa intakt), kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars oder der Tube; keine malignen Zellen im Aszites oder in der Peritonealspülung
T1b	IB	Tumor auf beide Ovarien oder Tuben begrenzt (Kapsel oder Serosa intakt), kein Tumor auf der Oberfläche der beiden Ovarien oder Tuben; keine malignen Zellen im Aszites oder in der Peritonealspülung
T1c	IC	Tumor begrenzt auf ein(e) oder beide Ovar(ien) oder Tube(n) mit einem der nachfolgenden Punkte:
T1c1	IC1	iatrogene Kapsel- oder Serosaruptur
T1c2	IC2	Kapsel- oder Serosaruptur präoperativ oder Tumor auf Ovar- oder Tubenoberfläche
T1c3	IC3	maligne Zellen im Aszites oder in der Peritonealspülung
T2	II	Tumor befällt ein(e) oder beide Ovar(ien) oder Tube(n) mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung ins kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Implantate auf Uterus und/oder Tube(n) und/oder Ovarien
T2b	IIB	Ausbreitung auf andere Strukturen im kleinen Becken
T3 und /oder N1	III	Tumor befällt ein(e) oder beide Ovar(ien) oder Tube(n) oder primäres Karzinom des Peritoneums mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1		Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Lymphknotenmetastasen ≤ 10 mm
N1b	IIIA1ii	Lymphknotenmetastasen > 10 mm
T3a jedes N	IIIA2	mikroskopische Ausbreitung auf das Peritoneum jenseits des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b jedes N	IIIB	makroskopische Ausbreitung auf das Peritoneum jenseits des kleinen Beckens, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung, mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c jedes N	IIIC	makroskopische Ausbreitung auf das Peritoneum jenseits des kleinen Beckens, mehr als 2 cm in größter Ausdehnung, einschließlich Tumorausbreitung auf die Leber- und Milzkapsel, mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (außer peritonealer Metastasen)
M1a	IVA	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

Histopathologisch werden die tubo-ovariellen Tumore nach der 2020 aktualisierten Klassifikation der WHO charakterisiert (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2020). Bei über 90 % der tubaren, ovariellen und peritonealen Malignomen handelt es sich um epitheliale Tumore (Meinhold-Heerlein et., 2015). Die heterogenen Ovarialkarzinome werden verschiedenen histologischen Subtypen zugeordnet, die sich neben der Morphologie auch pathogenetische und molekulare Eigenschaften differenzieren. Den größten Anteil der Ovarialkarzinome machen mit 75 % die high-grade serösen Karzinome aus. Weniger als 5 % der Ovarialkarzinome sind low-grade serös, jeweils 10 % sind endometrioid oder klarzellig und 3 % sind muzinös (Prat, 2012).

Entsprechend ihrer Differenzierung werden seröse Karzinome einem Grading von 1 (low-grade seröses Ovarialkarzinom, LGSOC) oder 3 (high-grade seröses Ovarialkarzinom, HGSOC) zugeordnet. LGSOCs und HGSOCs unterscheiden sich hinsichtlich ihres Entstehungsortes. Die gut differenzierten LGSOCs entwickeln sich aus Borderline-Tumoren oder benignen Vorstufen und sind mit Mutationen der Gene *KRAS/BRAF*, *PIK3CA*, *CTNNB1* und *PPP2R1A* assoziiert (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). HGSOCs sind schlecht differenziert und entwickeln sich über Vorläuferläsionen in den Tuben, sogenannte seröse tubare intraepitheliale Karzinome (STIC) (vergleiche Kapitel 1.1.3). Eine hohe Proliferationsrate, genetische Instabilität und das durch Mutationen veränderte Tumorsuppressorgen TP53 bedingen das sehr aggressive Wachstum dieser Tumorart. (Köbel et al., 2008; McCluggage et al., 2015). Auch bei Trägerinnen einer Mutation im BRCA1 Gen sind HGSOCs der am häufigsten vorkommende Subtyp (Webb und Jordan, 2017).

Muzinöse Karzinome weisen ebenfalls *KRAS*- oder *BRAF*-Mutationen auf. Sie werden oft in einem frühen Stadium diagnostiziert und operiert. Eine einheitliche Tumorggraduierung gibt es nicht.

Endometrioid und klarzellige Karzinome können mit einer Endometriose assoziiert sein (siehe Kapitel 1.1.3). Für endometrioid Karzinome gibt es ein dreistufiges Grading. Klarzellige Karzinome werden immer als high-grade klassifiziert. Beide Subtypen sind mit *ARID1A*-Mutationen assoziiert. (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2020).

Weitere seltene epitheliale Tumorentitäten sind das (meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostizierte) undifferenzierte Karzinom, der maligne Brennertumor vom Transitionalzelltyp, das Karzinosarkom sowie das 2020 in der WHO-Klassifikation erstmals berücksichtigte Karzinom mesonephrischer Differenzierung.

Borderline-Tumoren machen 10 - 20 % aller malignen Tumore des Ovars aus. Aufgrund der Möglichkeit einer Mikroinvasion und einer Absiedelung von Implantaten ohne destruierendes Wachstum liegt ihre Dignität zwischen der Dignität von benignen Läsionen und malignen Karzinomen. Prinzipiell können sie bei jedem epithelialen Subtyp vorkommen; zu 95 % liegt eine seröse oder muzinöse Histologie vor. Die Diagnose erfolgt meist in frühen Stadien. Mit einem 5-Jahresüberleben von 95 % haben Borderline-Tumore eine deutlich bessere Prognose als invasive Karzinome (du Bois et al., 2013). Gemäß aktueller WHO-Klassifikation markieren atypische Epithelzellproliferationen von über 10 % bei seröser oder muzinöser Histologie differentialdiagnostisch die Grenze zwischen einem Zystadenom und einem Borderline-Tumor (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2020).

Die nicht-epithelialen Neoplasien des Ovars umfassen neben den Keimzelltumoren und den Keimstrang-Stromatumoren mit dem Granulosazelltumor als häufigstem Subtyp auch mesenchymale Tumoren, gutartige tumorähnliche Läsionen wie Zysten sowie Metastasen anderer Tumorentitäten (Singh, 2022; WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2020).

1.1.3 Pathogenese und Risikofaktoren

Die genaue Entstehung des Ovarialkarzinoms ist bisher nicht abschließend geklärt. Nach der „Incessant Ovulation Theory“ (Fathalla, 1971) kann eine bis zur Menopause ununterbrochene Ovulation durch eine zyklische Schädigung des ovariellen Oberflächenepithels über andauernde Entzündungsprozesse und Veränderungen der DNA zur Karzinomentstehung führen. Tatsächlich haben sich Faktoren, die die Anzahl an Ovulationen reduzieren, als protektiv für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms erwiesen. So führen die Einnahme oraler Kontrazeptiva, eine lange Stillzeit und Multiparität zu einer Risikoreduktion,

während Infertilität und Nulliparität das Risiko erhöhen. Der Einfluss eines langen hormonaktiven Zeitraums durch eine frühe Menarche und eine späte Menopause wird kontrovers diskutiert (Momenimovahed et al., 2019).

Limitationen der "Incessant Ovulation Theory" führten dazu, die Rolle von Hormonen bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms näher zu betrachten. Zum einen wurden mit hypophysären Gonadotropinen verbundene Zelltransformationen des ovariellen Oberflächenepithels beobachtet (Choi et al., 2002; Saad et al., 2010). Zum anderen diskutierte man im Rahmen der Ovarialkarzinomgenese die protektive Rolle von Progesteron gegenüber einem erhöhten Level an Androgenen als Risikofaktor (Risch, 1998). In diesem Kontext wurde auch eine Assoziation zwischen dem Polyzystischen Ovarialsyndrom und dem Auftreten von Ovarialkarzinomen beschrieben (Schildkraut et al., 1996), die jedoch strittig ist. Ebenso gibt es keinen Hinweis auf eine Korrelation zwischen ovariellen Zysten beziehungsweise Fibromen und Ovarialkarzinomen (Webb und Jordan, 2017).

In dem ursprünglich 2004 von Kurman und Shih entwickelten „Two-Pathway Model“ werden epitheliale Ovarialkarzinome nach ihrer Histologie sowie ihren Proliferationseigenschaften und ihrer Pathogenese zwei Gruppen zugeordnet. In dieser Einteilung umfassen Typ-I-Tumore LGSOCs, Tumore mit einer Histologie vom endometroiden, klarzelligen, muzinösen und seromuzinösen Typ sowie maligne Brenner-Tumore. Dem Modell zufolge entstehen Typ-I-Tumore schrittweise aus benignen Vorläuferläsionen. Sie sind durch ein langsames Wachstum gekennzeichnet und basieren auf definierten genetischen Veränderungen. Die Typ-II-Tumoren beinhalten hingegen HGSOCs und andere hochmaligne Subtypen (Karzinom Sarkome und undifferenzierte Karzinome), die sich ohne gutartige Vorläuferläsionen entwickeln und durch ein aggressives Wachstum und Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* gekennzeichnet sind. Über 75 % der epithelialen Ovarialtumore lassen sich nach dem Modell Typ-I-Tumoren zuordnen (Kurman und Shih, 2016).

Die dualistische Einteilung der Ovarialkarzinome in Tumore des Typ I und Typ II wurde mittlerweile abgelöst. Neueren Studien zufolge entstehen HGSOCs nicht aus einer Transformation des ovariellen Oberflächenepithels, sondern aus den sekretorischen Zellen des distalen Tubenepithels im Bereich der Fimbrien und des Infundibulums (Kroeger und Drapkin, 2017; Lee et al., 2007). Untersuchungen der distalen Tuben bei

BRCA-Mutationsträgerinnen nach bilateraler Salpingo-Oophorektomie untermauern die Rolle von STICs als Vorläuferläsionen von serösen Karzinomen. Wie bei den HGSOCs wurden bei den tubaren Vorstufen *TP53*-Mutationen verbunden mit hohen Mitoseindizes und genomischer Instabilität nachgewiesen. Diese Erkenntnis hat dazu geführt, dass bei prophylaktischer Salpingo-Oophorektomie aufgrund einer vermuteten *BRCA*-Mutation das Operationspräparat nach dem SEE-FIM Protokoll (Sectioning and Extensively Examining the FIMbriated End of Fallopian Tube) aufgearbeitet wird (Medeiros et al., 2006).

Der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms ist die Genetik. Bei bis zu einem Viertel der an einem epithelialen Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen liegt nach neuesten Forschungsergebnissen ein hereditäres Ovarialkarzinom vor (Samuel et al., 2022). Ein junges Erkrankungsalter und eine familiäre Häufung von Brust- und Eierstockkrebs können Hinweise auf eine erbliche Krebserkrankung sein. In mindestens 2/3 der Fälle finden sich Keimbahnmutationen in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* und *BRCA2* (Toss et al., 2015), welche autosomal-dominant vererbt werden. Diese Gene codieren für DNA-Reparaturproteine, die im Rahmen der homologen Rekombination Doppelstrangbrüche der DNA durch einen Abgleich mit dem komplementären Strang des Schwesterchromatids beheben. Das Lebenszeitrisiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, beträgt bei einer *BRCA1*-Mutation 40 %, bei einer *BRCA2*-Mutation 18 %. Darüber hinaus gibt es seltener betroffene Risikogene wie *CHECK2*, *RAD51 B/C/D*, *BRIP1*, *PALB2* und *ATM*, deren Genprodukte für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen bedeutsam sind. In mutierter Form können sie eine homologe Rekombinationsdefizienz bedingen (Samuel et al., 2022; Toss et al., 2015).

Durch eine prophylaktische bilaterale Salpingo-Oophorektomie bei Patientinnen mit Mutationen von *BRCA1* oder *BRCA2* kann das Risiko, an einem Tuben- oder Ovarialkarzinom zu erkranken, um mindestens 80 % gesenkt werden (Finch et al., 2006). Aufgrund des Nachweises epithelialer Karzinomvorstufen in den Tuben werden auch alleinige bilaterale Salpingektomie als prophylaktische Maßnahme durchgeführt. Diese gehen mit einer Risikoreduktion von 35-50 % einher (Falconer et al., 2015). Auch eine sterilisierende Tubenligatur senkt das Ovarialkarzinomrisiko für alle histologischen Subtypen außer für muzinöse Karzinome deutlich (Cibula et al., 2011).

Das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom, bei nachgewiesener Keimbahnmutation auch bekannt als Lynch-Syndrom, verursacht weitere 10-15 % der erblichen Ovarialkarzinome (Lynch et al., 2009). Zugrunde liegen Mutationen von DNA-Mismatch-Reparaturgenen, die bei Einzelstrangbrüchen involviert sind. Es handelt sich um die häufigste Form von familiärem Darmkrebs, die mit einem auf etwa 8 % erhöhten Lebenszeitrisiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, einhergeht. Im Gegensatz zu sporadischen Ovarialkarzinomen werden mit dem Lynch-Syndrom assoziierte Ovarialkarzinome in der Regel in frühen Stadien diagnostiziert und haben eine nicht-seröse Histologie (Nakamura et al., 2014).

Endometriose, eine chronische multifaktorielle gynäkologische Erkrankung, stellt einen Risikofaktor für das Auftreten von endometroiden und klarzelligigen Ovarialkarzinomen dar. Bisher ist nicht geklärt, ob eine Mutation im normotopen Endometrium ursächlich für die Migration und Invasivität entarteter Zellen ist, oder ob Endometriumzellen zunächst durch retrograde Menstruation zu den Ovarien gelangen und dort durch genetische Veränderungen zur Krebsentstehung führen (Pavone und Lyttle, 2015).

Inflammatorisches Geschehen kann zur Tumorgenese beitragen. Die Tatsache, dass sich die Einnahme von antiphlogistischen nicht-steroidalen Antirheumatika protektiv auf die Entstehung eines Ovarialkarzinoms ausprägt, bestätigt diese Theorie. Insbesondere die tägliche Einnahme von Aspirin in niedriger Dosierung reduziert das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Trabert et al., 2014). Der Einfluss einer infektiös bedingten Unterleibsentzündung auf die Entstehung von Ovarialkarzinomen ist nicht eindeutig. Entzündungsprozesse im Becken stellen einen geringen Risikofaktor für seröse Ovarialkarzinome dar. Für andere histologische Subtypen wurden bisher keine Assoziationen gefunden (Rasmussen et al., 2017).

Neben dem Alter als demographischem Risikofaktor besteht auch eine Korrelation zwischen dem Lebensstil und dem Auftreten von Ovarialkarzinomen. Höhere Inzidenzen sind nach aktuellen global durchgeführten Studien mit Nikotin- und Alkoholkonsum, körperlicher Inaktivität, Übergewicht und weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes und Fettstoffwechselstörungen assoziiert (Huang et al., 2022). Ein stark erhöhter BMI einhergehend mit einem höheren Grad an Adipositas führt zu einem größeren Risikoeffekt (Liu et al., 2015). Umweltfaktoren, Lebensstil und metabolischen Faktoren

könnten die Korrelation zwischen einem hohen sozioökonomischen Status und Ovarialkarzinomen und die weltweit steigenden Inzidenzen bei jungen Frauen erklären.

Die Exposition mit kanzerogenen Asbestfasern ist ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms. Seit 2016 ist das Ovarialkarzinom neben Lungen- und Kehlkopfkrebs als meldepflichtige durch Asbest verursachte Erkrankung aufgeführt. Nach wissenschaftlichen Erkenntnissen gelangen die Fasern nach inhalativer Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt in den Bauchraum. Lymphogener und hämatogener Transport, Penetration in seröse Körperhöhlen sowie eine transvaginale Übertragung werden diskutiert (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

1.1.4 Klinisches Bild und Diagnostik

Das klinische Erscheinungsbild des Ovarialkarzinoms ist durch ein langes symptomfreies Intervall und durch unspezifische Beschwerden wie Schmerzen im Bereich des Abdomens, Völlegefühl, Flatulenzen, Stuhlunregelmäßigkeiten und eine erhöhte Miktionsfrequenz gekennzeichnet (Bankhead et al., 2005). Auch Zyklusstörungen können auftreten. Vor dem Hintergrund der Möglichkeit eines epithelialen Tumors sollten uneindeutige Symptome insbesondere bei Patientinnen mit einem Alter von über 50 Jahren und oder bei einer auffälligen Familienanamnese abgeklärt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022) In weit fortgeschrittenen Stadien kann es zu einer Vermehrung des Bauchumfangs durch Aszites, einer begleitenden Tumorkachexie und zu respiratorischen Symptomen aufgrund von Pleuraergüssen kommen (Berek et al., 2021).

In der Diagnostik des Ovarialkarzinoms hat die Transvaginalsonographie (TVUS) neben einer ausführlichen Anamnese und einer Spiegel- und Tastuntersuchung aufgrund ihrer Verfügbarkeit einen hohen Stellenwert (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Weitere bildgebende Maßnahmen wie die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie und die Kombination aus Positronenemissionstomographie und Computertomographie (PET-CT) dienen bei Verdacht auf fortgeschrittene Tumorstadien dem Staging und dem Ausschluss von Differenzialdiagnosen. Hier erwies sich das PET-CT als den anderen Untersuchungsmethoden überlegen (Nam et al., 2010). Die bildgebende Diagnostik kann

das operative Staging inklusive maximaler Zytoreduktion mittels Explorationslaparotomie jedoch nicht ersetzen (Timmerman et al., 2021).

Bisher gibt es keinen Tumormarker, der als zuverlässiger diagnostischer Parameter genutzt werden kann. Die Bestimmung des Proteins CA-125 (Cancer Antigen 125) im Serum kann zur Verlaufskontrolle vor Therapiebeginn erfolgen, sollte aber nur in Kombination mit bildgebenden Verfahren und Klinik gewertet werden (Gupta und Bernardini, 2018). Im Fall eines Rezidivs hat eine frühzeitige Therapie basierend auf einem alleinigen CA-125-Anstieg keinen Benefit hinsichtlich Überleben und Lebensqualität gezeigt (Rustin et al., 2010). Bei symptomatischen Patientinnen werden in der Rezidivdiagnostik die oben genannten apparativen Untersuchungsmethoden verwendet. Insbesondere bei Patientinnen mit erhöhtem CA-125 erwies sich das PET-CT als sehr sensitiv (Gu et al., 2009). Weiterhin kann die Bestimmung der Tumormarker CEA (Carcinoembryonales Antigen) und CA-19-9 (Carbohydrate Antigen 19-9) sinnvoll sein, um differentialdiagnostisch zwischen einem primären Ovarialkarzinom und Metastasen gastrointestinaler Tumoren zu unterscheiden (Timmerman et al., 2021).

1.1.5 Früherkennung und prognostische Faktoren

Gründe für die schlechte Prognose des Ovarialkarzinoms sind zum einen lange beschwerdefreie Intervalle und unspezifische abdominelle Symptome. Zum anderen existiert bisher kein effektives Früherkennungsprogramm für bösartige Ovarialtumore. Die geringe Inzidenz des Ovarialkarzinoms stellt zudem eine Herausforderung für ein allgemeines Screening der Normalbevölkerung dar (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Prospektiv randomisierte Studien, die den TVUS und den Tumormarker CA-125 als mögliche Screeninginstrumente untersuchten, konnten keinen Effekt in Bezug auf eine Mortalitätsreduktion herausfinden (Jacobs et al., 2016).

Die Anwendbarkeit des Tumormarkers CA-125 ist dadurch limitiert, dass er nur bei etwa 80 % der Ovarialkarzinome exprimiert wird. Weiterhin lässt sich das Glykoprotein auch bei benignen Erkrankungen wie der Endometriose, Entzündungen des Gastrointestinaltraktes und anderen gynäkologischen und nicht-gynäkologischen Malignomen nachwei-

sen. Dies führt in Kombination mit der niedrigen Inzidenz des Ovarialkarzinoms insbesondere bei prämenopausalen Patientinnen zu einer geringen Aussagekraft dieses Markers, sodass seine Bestimmung individuell abgewogen werden sollte (Briggs et al., 2019; Gupta und Bernardini, 2018).

Nach dem Konsens der führenden internationalen Fachgesellschaften für gynäkologische Onkologie bleibt CA-125 trotz mangelnder Spezifität der am besten geeignete Biomarker zur Charakterisierung von Ovarialtumoren. Bei Malignitätsverdacht oder der Differenzierung von primären Ovarialtumoren und Metastasen kann eine Bestimmung sinnvoll sein (Timmerman et al., 2021).

Basierend auf dem Tumormarker wurden verschiedene Scores entwickelt. Die Kombination von CA-125 mit dem Protein HE-4 (Humanes Epididymis Protein 4) aus dem Müller-Epithel des weiblichen Genitaltrakt und dem Menopausenstatus im ROMA (Risk of Malignancy Algorithm)-Score zeigte in der klinischen Praxis gegenüber CA-125 alleine keinen Vorteil hinsichtlich der Mortalität (Moore et al., 2008).

Ebenso sind die Möglichkeiten der TVUS als apparative Screeningmaßnahme eingeschränkt, wenngleich diese Untersuchung eine wichtige Säule der gynäkologisch-onkologischen Diagnostik darstellt. Der Risk of Malignancy Index (RMI) kombiniert die Sonographie, den Biomarker CA-125 und den Menopausenstatus und ist aufgrund der Abhängigkeit von CA-125 nur begrenzt anwendbar (Gupta und Bernardini, 2018; Timmerman et al., 2021). Insbesondere bei Hochrisikopatientinnen zeigte der Risk of Ovarian Cancer Algorithm (ROCA)-Score eine Verbesserung in der Diagnostik von frühen Tumorstadien (Rosenthal et al., 2017). Durch Serienmessungen von CA-125 und den Vergleich mit Referenzkurven lässt sich ein individuelles Risiko bestimmen. Der Score konnte jedoch nicht uneingeschränkt auf Patientinnen mit einer mittleren Risikokonstellation übertragen werden (Naumann und Brown, 2018). Die International Ovarian Tumour Analysis Group (IOTA) schlägt mehrere Scoring-Systeme zur Differenzierung von benignen und malignen Ovarialtumoren anhand sonografischer Kriterien vor. Mithilfe der IOTA Simple Rules erfolgt die Beurteilung der Dignität eines Adnextumors anhand je fünf benignen und malignen sonografischer Kriterien. Das IOTA Assessment of Different NEoplasias in the adneXa (ADNEX) System evaluiert neben sechs sonografischen Kriterien das Alter, das behan-

delnde Zentrum und fakultativ CA-125 als Biomarker. Diese auf Ultraschall basierten diagnostischen Modelle sind nach Expertenkonsens den CA-125 assoziierten Scores überlegen (Timmerman et al., 2021).

Bisherige Früherkennungsmaßnahmen haben sich auch für Risikopopulationen nicht als effektiv erwiesen. Bei Verdacht einer krankheitsrelevanten Mutation sollte eine genetische Testung angeboten werden. Bestätigt sich diese, ist eine prophylaktische bilaterale Salpingo-Oophorektomie die einzige effektive Strategie, um das Risiko für das Auftreten eines Ovarialkarzinoms zu senken (van der Velde et al., 2009).

Relevant für die Prognose des Ovarialkarzinoms sind neben dem Patientinnenalter und dem Allgemeinzustand das Tumorstadium, der histologische Subtyp und die Differenzierung des Tumors (Grading). Der postoperative Tumorrest ist der bedeutendste und zeitgleich auch der einzige beeinflussbare Prognosefaktor. Einflüsse der Tumorbiologie und genetischer Faktoren auf die Prognose sind Gegenstand aktueller Forschung (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

1.1.6 Therapie

Grundsätzlich besteht die Therapie des Ovarialkarzinoms aus einer Debulking-Operation mit anschließender Kombinationschemotherapie und Erhaltungstherapie, wobei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom im Sinne einer hohen Behandlungsqualität immer eine Anbindung an spezialisierte gynäko-onkologische Zentren erhalten sollten (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Timmerman et al., 2021). Das operative Staging ist zugleich diagnostisches Element und die wichtigste Säule der Therapie des Ovarialkarzinoms. Ziel sind eine maximale Tumorreduktion und die Einschätzung der Tumorausbreitung für die Therapieplanung und Prognose. Im Rahmen einer Längsschnittlaparotomie wird die gesamte Bauchhöhle inspiziert und es werden systematisch Gewebe- und Zellproben des Peritoneums sowie Biopsien aus auffälligen Bereichen entnommen. Zusätzlich zur beidseitigen Adnexexstirpation und Hysterektomie erfolgt die Entfernung des infrakolischen Omentum majus und die selektive Entnahme der paraaortalen und pelvinen Lymphknoten beidseits. Bei Auffälligkeiten oder Hinweisen auf einen muzinösen Tumor ist eine Appendektomie indiziert (Berek et al., 2021). Bei jungen Patientinnen ist bei einem einseitigen

Tumor des FIGO-Stadiums I ein fertilitätserhaltendes Prozedere möglich (Zanetta et al., 1997). Bei fortgeschrittenen Tumormanifestationen ab Stadium III ist eine radikale zytoreduktive Debulking-Operation zentral für das Erreichen einer maximalen postoperativen Tumorfreiheit. Hierzu erfolgen abhängig von der Tumorausbreitung zusätzlich eine Deperitonealisierung aller befallenen Areale, die Entfernung des Omentum minus und eine En-bloc-Resektion von Uterus, Adnexen und Sigmoid bei Infiltration des Rektosigmoids. Multiviszeralresektionen des Darms oder anderer Oberbauchorgane sind empfohlen, wenn dadurch eine Komplettresektion erreicht oder eine Obstruktion beseitigt werden kann (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Nach Ergebnissen der randomisierten AGO LION Studie führt eine systematische Lymphonodenektomie der pelvinen und paraaortalen Lymphknoten beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom zu keinem verbesserten Gesamtüberleben, wenn eine makroskopische Tumorfreiheit besteht und die Lymphknoten klinisch unauffällig sind (Harter et al., 2019)

Ab einem FIGO-Stadium von IA und einem Grading von 2 folgt auf die Operation eine adjuvante Chemotherapie. Hierbei handelt es sich im Stadium I um eine platinbasierte Monotherapie über sechs Zyklen und ab dem Stadium II um eine Polychemotherapie mit Carboplatin AUC 5 und Paclitaxel 175 mg/m² über 3 h intravenös für insgesamt 6 Zyklen alle 3 Wochen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Ab dem FIGO-Stadium III erhalten Patientinnen nach Ansprechen der Chemotherapie zusätzlich eine Erhaltungstherapie mit Bevacizumab, Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitoren oder einer Kombination aus beiden. Der monoklonale Antikörper Bevacizumab ist gegen den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gerichtet und gehört zur Gruppe der Angiogenesehemmer. Die Gabe von Bevacizumab erfolgt parallel zur Chemotherapie und als Erhaltungstherapie für maximal 15 Monate und führt zur einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens. Positive Auswirkungen auf das Gesamtüberleben wurden bei hoher Tumorlast und einer high-grade serösen Histologie beobachtet (Perren et al., 2011). PARP-Inhibitoren wie Olaparib oder Niraparib greifen in den Prozess der DNA-Reparatur ein und führen in Tumorzellen, in denen die Mechanismen der homologen Rekombination durch Mutationen defekt sind, zu Doppelstrangbrüchen und schließlich zur Apoptose. Daher eignen sich diese Substanzen insbesondere für Malignome, bei denen eine homologe Rekombinationsdefizienz vorliegt, z. B. im Rahmen einer *BRCA*-Mutation.

Nach aktueller Evidenz ergibt sich durch eine neoadjuvante Chemotherapie mit einer anschließenden Intervalloperation kein Vorteil. In mehreren umfassenden Studien wurde eine primäre Debulking-Operation, gefolgt von sechs Zyklen carboplatinhaltiger Chemotherapie mit drei Zyklen neoadjuvanter Chemotherapie, gefolgt von einer Operation im Intervall und drei weiteren Chemotherapiezyklen gegenübergestellt. Trotz niedrigerer postoperativer Mortalität und Morbidität nach neoadjuvanter Therapie unterschied sich das Gesamtüberleben in der EORTC-Studie zwischen den beiden Armen nicht (Vergote et al., 2010). Auch die CHORUS-Studie konnte keine Überlegenheit der neoadjuvanten Therapie gegenüber einer primären Operation herausstellen (Kehoe et al., 2015).

Trotz der existierenden Therapieoptionen liegt die Rezidivrate des Ovarialkarzinoms in den ersten sechs Monaten nach Primärtherapie bei über 20 % und nach den ersten sechs Monaten bei etwa 60 % (Pignata et al., 2017). In fortgeschrittenen Stadien ab FIGO-Stadium III kommt es in über 80 % der Fälle zu einer Rezidivkrankung (Salani et al., 2017). In der Therapie von Rezidiven wird zwischen Platinresistenz und -sensibilität unterschieden. Diese Unterscheidung hat eine prognostische Relevanz, da mit Beginn einer Platinresistenz das Ansprechen unterschiedlicher Chemotherapeutika nur noch sehr eingeschränkt ist und daher auch nur eine zytostatische Monotherapie mit Topotecan, Paclitaxel, pegyliertem Doxorubicin oder Gemcitabin (Sehouli et al., 2008) empfohlen wird. Sofern die Patientinnen noch Bevacizumab-naiv sein sollten, hat sich in dieser Situation Paclitaxel kombiniert mit Bevacizumab als beste Option herausgestellt (Pujade-Lauraine et al., 2014). Im Falle eines platinsensitiven Rezidivs ist eine kombinierte Chemotherapie indiziert (Parmar et al., 2003). Wie in der Primärtherapie sollte bei Ansprechen eine Erhaltungstherapie mit Bevacizumab oder einem PARP-Inhibitor erwogen werden (Ledermann et al., 2012). Den Ergebnissen der AGO-OVAR OP.4 (DESKTOP III)-Studie zufolge führte eine zytoreduktive Rezidivoperation mit anschließender Chemotherapie bei platin-sensitiven Patientinnen zu einem Überlebensvorteil. Voraussetzung für eine erneute operative Therapie im Rahmen der Studie war ein positiver AGO-Score, der sich aus folgenden prädiktiv günstigen Faktoren zusammensetzt: Guter Allgemeinzustand ohne Einschränkung der Alltagsaktivitäten, weniger als 500 ml Aszites und einer primären Kompletresektion (Harter et al., 2021).

Für einen therapeutischen Nutzen der hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie existieren zum aktuellen Zeitpunkt keine konsistenten Daten. Daher kann die multimodale Methode, bei der nach operativer Zytoreduktion die Bauchhöhle mit einem Zytostatikum gespült wird, außerhalb von kontrollierten Studien nicht eingesetzt werden (Fotopoulou et al., 2018).

1.2 Der biochemische Prozess der Proteinglykosylierung

1.2.1 Grundlagen der Proteinglykosylierung

Die Glykosylierung bezeichnet die Bindung von Zuckerresten oder Sacchariden an Nicht-Zucker-Moleküle und tritt bei 50 % aller Proteine auf. Es handelt sich um eine co- und posttranslationale Modifikation in der Proteinbiosynthese, die zur strukturellen und funktionellen Diversität des Proteoms beiträgt und die Konformation, Lebensdauer und Stabilität von Proteinen sowie zelluläre Interaktionen und Signalwege beeinflusst (Gagneux et al., 2022). Aus dem Konjugat von Zuckerresten und Polypeptiden entstehen durch O- oder N-glykosydische Bindungen Glykoproteine. Erfolgt die Peptidbindung der Glykane über die Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threoninrestes, spricht man von O-Glykosylierung. Im Rahmen der N-Glykosylierung von Proteinen erfolgt die Saccharidbindung über die Amidgruppe eines Asparaginrestes der Proteinsequenz Asparagin-X-Serin/Threonin, wobei „X“ jede Aminosäure außer Prolin sein kann (Varki und Kornfeld, 2022). Eukaryotische N-Glykane haben eine gemeinsame Kernstruktur bestehend aus zwei N-Acetylglucosamin-(GlcNAc) und drei Mannose-Molekülen ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$). Darüber hinaus können die N-Glykane in drei große Untergruppen klassifiziert werden (Abb. 1, A-C). Bei den Oligoglykanen, auch als „High Mannosen“ bezeichnet, erweitern Mannosereste die Kernstruktur. Komplexe N-Glykane sind durch Ketten definiert, die mit GlcNAc am Grundgerüst beginnen. Die Gruppe der hybriden N-Glykane vereint die beiden Strukturen. Weitere Verzweigungen der komplexen und hybriden N-Glykane bestehen oft aus einer N-Acetylglucosamin (LacNAc)-Sequenz, die sich aus dem einleitenden GlcNAc und einer angelagerten Galactose zusammensetzt ($\text{Gal}\beta_{1-4}\text{GlcNAc}$). Weiterhin können die Arme durch die Addition von der Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure oder Fucose ergänzt werden (Stanley

et al., 2022). Die N-Glykosylierung findet in der Zelle zunächst im endoplasmatischen Retikulum statt, wo an Dolicholpyrophosphat ein Vorläuferglykan aus 14 Monosacchariden entsteht. Dieses Molekül wird durch den Oligosaccharyltransferase-Enzymkomplex auf den Asparaginrest eines ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum entstehenden Proteins transferiert. Schließlich gelangt das Polypeptid in den Golgi-Apparat der Zelle. Dort entfernen Mannosidasen Mannosereste, während andere Enzyme wie die Glykosyltransferasen die Saccharidketten verlängern, sodass verschiedene N-Glykane generiert werden. Die Proteinfaltung erfolgt abhängig von der N-Glykosylierung. Zur Qualitätskontrolle dürfen nur korrekt gefaltete Glykoproteine das Endoplasmatische Retikulum verlassen (Hirata und Kizuka, 2021). Veränderungen in der Glykosylierung gehen mit pathologischen Prozessen und chronischen Entzündungen einher. Erstmals beschrieben Meezan *et al.* 1969 Unterschiede der Glykoproteine in gesunden Fibroblasten und in durch ein Virus veränderten Fibroblasten. Krebserkrankungen sind ebenfalls mit einer veränderten Glykosylierung assoziiert, die sich in einer Über- oder Unterexpression natürlich vorkommender Glykane äußern kann. Im Rahmen einer Neoexpression können auch Glykane embryonaler Gewebe auftreten. Durch ein verändertes Glykosylierungsprofil sind maligne Zellen in der Lage, ihre Mikroumgebung hinsichtlich Adhäsion, Rezeptoraktivierung und Zellproliferation zu beeinflussen und begünstigen so einen invasiven Phänotyp (Häuselmann und Borsig, 2014) Ursprung für Abweichungen in den Verzweigungen der Saccharidketten kann eine veränderte Aktivität der Glykosyltransferasen und -hydrolasen sein (Abbott et al., 2008). Die Expression von sogenannten „Branching Enzymen“ der N-Glykosylierung wie Fucosyl- und N-Acetylglucosaminyltransferasen ist bei verschiedenen Krebserkrankungen inklusive des Ovarialkarzinoms dereguliert (Kizuka und Taniguchi, 2016). Die Charakterisierung und der Nachweis der Glykane erfolgt unter anderem durch Massenspektrometrie und spezifische monoklonale Antikörper auf der Basis von Serum- und Gewebeproben, Aszites und Zelllinien. Als mögliche Biomarker für das Ovarialkarzinom wurden verschiedene Glykoproteine wie Ca-125 und HE-4 untersucht. In Serumproben von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom wurde eine veränderte N-Glykosylierung der enthaltenen Akute-Phase-Proteine und Immunglobuline festgestellt (Saldova et al., 2008). In verschiedenen Studien wurden Gewebeproben von Ovarialkarzinom-Patientinnen massenspektrometrisch hinsichtlich ihrer N-Glykosylierung untersucht. Membran-

Glykoproteine wiesen vermehrt sogenannte „bisecting“ GlcNAc Reste am mittleren Man-
noserest der Kernstruktur auf (Abb. 1, E), die mit einer erhöhten Aktivität der N-Acetylglu-
cosaminyltransferase GnT-III zusammenhängen (Allam et al., 2015). Insgesamt war ne-
ben den „bisecting“ GlcNAcs auch die Ausprägung oligomannosidischer Verzweigungen
sowie sialylierter und fucosylierter Strukturen in den tumorösen Gewebeproben erhöht
(Anugraham et al., 2017; Briggs et al., 2019).

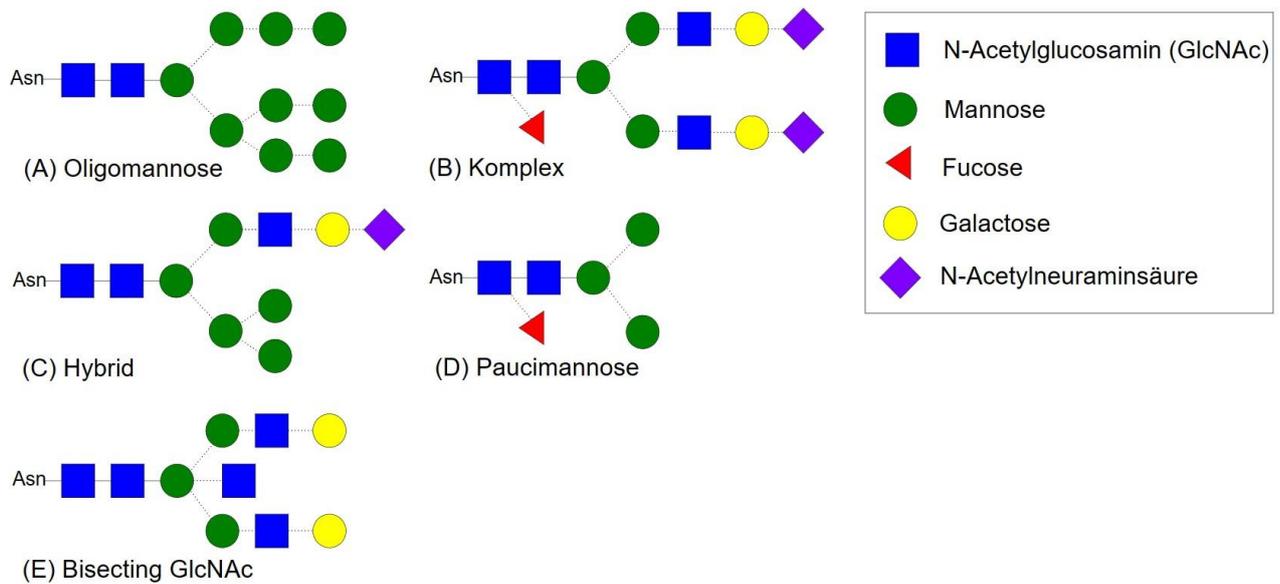


Abb. 1: Subtypen der N-Glykane

N-Glykane werden entsprechend der Moleküle, die an ihre Kernstruktur ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$) binden, klassifiziert. (A)-(B) Bei Oligomannosen erweitern typischerweise ausschließlich Mannoseketten das Grundgerüst, während komplexe N-Glykane Äste haben, die mit GlcNAc beginnen und durch LacNAc ($\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$) erweitert werden können. (C) Hybride N-Glykane stellen einen Mischtyp dar. Die Struktur komplexer und hybrider Glykane kann außerdem durch Fucose- oder N-Acetylneuraminsäurereste ergänzt werden. (D) Als eigener Subtyp der N-Glykane bestehen die Paucimannosen aus zwei GlcNAc-Molekülen, die durch maximal drei Mannosereste und einen optionalen Fucose-Rest erweitert werden ($\text{Man}_{1-3}\text{GlcNAc}_2\text{Fuc}_{0-1}$). (E) „Bisecting“ GlcNAc-Reste setzen am mittleren Mannoserest der Kernstruktur an.

1.2.2 Paucimannose als Biomarker

Ein bisher wenig erforschtes Glykan von hohem pathomechanischem Potential ist die Paucimannose. Hierbei handelt es sich um ein kurzkettiges Zuckermolekül, welches im Rahmen der posttranslationalen N-Glykosylierung an ein Protein gebunden wird. Es besteht aus 2 N-Acetylglucosaminen, 1-3 Mannoseresten sowie einem optionalen Fucose-Rest ($\text{Man}_{1-3}\text{GlcNAc}_2\text{Fuc}_{0-1}$) (Schachter, 2009; Tjondro et al., 2019). Die Paucimannose

galt lange Zeit als typisches in Pflanzen und Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* exprimiertes Glykan (Schachter, 2009). Neuere Erkenntnisse beweisen allerdings die Existenz paucimannosidischer Epitope in Zellen von Vertebraten. Eine erhöhte Paucimannoseexpression in humanen pankreatischen Stammzellen und murinen neuronalen Progenitorzellen deutet auf eine Funktion von Paucimannose in der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung hin (Dahmen et al., 2015; Zipser et al., 2012). Darüber hinaus wurde das kurzkettige N-Glykan unter pathologischen Bedingungen, darunter entzündliche Vorgänge und maligne proliferative Prozesse, nachgewiesen. Im Sputum von an Pneumonie erkrankten Personen sezernieren neutrophile Granulozyten Proteine mit paucimannosidischen Strukturen. Es wird angenommen, dass diese in der neutrophilen Granula durch β -Hexosaminidasen aus komplexen Glykanen entstehen (Thaysen-Anderesen et al., 2015). Im Mausmodell wurde eine Assoziation von Paucimannose mit systemischem Lupus erythematodes nachgewiesen (Hashii et al., 2009). Neben der Hochregulierung in Stammzellpopulationen und unter inflammatorischen Bedingungen existieren auch deutliche Hinweise für eine Korrelation zwischen Paucimannosylierung und Tumorerkrankungen. 2012 entwickelten Zipser *et al.* den monoklonalen Antikörper Mannitou, der Paucimannose spezifisch bindet. In menschlichen Kolonkarzinomproben wurde immunhistochemisch eine deutliche Paucimannose-Expression nachgewiesen. Das mit Mannitou gefärbte Material präsentierte sich in Form von Granula in Epithelzellen des Kolonkarzinoms intrazellulär apikal sowie extrazellulär. Ein Microarray verschiedener Tumorgewebe inklusive Proben des Ovarialkarzinoms zeigte ebenfalls eine deutliche Mannitou-Positivität.

Chatterjee *et al.* (2019) untersuchten erstmals systematisch den Zusammenhang zwischen der Paucimannosylierung von Proteinen und verschiedenen Krebserkrankungen und betonten die Bedeutung von paucimannosidischen Glykanen in Tumorgeweben. Die Forschungsergebnisse basieren auf N-Glykosylierungsdaten von Zelllinien und Gewebeproben, die durch eine Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie über einen Zeitraum von zehn Jahren gewonnen wurden. Die Studie belegte eine erhöhte Expression von Paucimannose in verschiedenen malignen Tumoren, einschließlich kolorektalem Karzinom, Leberzellkarzinom, Prostatakarzinom, Hirntumoren und verschiedenen Leukämiesubtypen im Vergleich zu benignen Kontrollgeweben. Auch mehrere Zelli-

nien und einzelne Gewebeproben fortgeschrittener Ovarialkarzinome waren mit einer gesteigerten Paucimannose-Expression assoziiert. Insbesondere fucosylierte, bi- oder trimannosidische Glykane konnten in den Tumorgeweben identifiziert werden. Im Vergleich zu Oligomannosen sowie komplexen und hybriden Strukturen war der Anteil von Paucimannose am gesamten N-Glykom der untersuchten Gewebe immer noch niedrig.

Bei Untersuchungen des Glioblastoms wiesen insbesondere sehr aggressive Zelllinien ein starkes Paucimannose-Signal auf, das mit Prozessen der Tumorgenese wie Proliferation, Invasion, Migration und Adhäsion in Zusammenhang stand (Becker et al., 2019).

Darüber hinaus wurde belegt, dass der auf Makrophagen exprimierte Mannoserezeptor CD206 bevorzugt paucimannosidische Glykane bindet. Liganden dieses Rezeptors wurden auf verschiedenen Krebszellen gefunden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Paucimannose an der Interaktion des Immunsystems mit malignen Prozessen beteiligt ist. (Stavenhagen et al., 2021).

1.3 Fragestellung

HGSOCs stellen den häufigsten histologischen Subtyp von Eierstockkrebs dar und nehmen aufgrund eines aggressiven Wachstums und einer hohen Mortalität einen bedeutenden Stellenwert ein (Prat, 2012). Eine hohe Proliferationsrate und eine ausgeprägte genetische Instabilität, die meist mit *TP53*-Mutationen assoziiert ist, charakterisieren die Aggressivität des Tumors. *BRCA*-Mutationen und andere genetische Defekte in der DNA-Reparatur führen typischerweise ebenfalls zu HGSOCs und können bereits in jungen Jahren zu einem aggressiven Verlauf führen (Lisio et al., 2019). Unspezifische Symptome der Erkrankung und eine bislang unzureichende Früherkennung verursachen eine späte Diagnosefindung und verzögern mögliche therapeutische Maßnahmen. Fast 75 % der Neudiagnosen werden im FIGO-Stadium III oder IV gestellt. In diesen fortgeschrittenen Stadien besteht bereits eine Ausbreitung des Tumors über das kleine Becken hinaus oder ein Befall retroperitonealer Lymphknoten. Das Erreichen der makroskopischen Tumorfreiheit bei fortgeschrittener, in der Bauchhöhle disseminierter Erkrankung erfordert einen radikalen operativen Eingriff. Trotz primär guten Ansprechens auf eine adjuvante

Chemotherapie treten häufig Rezidive auf. Das Ovarialkarzinom sowie dessen operative und chemotherapeutische Behandlungsmaßnahmen reduzieren die Lebensqualität der Patientinnen deutlich. Daher bedarf es eines geeigneten Screeningprogramms zur Früherkennung eines aggressiven Ovarialtumors. Als mögliche Biomarker können Glykane oder Glykoproteine in Betracht gezogen werden.

Für viele Zellfunktionen ist eine korrekte Glykosylierung unverzichtbar. Defekte im Glykosylierungsprozess führen auf zellulärer Ebene zur Karzinogenese, Metastasenbildung und Neoangiogenese. Als bisher wenig untersuchte Form der N-Glykosylierung ist Paucimannose beim Menschen vor allem im Rahmen proliferativer und inflammatorischer Prozesse exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Paucimannose bei verschiedenen Krebserkrankungen, einschließlich des Ovarialkarzinoms, erhöht ist (Chatterjee et al., 2019). Die genaue Funktion der Paucimannose in Zellen des Ovarialkarzinoms ist bisher nicht untersucht. Das Molekül könnte möglicherweise als prognostischer Parameter eingesetzt werden oder als prädiktiver Marker die frühzeitige Diagnosefindung unterstützen. Darüber hinaus könnte es ein interessanter Kandidat für zielgerichtete Therapieoptionen sein.

Die vorliegende Dissertation hat das Ziel, neue Erkenntnisse über die Expression von Paucimannose in HGSOCS zu gewinnen. Dazu erfolgte der immunhistochemische Nachweis von paucimannosidischen Strukturen auf Karzinomzellen von HGSOCS und die Untersuchung einer Korrelation der Paucimannoseexpression mit dem Überleben und der krankheitsfreien Zeit nach Therapie der betroffenen Patientinnen. Darüber hinaus wurde eine Assoziation mit verschiedenen Faktoren des klinischen, intraoperativen und therapeutischen Verlaufs untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Patientinnenkollektiv

Die zu analysierende Kohorte umfasste initial 400 Patientinnen, die aufgrund eines ovarialen Tumors zwischen dem 13.01.2010 und dem 15.12.2020 in der gynäkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Bonn operiert und behandelt wurden. Inklusionskriterium war das Vorliegen einer high-grade serösen Histologie. 31 Fälle mussten aufgrund eines nicht-epithelialen oder eines Borderline-Tumors des Ovars ausgeschlossen werden. In 12 Fällen ergab die histopathologische Untersuchung Metastasen anderer gynäkologischer oder gastrointestinaler Malignome als Ursache für das Tumorleiden. Bei 36 Patientinnen war aus verschiedenen Gründen die Durchführung einer Debulking-Operation *in domo* nicht möglich oder wurde abgelehnt. Neben 229 Patientinnen mit einem histologisch bestätigten high-grade serösen Ovarialkarzinom befanden sich in der Kohorte 48 Patientinnen, welche an anderen epithelialen Unterformen von Eierstockkrebs erkrankt waren. Hierunter fanden sich endometroide (24), muzinöse (16) und klarzellige (6) Histologien sowie je ein kleinzelliges Ovarialkarzinom mit Hyperkalzämie und ein maligner Brenner-tumor. Darüber hinaus wurden 44 seröse Karzinome einem anderen Grading als G3 zugeordnet (Abb. 2). Alle in die Kohorte eingeschlossenen Patientinnen erhielten in dem oben genannten Zeitraum eine operative Zytoreduktion im Universitätsklinikum Bonn.

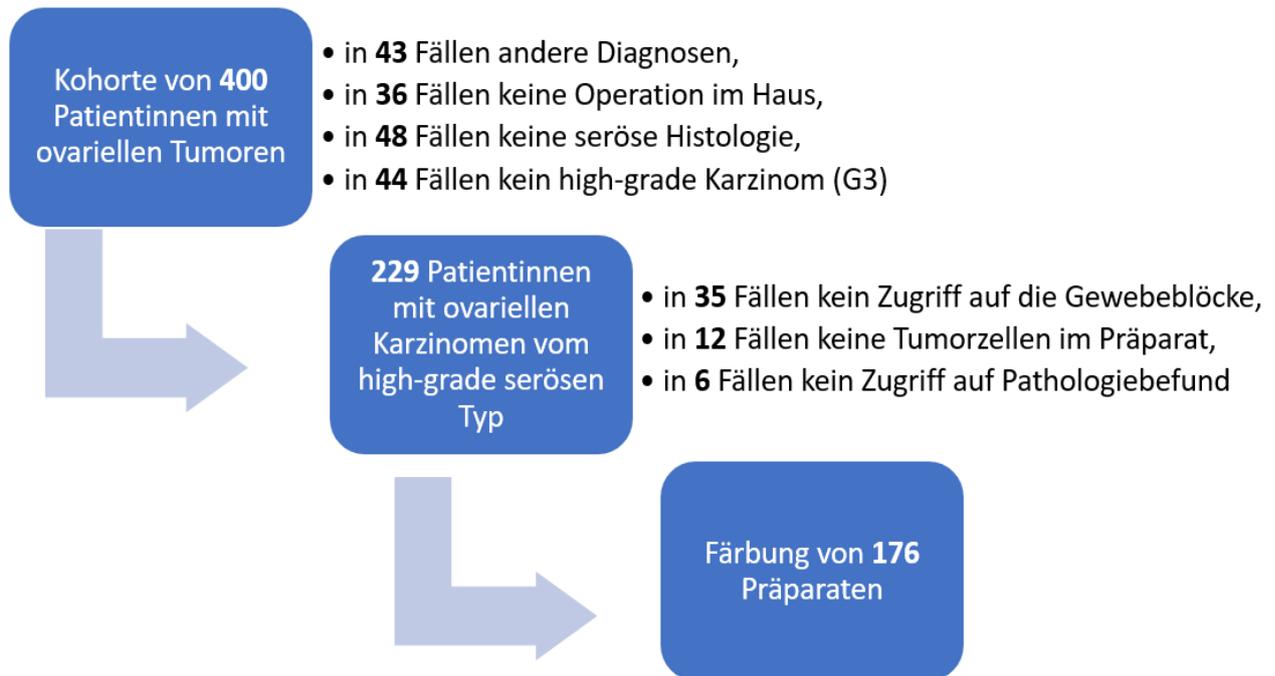


Abb. 2: Eingrenzung der Kohorte im Verlauf des Projekts

Inklusionskriterien waren das Vorliegen eines HGSOCS und die Durchführung einer operativen Zytoreduktion im Universitätsklinikum Bonn. Patientinnen mit anderen Malignomen nicht-epithelialen Ovarialtumoren oder Tumoren einer anderen Histologie als high-grade serös wurden ausgeschlossen. Im Rahmen der Gewebekollektion verringerte sich die Kohorte weiter, sodass schließlich 176 Präparate für die immunhistochemische Färbung zur Verfügung standen.

2.2 Klinische Datenerhebung

Die klinischen Daten wurden retrospektiv mithilfe der digitalen Patientenakten erfasst. Über das am Universitätsklinikum Bonn verwendete Krankenhaus-Informationssystem Orbis® der Firma Agfa waren unter anderem Arztbriefe, Operationsprotokolle, histopathologische Befunde und Verlaufsuntersuchungen einsehbar. In einer verschlüsselten Excel-Tabelle wurden pseudonymisiert neben der Erstdiagnose, dem Operationsdatum und dem Alter der Patientinnen Informationen zum allgemeinen Gesundheitszustand inklusive der Risikoklassifikation der American Society of Anesthesiologists (ASA) und dem BMI gesammelt. Darüber hinaus wurden Details zum chirurgischen Eingriff vermerkt, darunter

neben einer eventuellen laparoskopischen Diagnosesicherung das Ergebnis der Operation, die Tumorverteilung und die Lokalisation des Resttumors bei Nicht-Erreichen einer makroskopischen Tumorfreiheit. Zusätzlich wurden Darmanastomosen bei intestinalem Tumorbefall, durchgeführte Lymphadenektomien und der Peritonealkarzinoseindex (PCI) dokumentiert. Informationen zum Staging beinhalteten neben der histopathologischen Diagnose das FIGO-Stadium und mögliche Lymphknotenmetastasen. Auch Behandlungsmaßnahmen wie neoadjuvante Chemotherapien, postoperative Nachbehandlungen und eine Therapie mit dem Angiogenesehemmer Bevacizumab wurden in die Tabelle mit aufgenommen. Schließlich wurden als Outcome-Parameter das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben dokumentiert (Tab. 2). Alle klinischen Daten, die uns bis März 2022 in den digitalen Patientenakten des Uniklinikums Bonn vorlagen, wurden in das Projekt eingeschlossen. Es wurde sich an der im Jahr 2014 aktualisierten FIGO-Klassifikation des Ovarialkarzinoms orientiert, da 57,4 % der Kohorte nach 2014 diagnostiziert wurden. Bei Patientinnen, die entsprechend der FIGO-Klassifikation von 1988 diagnostiziert wurden, wurden einzelne Stadien zur Vereinheitlichung angeglichen.

Tab. 2: Erhobene Informationen anhand der digitalen Patientinnenakten. Die Datenerhebung erfolgte im Rahmen einer retrospektiven Kohortenstudie. In die Studie eingeschlossene Patientinnen erhielten zwischen dem 13.01.2010 und dem 15.12.2020 die Diagnose eines HGSOE und wurden am Universitätsklinikum Bonn operiert und betreut.

Erhobene klinische und intraoperative Parameter	
Allgemeine (demografische) Daten	Alter, Diagnose- und Operationsdatum
Gesundheitszustand	Risiko-Score der American Society of Anesthesiologists (ASA), BMI
Details zum operativen Eingriff	primärer Eingriff oder Rezidiv-OP, Laparoskopische Diagnosesicherung, Ergebnis der Operation/ Vorliegen makroskopischer Tumorfreiheit, Lokalisation des Resttumors, Darmanastomose bei intestinalem Tumorbefall, Lymphonodektomie Peritonealkarzinoseindex (PCI)
Staging	Lymphknotenmetastasen, FIGO-Stadium,
Therapiemaßnahmen	neoadjuvante Chemotherapie, postoperative Nachbehandlung, Therapie mit Bevacizumab
Outcome-Parameter	krankheitsfreies Überleben, Gesamtüberleben

2.3 Gewebekollektion

Die Gewebekollektion erfolgte als eine retrospektive Datenerhebung im Rahmen der Biobankinitiative. Der entsprechende Ethikantrag ist von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn unter dem Aktenzeichen 428/22 genehmigt worden.

Über die histopathologischen Befunde in den digitalen Patientinnenakten war es uns möglich, auf die jeweiligen Pathologiebefunde und -nummern zuzugreifen. Diese entsprachen den im Archiv des Universitätsklinikum Bonns aufbewahrten Gewebeproben von operierten Ovarialkarzinomen. Über das pathologische Institut des Universitätsklinikums wurden Objektträger zur Verfügung gestellt, die jeweils einen konservierten Gewebeblock repräsentierten. Hierbei handelte es sich in den meisten Fällen um das Hauptpräparat mit Adnextumor oder um ein En-bloc-Präparat inklusive Rektosigmoid nach operativer Zytoreduktion, seltener um Tumormanifestationen anderer intraperitonealer Lokalisationen. Mikroskopisch wurde pro Patientin ein Schnitt identifiziert, der eindeutig Tumorzellen enthielt. Im nächsten Schritt wurden im pathologischen Institut 4 µm dicke Schnitte der Paraffinblöcke angefertigt und danach auf Objektträgern fixiert. Diese Schnitte dienten den immunhistochemischen Färbungen und den entsprechenden Kontrollen.

Aufgrund anderweitig genutzter Schnitte und Blöcke, fehlendem Zugriff auf histologische Befunde und aufgrund von Präparaten mit mikroskopisch nicht eindeutig nachweisbaren Tumorzellen reduzierte sich die Kohorte schließlich auf 176 Gewebeproben von Patientinnen mit einem ovariellen Karzinom vom high-grade serösen Typ (Abb. 2).

2.4 Immunhistochemische Färbung

Die Expression von Paucimannose wurde mithilfe von immunhistochemischen Färbungen im Labor des Biomedizinischen Zentrums des Universitätsklinikums Bonn (Arbeitsgemeinschaft Muders) untersucht. Hierfür wurde für jeden Fall mindestens eine Färbung hergestellt. Negativkontrollen und je eine Positivkontrolle wurden mitgeführt. Die verwendeten Reagenzien, Zellen, Geräte und Materialien sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Zellen, Materialien und Geräte. Die immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von Paucimannose in Ovarialkarzinomproben erfolgten im Labor der Arbeitsgemeinschaft Muders im Biomedizinischen Zentrum des Universitätsklinikums Bonn.

Verwendete Produkte	Herstellerinformationen
Reagenzien und Lösungen	
Aqua destillata	
BSA, verdünnt in PBS (1:20)	Albumin Fraktion V, Blotting grade für die Immunelektrophorese, pH 7,0 (Neofroxx, 9048-46-8)
Ethanol 50 %	
Ethanol 70 %	
Ethanol 96 %	
Ethanol 100 %	
Hämalaun	Hämalaunlösung sauer nach Mayer (Carl Roth, T865.3)
PBS (1X)	Phosphate Buffered Saline, pH 7.4 (Gibco, 10010-015)
Peroxidaseblock	Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution, ready-to use (Dako REAL, 202386-2)
Xylol	
Antikörper und Negativkontrolle	
CD68-Antikörper	CD68 (D4B9C) XP ® Rabbit mAb Antibody (Cell Signaling Technology, #76437)
Mannitou IgM, verdünnt in BSA/PBS (1:50)	hergestellt im Labor von PD Dr. Simone Diestel, Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, Universität Bonn basierend auf Dahmen <i>et al.</i> , 2019
0,5 M Methyl- α -D-mannopyranosid	194,18 g/mol (Sigma-Aldrich, M6882)
Verwendete Kits	
ABC-Reagenz	aus VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit, Peroxidase, R.T.U., (Universal) (Vector Laboratories, PK-7200)
Biotinylated Goat Anti-Mouse IgM	aus VECTASTAIN® ABC-HRP Kit, Peroxidase (Mouse IgM) (Vector Laboratories, PK-4010)
Chromogene Substrate	
Chromogen HistoGreen	HistoGreen HRP-Substrate-Kit (Histoprime, E109)
Chromogen ImmPact DAB	ImmPACT® DAB Substrate Kit, Peroxidase (HRP) (Vector Laboratories, SK-4105)
Chromogen ImmPact NovaRED	ImmPACT NovaRED®, Substrate Kit, Peroxidase (HRP) (Vector Laboratories, SK-4805)
Zelllinien	
LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate)-Zellen	Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ); FFPE-Zellpellets zur Verfügung gestellt von SF
Sf-9 (Spodoptera frugiperda)-Zellen	FFPE- Zellpellets zur Verfügung gestellt von Sarah Förster; Zellen zur Verfügung gestellt von Dr. Inga

	Hochheiser (AG Geyer), Institut für Strukturbiologie, Uniklinik Bonn
Materialien	
Objektträger Superfrost Plus	Gerhard Menzel, Braunschweig, DE
Pasteurpipetten	Labomedic, Bonn
Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen ohne Filter	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AT)
Präparatekleber	Eukitt Quick-hardening mounting medium (Sigma-Aldrich Merck, 03989)
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Wachsstift	Dako Pen (Agilent Dako, 237-S200230)
Geräte	
Autoklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloß, DE
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Bulle, CH
Kühlschrank -4 °C	Liebherr, Bulle, CH
Mikroskop BX45 mit DP22 Digitalkamera	Olympus, Hamburg, DE
Roller Shaker RS-TR 10	Phoenix Instruments, Garbsen, DE
Vortex-Laborrührer RS-VA10	Phoenix Instruments, Garbsen, DE

Als Antikörper zur Identifikation von Paucimannose wurde der für trimannosidische Strukturen spezifische Mannitou-Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 genutzt (Dahmen et al., 2015; Zipser et al., 2012). Für die Negativkontrolle wurde Mannitou für 8 Stunden bei Raumtemperatur unter konstanter Durchmischung mit 0,5 M Methyl- α -D-mannopyranosid präinkubiert. Durch die sehr gute Bindung des Antikörpers an Methylmannosid konnte die spezifische Paucimannosebindung des Antikörpers gezeigt werden. Eine Bindung weiterer paucimannosidischer Strukturen wurde durch den Vorgang blockiert (Dahmen et al., 2015). Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Zellpellets der Insektenzelllinie Sf-9 (*Spodoptera frugiperda*), (Juliant et al., 2014; Tjondro et al., 2019) wurden zur Positivkontrolle genutzt, da Zellen von Invertebraten inklusive Insekten hohe Level an paucimannosidischen Glykanen exprimieren.

Pro Objektträger wurden in den einzelnen Schritten 150-200 µl Lösung verwendet. Die frischen Schnitte der Gewebeblöcke wurden beschriftet, im Abzug in Xylol deparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Im Anschluss wurden die Proben in destilliertem Wasser platziert, um eine Austrocknung zu verhindern. Als Waschlösung zwischen den verschiedenen Versuchsschritten wurde Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) verwendet. Durch eine 15-minütige Inkubation mit der Peroxidase-Blocking-Lösung

wurde die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes blockiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Absättigung unspezifischer, proteinbindender Bereiche mit 5-prozentigem Bovinem Serumalbumin (BSA)/PBS für 25 Minuten. Mannitou wurde in einem Verhältnis von 1:50 in BSA/PBS verdünnt. Danach wurden die Proben mit dem Erstantikörper über Nacht mind. 16 Stunden bei 4 °C in Feuchtekammern inkubiert (Becker et al., 2019; Dahmen et al., 2015). Nach einem weiteren Waschschrift wurde am nächsten Tag der biotinylierte anti-IgM Zweitantikörper in BSA/PBS im Verhältnis 1:200 verdünnt. Eine 30-minütige Inkubation der Proben mit dem zweiten Antikörper bei Raumtemperatur sowie ein Waschschrift mit PBS folgten, bevor die Schnitte für 30 Minuten mit dem ABC -Reagenz inkubiert wurden. Mithilfe dieser Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Technik wurde die Konzentration von Peroxidase erhöht, da das tetramere Protein Avidin in der Lage ist, mehrere biotinylierten Enzyme zu binden (Abb. 3). Die Folge war eine gesteigerte Signalintensität in der auf diesen Schritt folgenden immunhistochemischen Färbung (Vector Laboratories, 2024).

Schließlich wurde nochmals gewaschen und mit dem Chromogen ImmPact NovaRED entwickelt. Anfangs wurde vergleichend der braune Farbstoff ImmPact DAB genutzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Entwicklung mit Leitungswasser gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Nach einer Reinigung in destilliertem Wasser wurden die gefärbten Gewebeproben mit der aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert. In einem letzten Schritt wurden die Objektträger eingedeckelt.

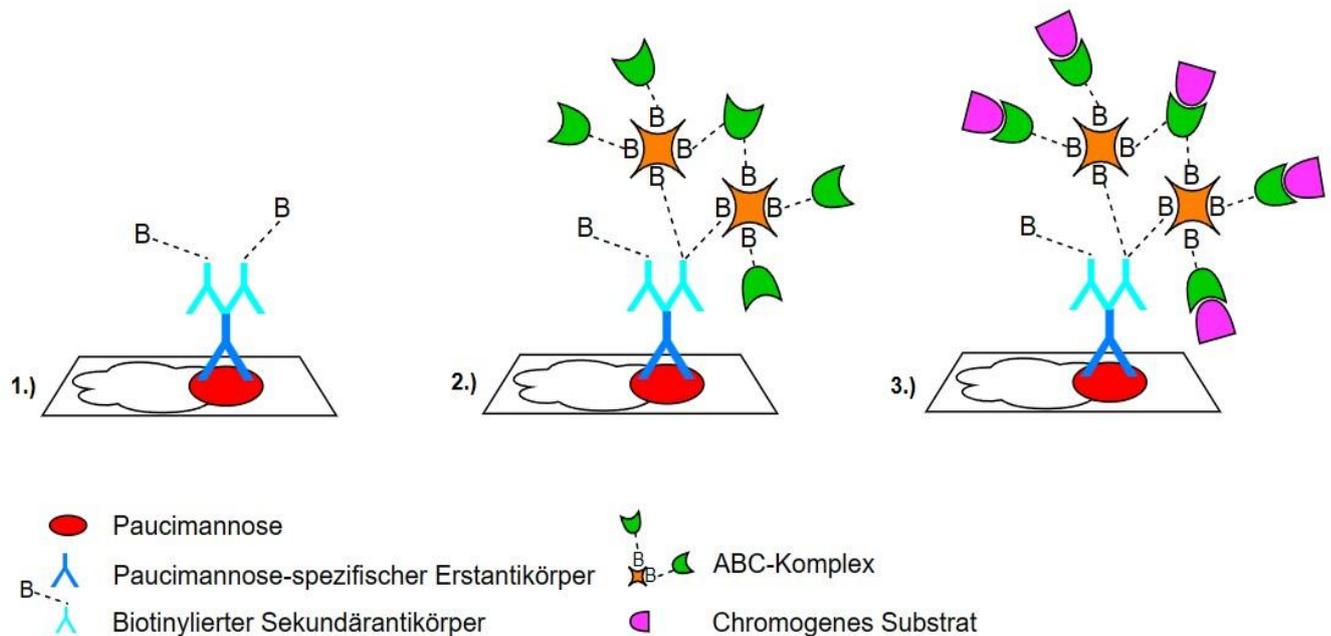


Abb. 3: Die ABC-Technik als Basis der immunhistochemischen Färbung

1.) Nach Inkubation mit dem primären Paucimannose-spezifischen Mannitou-Antikörper über Nacht binden mehrere biotinylierte Sekundärantikörper spezifisch den Erstantikörper und dienen so der Signalverstärkung. 2.) Ein Detektionssystem bindet den sekundären Antikörper. Hierbei handelt es sich konkret um Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexe (Vector Laboratories, 2024), die die Enzymkonzentration am Antigen erhöhen. 3.) Das Chromogen bildet das Substrat für die im Detektionssystem enthaltene Peroxidase (grün).

Um Tumorzellen und Zellen des Immunsystems eindeutig voneinander differenzieren zu können, wurden einige Präparate zusätzlich immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern für das Zelladhäsionsmolekül CD68 (Cluster of Differentiation 68), welches insbesondere von Makrophagen und Monozyten exprimiert wird, gefärbt. Die Doppelfärbung wurde von Dr. Sarah Förster aus der Arbeitsgemeinschaft Muders durchgeführt; dabei wurde im Anschluss an die Paucimannosefärbung CD68 mit dem grünen Farbstoff Histo-Green entwickelt (Förster et al., 2023).

2.5 Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

In Tabelle 4 sind die acht Auswertungskriterien für die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit dem Paucimannose-spezifischen Antikörper inklusive jeweiliger Unterkategorien aufgelistet. Die Auswertung der 176 Präparate und der entsprechenden Negativ- und Positivkontrollen erfolgte am Durchlichtmikroskop BX45 der Firma Olympus. Hierzu wurden Objektive in den Vergrößerungsstufen 4x, 10x, 20x und 40x verwendet, sodass eine 40- bis 400-fache Gesamtvergrößerung entstand. Präparate und Präparatbereiche wurden mit der am Mikroskop installierten Digitalkamera DP22 fotografiert beziehungsweise mithilfe der Software PathoZoom® eingescannt. Ergänzend wurden mit einer externen Kamera durch die Optik des Mikroskops Bilder der Präparate gemacht.

Tab. 4: Auswertungskriterien der immunhistochemischen Färbungen. Im Rahmen der mikroskopischen Auswertung wurden alle mit dem Paucimannose-spezifischen Antikörper Mannitou gefärbten Präparate entsprechend der folgenden acht Kriterien analysiert.

Auswertungskriterium	Unterkategorien				
1. Paucimannosefärbung der Tumorzellen allgemein (0 - 2)	Keine bis wenige Zellen gefärbt (0 - 1)	Viele Zellen gefärbt (2)			
2. Farbeintensität (0 - 3)	Keine Färbung (0)	Schwache bis mittlere Intensität (1 - 2)	Starke Intensität (3)		
3. Prozentanteil gefärbter Tumorzellen nach Immunreaktivem Score (0 - 4)	keine Färbung, < 10 % (0 - 1)	10 - 50 %, 51 - 80 %, > 80 % (2 - 4)			
4. Immunreaktiver Score (Farbintensität x Prozentanteil gefärbter Tumorzellen) 0-2 -> 0 2-3 -> 1 4-8 -> 2 9-12 -> 3	0 - 1	2 - 3			
5. Färbung von Immunzellen (0 - 2)	Immunzellen gefärbt (1)	Keine Immunzellen oder Zellen gefärbt (0, 2)			
6. Genauer Prozentanteil gefärbter Tumorzellen für H-Score 0 0 % 1 < 1 % 2 < 5 % 3 5 - < 10 % 4 10 % 5 20 % 6 30 % 7 40 % 8 50 % 9 60 % 10 70 % 11 80 %	Keine Färbung (0)	< 5 % (1 - 2)	5 - < 10 % (3)	10 - 20 % (4 - 5)	30 - 80 % (6 - 11)
7. H-Score in % (Farbintensität x genauer Prozentanteil gefärbter Tumorzellen)	0 - 50 %	51 - 100 %	101 - 200 %	201 - 300 %	
8. Hot Spot (x40)	≤ 50 %	> 50 %			

Zunächst wurde beurteilt, ob überhaupt Zellen der einzelnen Präparate gefärbt waren. Es wurde weiterhin zwischen einer Färbung von keinen bis wenigen Zellen (0-1) und einer

Färbung vieler Zellen (2) differenziert. Entsprechend ihrer Farbintensität wurden den Präparaten die Stufen 0, 1, 2 und 3 zugeordnet (Abb. 4). Für die Auswertung wurden die beiden mittleren Stufen zusammengefasst.

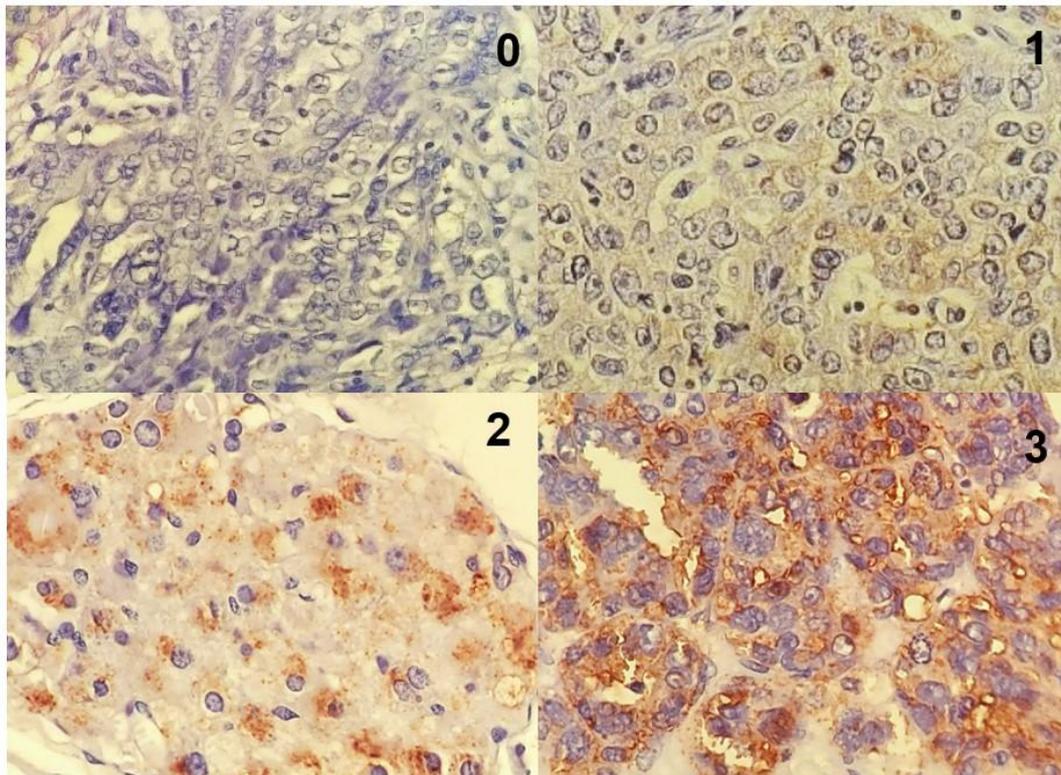


Abb. 4: Farbintensitäten 0 bis 3 zur Berechnung des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und des modifizierten H-Scores

(0) Keine Farbreaktion erkennbar. (1) Leichte Farbreaktion im Zytoplasma der Zellen. (2) Moderate Farbreaktion in Form von zytoplasmatischen Granula. (3) Intensive Farbreaktion im Zytoplasma und im Membranbereich der Zellen.

Der Prozentanteil der gefärbten Tumorzellen wurde zum einen in den fünf Unterkategorien „0“ (0 %), „1“ (< 10 %), „2“ (10 - 50 %), „3“ (51 - 80 %) und „4“ (> 80 %) erfasst, wobei in der Auswertung Färbungen mit weniger als 10 % gefärbten Tumorzellen solchen mit mehr als 10 % gefärbten Tumorzellen gegenübergestellt wurden. Aus der Multiplikation der Farbeintensität (0 - 3) mit der entsprechenden Unterkategorie der gefärbten Tumorzellen (0 - 4) wurde der Immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele (Remmele und Stegner, 1987) berechnet. Es ergab sich ein Produkt mit einer möglichen Spannweite von 0 bis

12, das wiederum nach dem IRS den Kategorien 0 bis 3 zugeordnet wurde (Tab. 5). Diese vier Kategorien wurden für die Auswertung in den zwei Gruppen 0 - 1 und 2 - 3 zusammengefasst.

Zum anderen wurde der geschätzten Prozentsatz der gefärbten Tumorzellen auf etwa 10 % genau dokumentiert und aus diesem Anteil, erneut multipliziert mit der Farbtintensität, ein vereinfachten H-Score berechnet (Budwit-Novotny et al., 1986; Specht et al., 2015). Für die Auswertung wurde dieser Prozentsatz in fünf Unterkategorien vereinfacht (0 %, < 5 %, 5 - < 10 %, 10 - 20 %, 30 - 80 %). Der H-Score wurde nach den Subgruppen 0 - 50 %, 51 - 100 %, 101 - 200 % und 201 - 300 % ausgewertet (Tab. 5).

Zuletzt wurde von jedem Präparat der am stärksten gefärbten Bereich in 400-facher Objektivvergrößerung genauer in Betrachtung genommen und der Prozentsatz dieses „Hot Spots“ abgeschätzt (Jang et al., 2017). Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden Hot Spots mit einer Färbung von $\leq 50\%$ mit Hot Spots mit Färbungen von $> 50\%$ verglichen.

Immunzellfärbungen wurden morphologisch identifiziert und Färbungen ohne Immunzellpositivität gegenübergestellt. Informationen zu den gefärbten Zellstrukturen sowie zu einer möglichen Hintergrundfärbung wurden ebenfalls dokumentiert.

Tab. 5: Angewandte immunhistochemische Scores zur Evaluation der Paucimannosefärbung der Tumorzellen (TZ). Der IRS nach Remmele und Stegner berechnet sich aus der Multiplikation der Färbeintensität 0 bis 3 (A) mit den Unterkategorien 0 bis 4 der gefärbten Tumorzellen (B). Das Ergebnis kann alle Werte zwischen 0 und 12 annehmen und wird wiederum in den Stufen 0 bis 3 klassifiziert. Der vereinfachte H-Score entspricht dem Produkt aus Färbeintensität und dem auf 10 % gerundeten Prozentsatz der gefärbten Tumorzellen. Er nimmt Werte zwischen 0 und 300% an.

Immunoreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner (0-12)		
Färbeintensität (A)	%-Anteil positiver TZ (B)	IRS (AxB)
0 (keine Farbreaktion)	0 (keine gefärbten TZ)	0-1 (negativ) ->0
1 (leichte Farbreaktion)	1 (<10 % der TZ gefärbt)	2-3 (leicht positiv) ->1
2 (moderate Farbreaktion)	2 (10-50 % der TZ gefärbt)	4-8 (positiv) ->2
3 (intensive Farbreaktion)	3 (51-80 % der TZ gefärbt)	9-12 (stark positiv) ->3
	4 (>80 % der TZ gefärbt)	
Modifizierter H-Score (0-300 %)		
Färbeintensität (A)	%-Anteil positiver TZ auf 10 % genau gerundet (B)	H-Score (AxB)
0 (keine Farbreaktion)		0-50 %
1 (leichte Farbreaktion)		51-100 %
2 (moderate Farbreaktion)		101-200 %
3 (intensive Farbreaktion)		201-300 %

2.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Minitab Version 18 und Minitab LLC des State College Pennsylvania, USA. Die Überlebensanalysen hinsichtlich Gesamtüberleben und rezidivfreiem Überleben wurden anhand der Kaplan-Meier-Methode ausgewertet, wobei die Intervalle bis zum Auftreten eines Events in Monaten vom Datum der Primärdiagnose bis zum Datum des Ereignisses angegeben wurden. Als Ereignis wurden ein Todesfall oder Rezidiv im Beobachtungszeitraum bis März 2022 beurteilt. Die Daten sind durch den Zeitpunkt des letzten Follow-Ups, der dem letzten Patientinnenkontakt entspricht, zensiert. Mittels Log-Rank-Test wurden die 5-Jahres-Überlebenskurven der Unterkategorien der verschiedenen Auswertungskriterien auf einem Konfidenzniveau von 95 % verglichen. Bei den acht Auswertungskriterien handelte es sich um die allgemeine Paucimannosefärbung, die Farbintensität, den Prozentanteil der gefärbten Tumorzellen nach IRS und auf 10 % genau gerundet, den IRS und den H-Score, die Immunzellfärbung und den Prozentsatz positiver Tumorzellen im Hot Spot (Tab. 13). Im Rahmen der Nullhypothese wurde

angenommen, dass die 5-Jahres-Überlebenskurven verschiedener Unterkategorien identisch sind und dass die Ereignisse Todesfall und Rezidiv unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit auftreten. Wenn der p -Wert über dem Signifikanzniveau von 0,05 lag, wurde die Nullhypothese beibehalten. Bei Werten von 0,05 oder darunter wurde sie abgelehnt.

Die acht Auswertungskriterien wurden außerdem mit dem Spearman-Test mit vier klinisch und intraoperativ erhobenen Parametern korreliert. Dabei handelte es sich um den PCI, das FIGO-Stadium, die Tumorverteilung und das Operationsergebnis (Tab.14). Für jeden Parameter wurden zwei Bereiche bestimmt. Oberhalb der gewählten Grenzen zwischen den Bereichen wurden die Parameter als negative prognostische Faktoren gewertet, unterhalb nicht. Ein PCI-Score über 9, ein FIGO-Stadium ab IIB, ein Tumorbefall des Dünndarms und ein postoperativer Tumorrest sind mit einer schlechten Prognose assoziiert. Es wurde beispielsweise angenommen, dass ein PCI von 9 oder kleiner mit einer höheren Zellfärbung, einer stärkeren Färbeintensität, usw. verbunden war als ein PCI von über 9. Diese Annahmen wurden für jedes Auswertungskriterium mithilfe eines Korrelationskoeffizienten und eines p -Werts geprüft (Tab.14). Sie musste abgelehnt werden, wenn der berechnete Korrelationskoeffizient sich nicht signifikant von 0 unterschied. Das Signifikanzniveau lag wie beim Log-Rank-Test bei 0,05.

Die FIGO-Stadien wurden in den Kategorien IA bis IIA und IIB bis IVA gruppiert und analog zum PCI hinsichtlich der Korrelation mit den Auswertungskriterien 1 bis 8 miteinander verglichen. Nach dem gleichen Prinzip wurden Tumormanifestationen ohne Dünndarmbefall und die Tumorausbreitung auf den Dünndarm gegenübergestellt. Außerdem wurde die Korrelation makroskopischer Tumorfreiheit mit den acht Kriterien gegenüber einem postoperativen Tumorrest geprüft.

3. Ergebnisse

3.1 Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen wurden ausführlich analysiert und fotografisch dokumentiert. Die mit Mannitou behandelten Gewebeproben wurden mit den jeweiligen Negativkontrollen verglichen, indem in beiden Präparaten die gleichen Ausschnitte in verschiedenen Vergrößerungen mikroskopisch begutachtet wurden (Abb. 5, Anhang 1). Dadurch, dass es sich bei den Proben und Negativkontrollen jeweils um aufeinanderfolgende Schnitte desselben Paraffin-Blocks handelte, unterschieden sich die Präparate hinsichtlich ihrer Zellanordnung kaum.

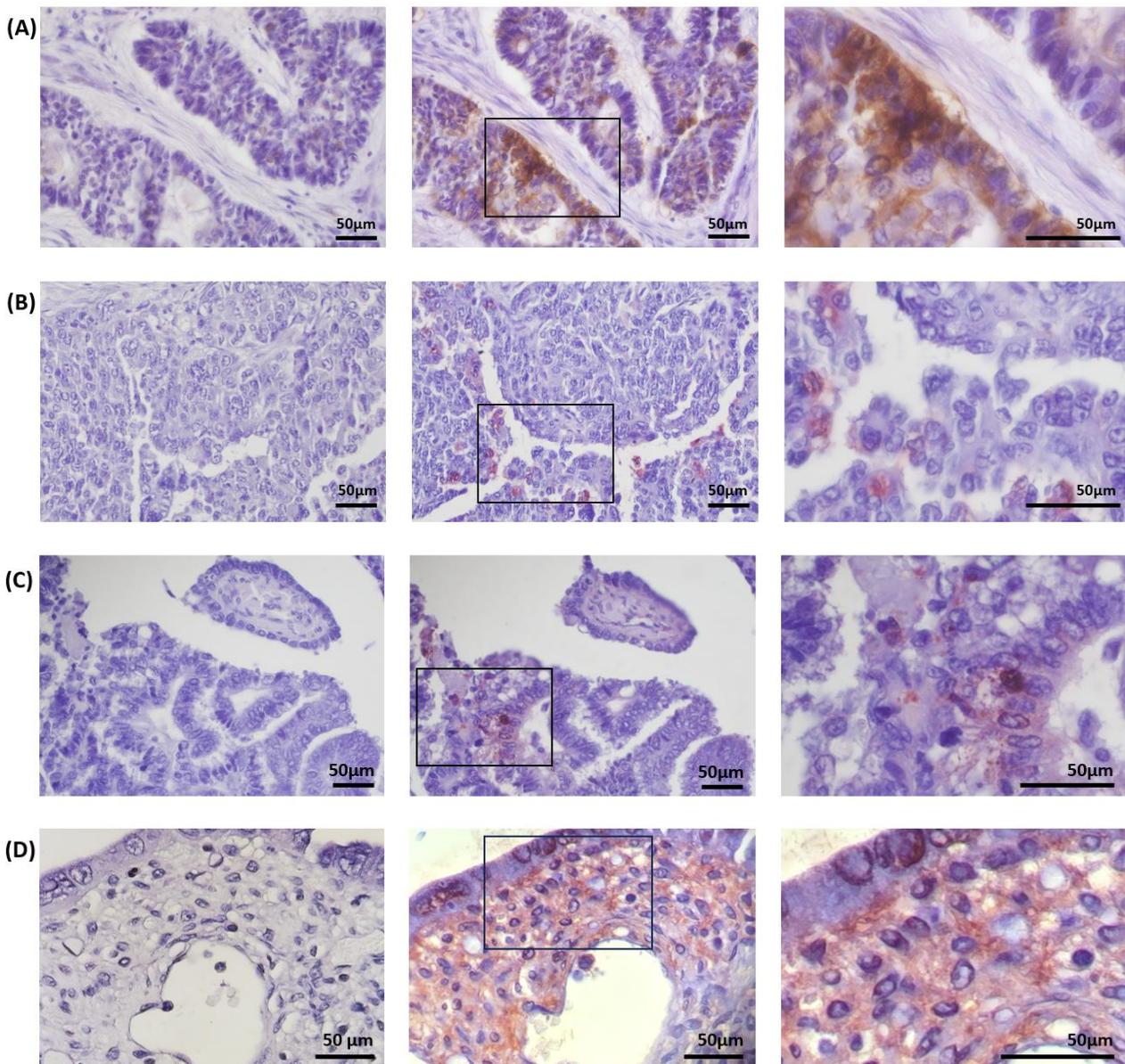


Abb. 5: Mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation des Färbeprozesses

Die hier gezeigten Paucimannosefärbungen (A) bis (D) wurden mit der am Mikroskop installierten Digitalkamera oder einer externen Kamera aufgenommen. Die mit dem Paucimannose-spezifischen Antikörper Mannitou behandelten Präparatausschnitte (Mitte und rechts) wurden mit den entsprechenden Negativkontrollen (links) verglichen. Während es sich beim ersten Präparat um eine Färbung mit dem braunen Farbstoff ImmPact DAB handelt, wurden die drei anderen Präparate mit dem roten Farbstoff ImmPact NovaRED entwickelt.

Die Paucimannose-positiven Zellen präsentierten sich nach dem Färbeprozess typischerweise mit einer zytoplasmatischen Färbung, die granuläre Charakteristika aufwies. In einzelnen Fällen bestand eine membranöse bis submembranöse Färbung (Abb. 6).

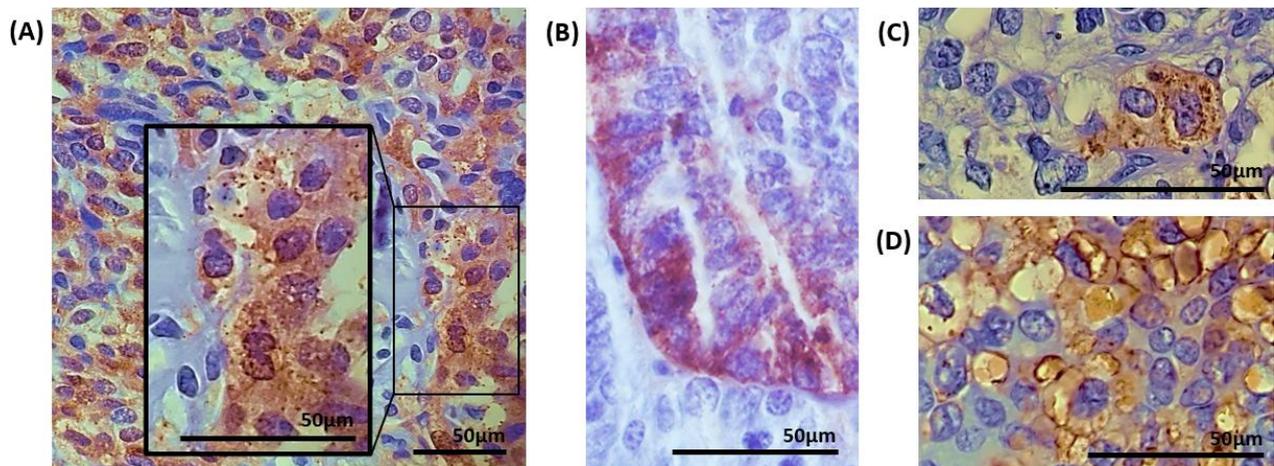


Abb. 6: Granuläre Färbung der Tumorzellen mit dem Paucimannose-spezifischen Antikörper Mannitou

(A) bis (C) In den meisten Fällen war nach dem immunhistochemischen Färbeprozess ein auf das Zytoplasma der Tumorzellen begrenzter granulärer Färbetyp zu erkennen. (D) Einzelne Präparate wiesen zusätzlich eine Färbung im Bereich der Zellmembran auf. Geringe Unterschiede in der Darstellung der Färbung kommen durch die Verwendung verschiedener Kameras mit unterschiedlichen Weißabgleichzuständen zustande.

Neben den Tumorzellen zeigten auch andere Zelltypen ein positives Signal für Paucimannose (Abb. 7). Vor allem vertreten waren Immunzellen, darunter Lymphozyten und insbesondere Makrophagen. Durch die verschobene Kern-Plasma-Relation und prominente Nukleoli ließen sich Tumorzellen in den meisten Fällen von den oft ähnlich großen Makrophagen abgrenzen. Die zusätzliche Färbung einiger Präparate mit einem Antikörper gegen das für Makrophagen und Monozyten spezifische Oberflächenmolekül CD68 (Dr. Sarah Förster) bestätigte die korrekte Unterscheidung der beiden Zellentitäten anhand von histologischen Kriterien (Abb. 8).

Auch auf den Präparaten enthaltene Fibroblasten zeigten sich Paucimannose-positiv. Eine mögliche Perizytenfärbung konnte nicht eindeutig von der artifiziellen Färbung bindegewebiger Strukturen differenziert werden. Interessanterweise erschien auch Plattenepithel Paucimannose-positiv.

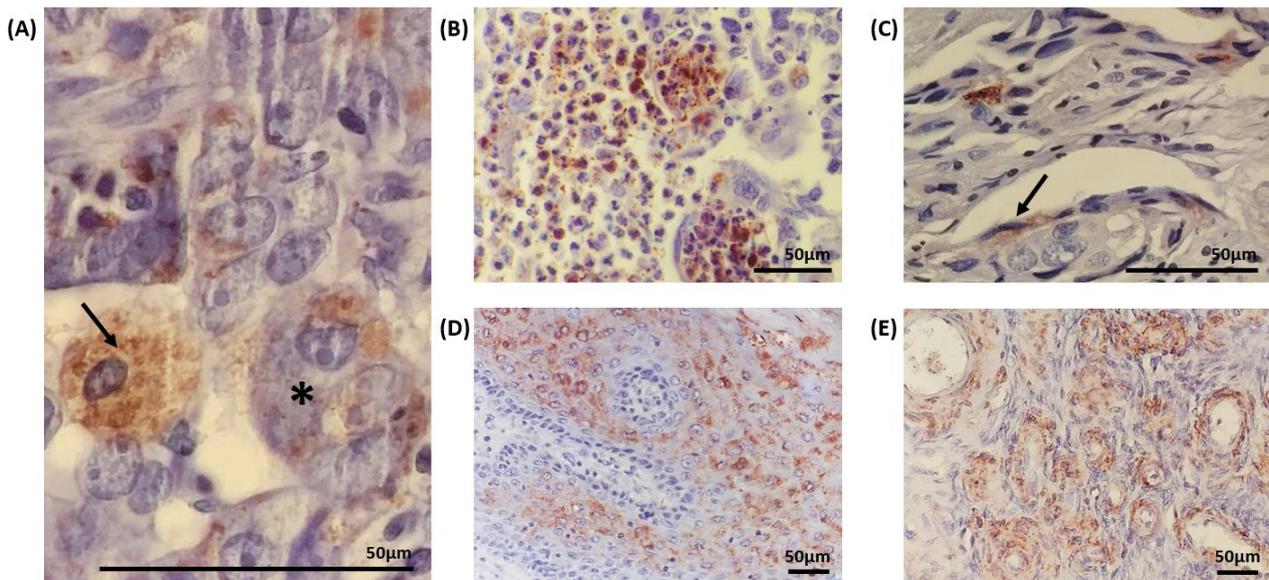


Abb. 7: Andere Zelltypen mit Paucimannose-Signal nach immunhistochemischer Färbung

(A) Zytoplasmatische Paucimannosefärbung eines Makrophagen (Pfeil) und mehrkernige Tumorzelle mit Paucimannose-Signal und prominentem Nukleolus (Stern). (B) Paucimannose-positive Lymphozyten. (C) Fibroblast mit zytoplasmatischer Paucimannosefärbung (Pfeil). (D) Eingefärbte Plattenepithelzellen. (E) Unspezifische Paucimannosefärbung kleiner Blutgefäße

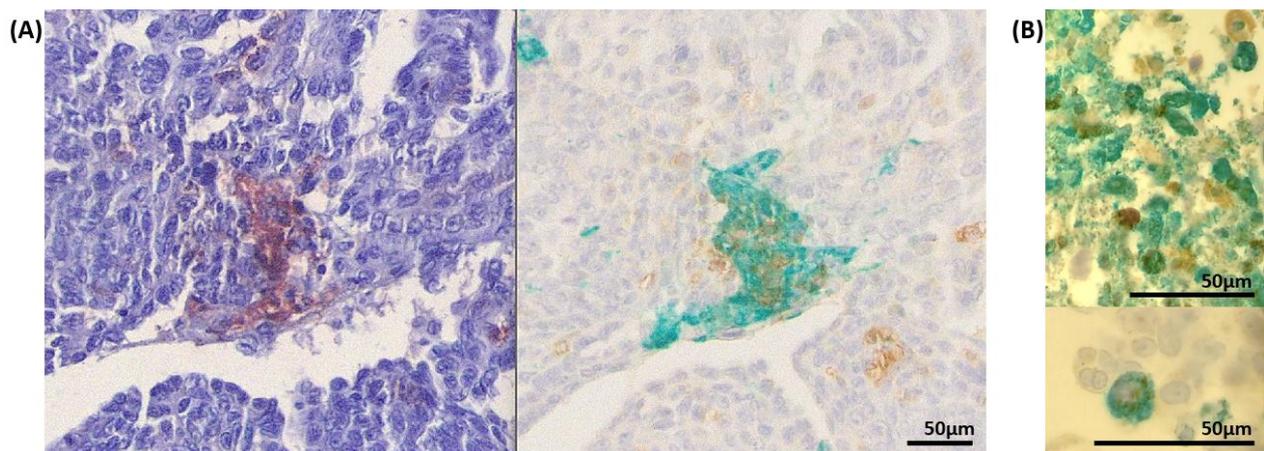


Abb. 8: Doppelfärbung mit CD68-spezifischem Antikörper zur Identifizierung von Makrophagen

Um Paucimannose-positive Tumorzellen sicher von Makrophagen mit Paucimannose-Signal abzugrenzen, wurden einzelne Präparate in einem zweiten Färbeprozess mit einem CD68-Antikörper inkubiert. Diese Doppelfärbung wurde von Dr. Sarah Förster durchgeführt und mit dem Chromogen HistoGreen entwickelt. (A) Präparatausschnitt nach der Färbung mit Mannitou (links) gegenübergestellt mit der CD68-Doppelfärbung (rechts). CD68-positive Makrophagen und Monozyten stellten sich grün dar, während die ursprünglich rote Paucimannosefärbung als hellbraune Zytoplasmafärbung erhalten blieb. (B) CD68-positive Makrophagen und Monozyten (grün) nach Doppelfärbung (oben), CD68-positiver Makrophage (unten).

3.2 Deskriptive Statistik

Im Rahmen einer retrospektiven Kohortenstudie wurden demographische, klinische und intraoperative Parameter erhoben. Die Tumorpräparate von 176 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom vom high-grade serösen Typ wurden immunhistochemisch mit dem für Paucimannose spezifischen Antikörper Mannitou gefärbt und nach einem festgelegten Schema ausgewertet.

3.2.1 Paucimannose-spezifische Färbung mit dem Mannitou-Antikörper

Tabelle 6 veranschaulicht die Verteilung der gefärbten Präparate hinsichtlich der acht immunhistochemischen Kriterien und ihre Unterkategorien.

Tab. 6: Verteilung der immunhistochemischen Auswertungskriterien nach Unterkategorie. Es werden der absolute und prozentuale Anteil angegeben.

Auswertungskriterium	Unterkategorien				
1. Paucimannosefärbung der Tumorzellen allgemein (0 - 2)	Keine bis wenige Zellen gefärbt (0 - 1)	Viele Zellen gefärbt (2)			
Anzahl	89	87			
Relativer Anteil (%)	50,6	49,4			
2. Farbeintensität (0 - 3)	Keine Färbung (0)	Schwache bis mittlere Intensität (1 - 2)	Starke Intensität (3)		
Anzahl	25	62	89		
Relativer Anteil (%)	14,2	35,2	50,6		
3. Prozentanteil gefärbter Tumorzellen nach Immunreaktivem Score (0 - 4)	keine Färbung, < 10 % (0 - 1)	10 - 50 %, 51 - 80 %, > 80 % (2 - 4)			
Anzahl	130	46			
Relativer Anteil (%)	73,9	26,1			
4. Immunreaktiver Score (Farbintensität x Prozentanteil gefärbter Tumorzellen)	0 - 1	2 - 3			
Anzahl	128	48			
Relativer Anteil (%)	72,7	27,3			
5. Färbung von Immunzellen (0 - 2)	Immunzellen gefärbt (1)	Keine Immunzellen gefärbt oder andere Zellen gefärbt (0, 2)			
Anzahl	109	67			
Relativer Anteil (%)	61,9	38,0			
6. Genauer Prozentanteil gefärbter Tumorzellen für H-Score	Keine Färbung (0)	< 5 % (1 - 2)	5 - < 10 % (3)	10 - 20 % (4 - 5)	30 - 80 % (6 - 11)
Anzahl	26	66	35	31	18
Relativer Anteil (%)	14,8	37,5	19,9	17,6	10,2
7. H-Score in % (Farbintensität x genauer Prozentanteil gefärbter Tumorzellen)	0 - 50 %	51 - 100 %	101 - 200 %	201 - 300 %	
Anzahl	142	23	8	3	
Relativer Anteil (%)	80,7	13,1	4,5	1,7	
8. Hot Spot (x40)	≤ 50 %	> 50 %			
Anzahl	151	25			
Relativer Anteil (%)	85,8	14,2			

Nach dem immunhistochemischen Färbeprozess wurden die Gewebeproben anhand des oben genannten Schema mikroskopisch ausgewertet. 85,8 % der Präparate zeigten ein

positives Signal für Paucimannose, in 14,2 % ließ sich hingegen keinerlei Färbung erkennen. In 49,4 % waren viele Zellen, in 50,6 % keine bis wenige Zellen gefärbt (Abb. 9).

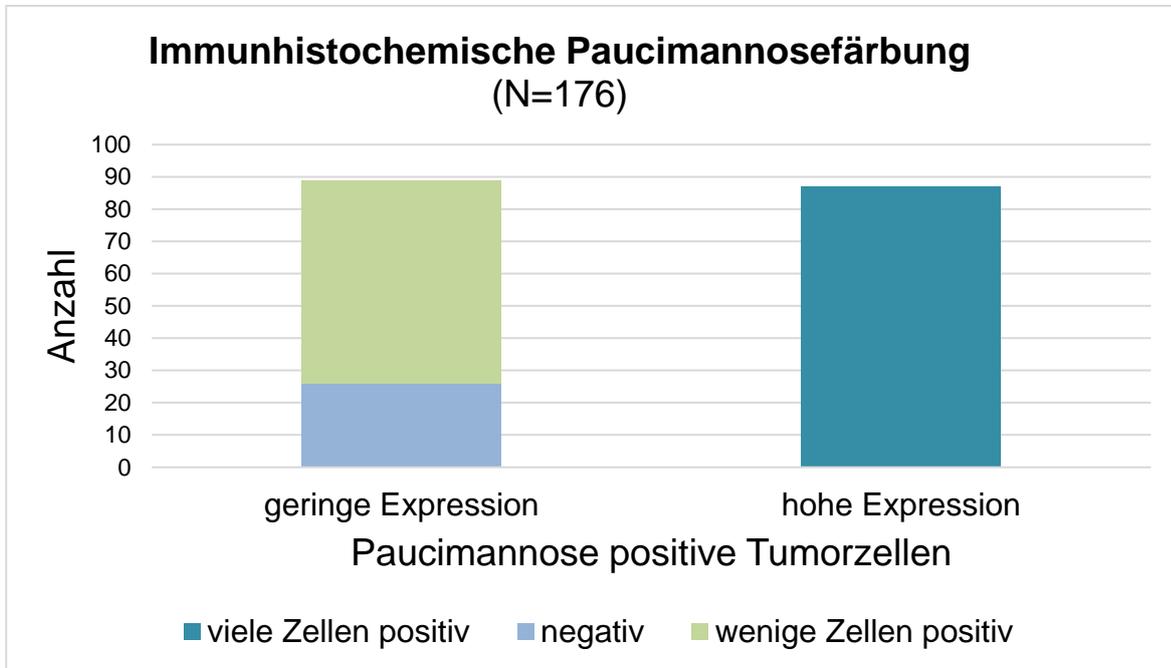


Abb. 9: Allgemeine Paucimannosefärbung in den Präparaten enthaltenen Tumorzellen

Etwa 85% der Proben zeigten in der mikroskopischen Auswertung ein positives Signal für Paucimannose. In je etwa 50% waren nur einzelne bis keine beziehungsweise viele Zellen gefärbt.

Hinsichtlich der Farbintensität wiesen 9,7 % der Proben eine leichte (1), 25,6 % eine moderate (2) und 50,6 % eine intensive Färbung (3) auf. Die übrigen Proben blieben ungefärbt (0).

Für die Berechnung des IRS wurde der prozentuale Anteil gefärbter Tumorzellen in fünf Unterkategorien (0-4) erfasst. In 73,9 % der Fälle waren unter 10 % der vorhandenen Tumorzellen gefärbt, während sich in 26,1 % über 10 % der Tumorzellen gefärbt zeigten. Der sich aus dem Produkt der Farbintensität mit der Unterkategorie der gefärbten Tumorzellen ergebende IRS war in 23,9 % der Fälle negativ, in 48,8 % leicht positiv, in 23,9 % positiv und in 3,4 % stark positiv (Abb. 10).

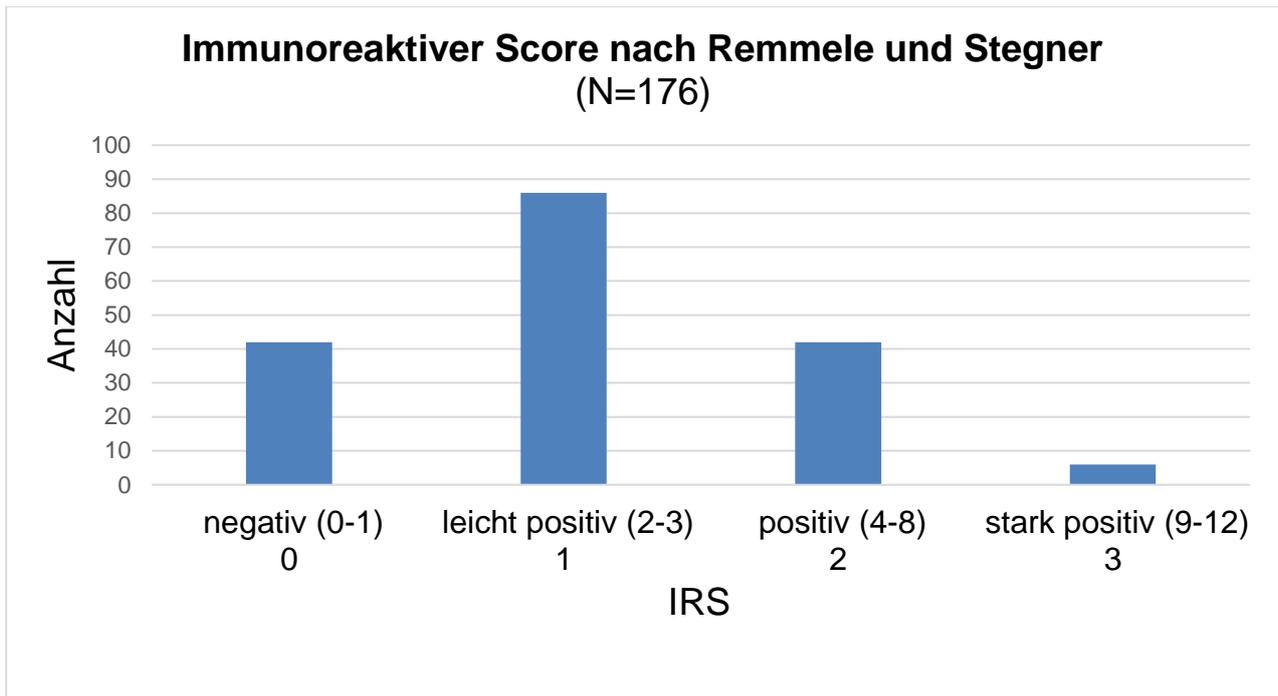


Abb. 10: Anwendung des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner

Der Immunreaktive Score berechnet sich aus der Multiplikation der Färbeintensität (0-3) mit der Anzahl der gefärbten Tumorzellen. Letztere werden für den IRS den folgenden fünf Unterkategorien zugeordnet: „0“ (0 %), „1“ (< 10%), „2“ (10-50 %), „3“ (51-80 %) und „4“ (> 80 %).

Fast 62 % der Präparate wiesen Immunzellfärbungen auf. In den übrigen Fällen waren keine Immunzellen gefärbt (Abb. 11).

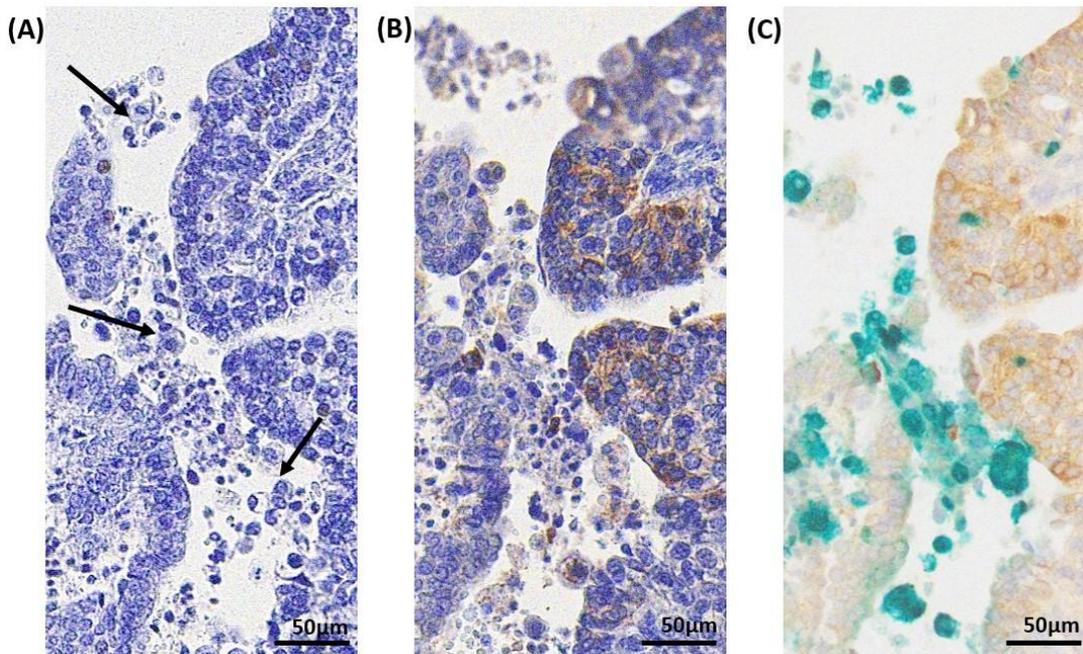


Abb. 11: Immunzellen mit Paucimannose-Signal

(A) Negativkontrolle: Tumorzellen befinden sich vor allem im rechten Bildbereich, bei den Zellen im Zentrum handelt es sich morphologisch um Immunzellen (Pfeile). (B) Paucimannosefärbung mit Mannitou: Neben den Tumorzellen weisen auch die Immunzellen eine zytoplasmatische Paucimannosefärbung auf. (C) Doppelfärbung mit dem CD68-Antikörper (Dr. Sarah Förster): Während die Tumorzellen nur positiv für Paucimannose sind, exprimieren die Immunzellen im Zentrum des Präparatbereichs zusätzlich CD68.

Weiterhin wurde der Prozentsatz der Tumorzellen auf etwa 10 % gerundet und für die Auswertung in fünf Unterkategorien vereinfacht. Der größte Anteil der Proben wies mit 37,5 % eine Tumorzellfärbung von unter 5 % auf. In 19,9 % der Präparate waren die Tumorzellen zu mehr als 5 % und weniger als 10 % gefärbt, in 17,6 % zu 10 bis 20 % und in 10,2 % zu 30 bis 80 %. In 14,8 % der Proben waren keine Tumorzellen gefärbt.

Der vereinfachte H-Score repräsentiert das Produkt aus der Farbintensität und dem gerundeten Prozentsatz gefärbter Tumorzellen. Die Auswertung erfolgte entsprechend vier Subgruppen: In 80,7 % lag der H-Score unter 51 %, in 13,1 % zwischen 51 und 100 %, in 4,5 % zwischen 101 und 200 % und in 1,7 % zwischen 201 und 300 %.

Der in 400-facher Vergrößerung am stärksten gefärbte Bereich eines Präparats wurde ebenfalls ausgewertet. 14,2 % der Gewebeproben zeigten eine Färbung dieses Hot-Spot von mehr als 50 %, 85,8 % wiesen ein Färbung von 50 % oder weniger auf.

3.2.2 Demographische Daten und allgemeiner Gesundheitszustand

Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose betrug 61,8 Jahre, der Median lag bei 62 Jahren. 25 % der Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zwischen 58 und 65 Jahren alt. Die älteste Patientin erhielt in einem Alter von 83 Jahren die Primärdiagnose, die jüngste Patientin mit 16 Jahren. Hieraus ergibt sich eine Spannweite von 67 Jahren.

Tab. 7: Erhobene Parameter zur Einschätzung des Gesundheitszustand. Vor der Operation wurden die Patientinnen entsprechend ihres perioperativen Risikos in die ASA (American Society of Anesthesiologists) -Stufen 1 bis 4 klassifiziert. Zudem wurde routinemäßig der BMI (Body Mass Index) bestimmt. (Die prozentualen Angaben in der folgenden Tabelle sind auf die erste Nachkommastelle gerundet, wodurch ihre Summe bei einzelnen Parametern marginal von 100% abweicht.)

	Anzahl	Relativer Anteil (%)
ASA-Klassifikation präoperativ (N=176)		
ASA 1	10	5,7
ASA 2	101	57,4
ASA 3	63	35,8
ASA 4	2	1,1
BMI (kg/m²) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (N=174)		
Untergewicht (BMI<19)	8	4,6
Normalgewicht (BMI 19-24,9)	73	42
Übergewicht (BMI 25-30)	53	30,5
Adipositas (BMI 31-40)	29	16,7
Extreme Adipositas (BMI>40)	11	6,3

Präoperativ erfolgte die Einschätzung des individuellen perioperativen Risikos basierend auf Grunderkrankungen und funktionellen Einschränkungen der Patientinnen anhand des ASA-Klassifikationssystems (Tab. 7). 5,7 % der Patientinnen wurden präoperativ mit ASA 1 als gesund klassifiziert. Mit 57,4 % lag bei den meisten Patientinnen ein ASA 2-Stadium vor, welches einer milden systemischen Erkrankung entspricht. 35,8 % der Patientinnen

litten hingegen bereits präoperativ unter schweren systemischen Erkrankungen und wurden als ASA 3 klassifiziert. 1,2 % der Kohorte waren lebensbedrohlich vorerkrankt und wurden dem Stadium ASA 4 zugeordnet (Abb. 12)

Die Körpermaße und den Ernährungszustand der Patientinnen zum Zeitpunkt ihrer Tumordiagnose repräsentiert der BMI (Tab. 7). 42 % der Patientinnen der Kohorte hatten einen BMI zwischen 19 und 24 kg/m² und galten somit als normalgewichtig. Mit einem BMI von <19 kg/m² waren 4,6 % der Patientinnen formal untergewichtig. Bei 53,4 % der Patientinnen lag der BMI über 24 und somit oberhalb der Norm. In dieser Gruppe überlebten 48,4 % der Patientinnen den Beobachtungszeitraum, während 51,9 % der Patientinnen mit einem BMI unter 25 kg/m² diesen Zeitraum überlebten. Bei zwei Patientinnen waren weder Körpergröße noch Gewicht und somit auch kein BMI eruiert (Abb. 12).

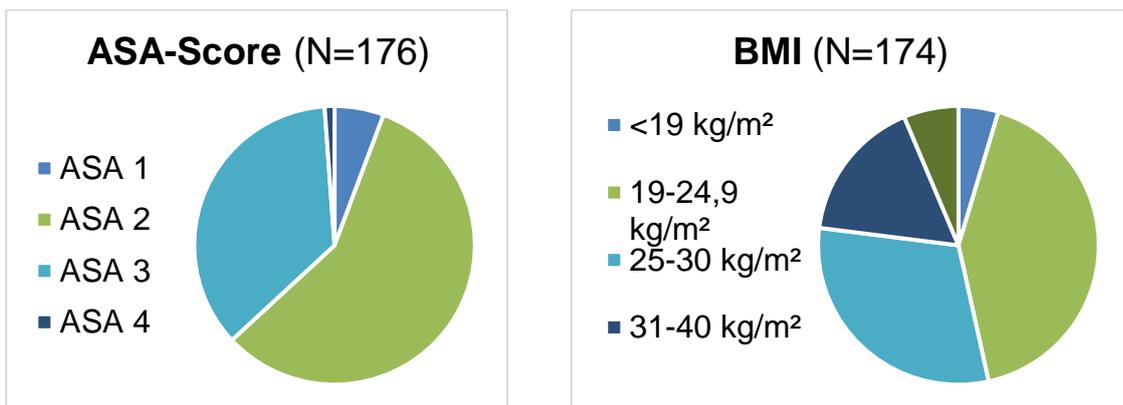


Abb. 12: Verteilung der Risikoklassifikation der American Society of Anesthesiologists (ASA) und des BMI in der Patientinnenkohorte

Präoperativ wurden zur Evaluation des perioperativen Risikos und zur Operationsplanung der ASA-Score und der BMI bestimmt.

3.2.3 Details zum operativen Eingriff

Informationen zu den peri- und intraoperativ dokumentierten Parametern sind in den Tabellen 8 und 9 dargestellt.

Tab. 8: Im Kontext der zytoreduktiven Operation erhobene Parameter in absoluten Zahlen und Prozentangaben. (Die prozentualen Angaben in der folgenden Tabelle sind auf die erste Nachkommastelle gerundet, wodurch ihre Summe bei einzelnen Parametern marginal von 100% abweicht.)

	Anzahl	Relativer Anteil (%)
Operation (N=176)		
primäre OP	145	82,4
Rezidiv-OP	29	16,5
Zweitrezidiv-OP	2	1,1
Laparoskopische Diagnosesicherung (N=176)		
ja	104	59,1
nein	72	40,9
Tumorverteilung (N=176)		
auf den Unterbauch begrenzt	49	27,8
bis zum rechten Zwerchfell	22	12,5
beide Zwerchfelle betroffen	15	8,5
inklusive Dünndarmmesenterium	90	51,1
Darmanastomose (N=176)		
ja	93	52,9
Rektosigmoid	43	24,4
Kolon	14	8,0
Ileozökalpol	1	0,6
Dünndarm	5	2,8
mehrere Anastomosen	30	17,0
nein	83	47,1
Lymphonodektomie pelvin und paraaortal (N=176)		
ja	103	58,5
nein	73	41,5
Postoperativer Tumorrest (N=176)		
ja	61	34,7
Resttumor unbekannt	7	4,0
1 mm Resttumor	5	2,8
2 bis 5 mm Resttumor	21	11,9
6 bis 10 mm Resttumor	16	9,1
>10 mm Resttumor	12	6,8
nein	115	65,3
Lokalisation des Resttumors (N=61)		
Dünndarmmesenterium	22	36,1
Dünn- oder Dickdarm	17	27,9
Dickdarmmesenterium	2	3,3
Leber und Leberpforte	4	6,6
Retroperitoneum	2	3,3
Zwerchfell	4	6,6
diffuse Ausbreitung im Situs	9	14,8
A. mesenterica superior und Pankreas	1	1,6

Tab. 9: Lagemaße mit Standardabweichung (SD) und Spannweite des intraoperativ erhobenen Peritonealkarzinoseindex (PCI). Dieser quantifiziert die peritoneale Tumorausbreitung.

	Mittelwert \pm SD	Median (Spannbreite)
PCI (N=174)	12,8 \pm 6,2	13 (2-30)

Bei der Mehrheit der Patientinnen (145) war die von uns betrachtete Operation der primäre operative Eingriff. In 29 Fällen handelte es sich um eine Rezidiv-Operation und in zwei Fällen um die Operation eines zweiten Rezidivs. Eine laparoskopische Diagnosesicherung im Voraus fand bei 104 Patientinnen der Kohorte statt.

Die intraabdominelle Tumorausbreitung wurde im Operationsbericht festgehalten, wobei ein auf den Unterbauch begrenztes Tumorgeschehen in 27,8 % der Fälle dokumentiert wurde. In 51,1 % der Fälle war das Dünndarmmesenterium makroskopisch mitbetroffen und es zeigte sich somit ein fortgeschrittener Tumorbefall des Abdomens. Bei 12,5 % der Patientinnen reichte die Tumorausbreitung bis zum rechten Zwerchfell, in 8,5 % waren beide Zwerchfelle betroffen (Abb. 13).

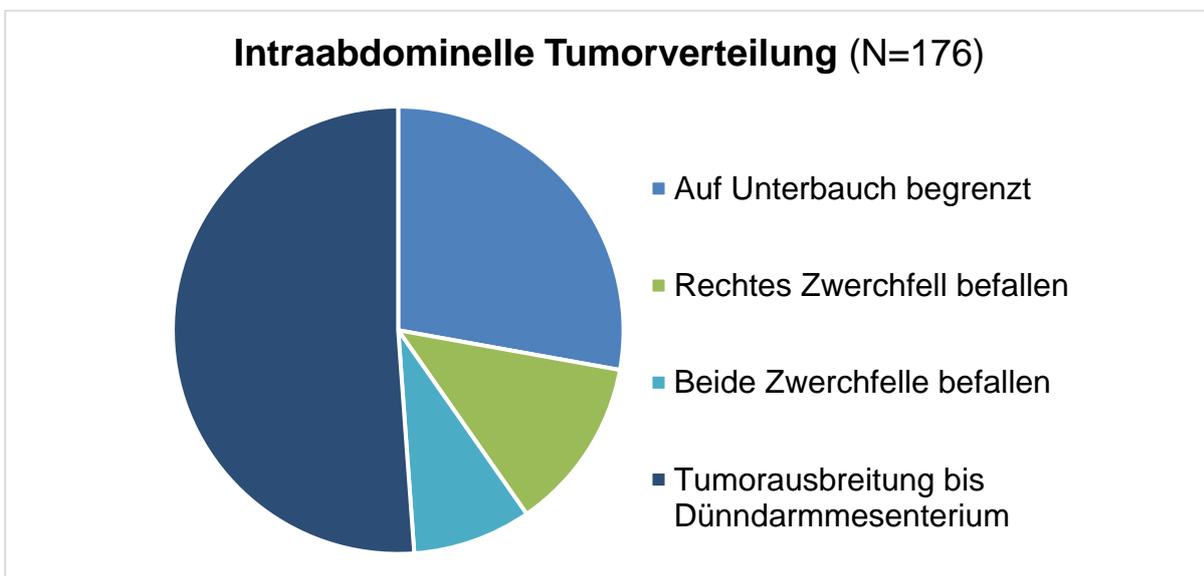


Abb. 13: Ausprägung des intraabdominellen Tumorgeschehens

Intraoperativ wurde die Ausbreitung des ovariellen Tumors durch die Operierenden dokumentiert. In über 50 % der Fälle reichte die Tumorausbreitung bis zum Dünndarmmesenterium.

Bei 52,9 % der Patientinnen mussten im Rahmen der Tumoroperation Teile des Darms entfernt und Anastomosen geschaffen werden. In den meisten Fällen handelte es sich hierbei mit 24,4 % um eine Descendorektostomie bei Resektion von Sigma und Teilen des Rektums. Bei 8 % der Eingriffe erfolgte eine reine Kolostomie. Die chirurgische Entfernung eines Dünndarmabschnitts fand in 2,8 % und die Resektion des Ileozökals in 0,6 % statt. Bei 17 % der Operationen mit Darmresektion mussten verschiedene intestinale Bereiche reseziert und folglich mehrere Anastomosen gebildet werden (Abb. 14).

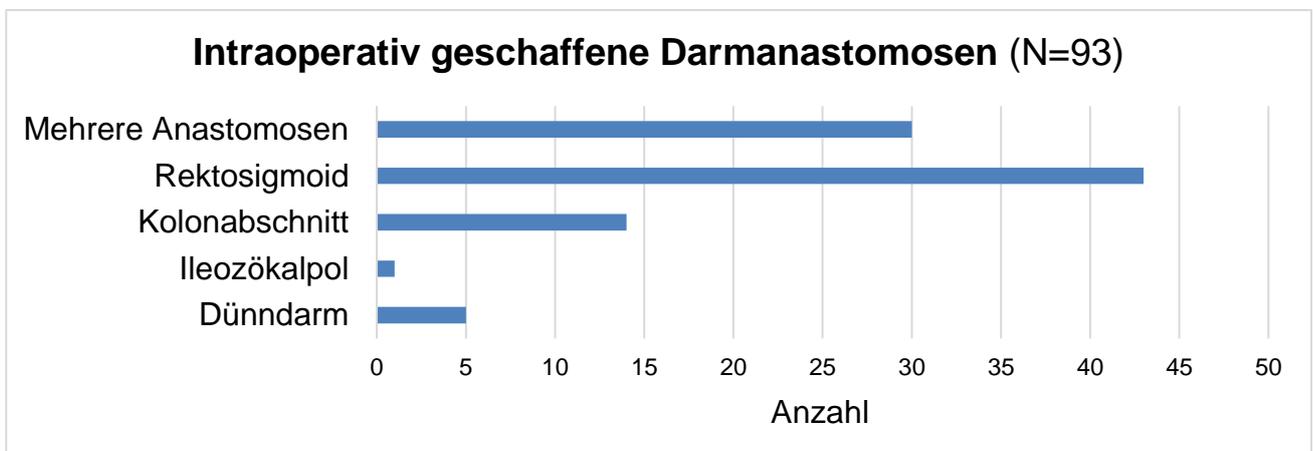


Abb. 14: Verteilung der verschiedenen intraoperativ geschaffenen Darmanastomosen

Resektionen von Darmanteilen erfolgten bei über 50 % der Patientinnen. Bei den meisten Patientinnen wurde das Rektosigmoid aufgrund fortgeschrittener Tumorausbreitung entfernt. Im Fall von mehreren Anastomosen wurde mit einer Ausnahme immer das Rektosigmoid mit reseziert.

Eine Entfernung der pelvinen und aortalen Lymphknoten erfolgte im Rahmen der Tumoroperation bei 58,5 % der Patientinnen, wobei sich in 68 % dieser Fälle Lymphknotenmetastasen histologisch bestätigen.

In der Kohorte von 176 Patientinnen wurde in 65,3 % der Fälle die Entfernung sämtlicher makroskopischer Tumormanifestationen erreicht. In den übrigen 34,7 % verblieben postoperativ makroskopische Tumorresiduen. Diese Residuen hatten in 2,8 % der Fälle eine Größe von 1 mm. 11,9 % zeigten eine Größe von 2 bis 5 mm, 9,1 % eine Größe von 6 bis

10 mm und 6,8 % wiederum eine Größe von über 10 mm. In 4 % der Fälle blieb das Ausmaß des postoperativen Tumorrests unbekannt (Abb. 15).

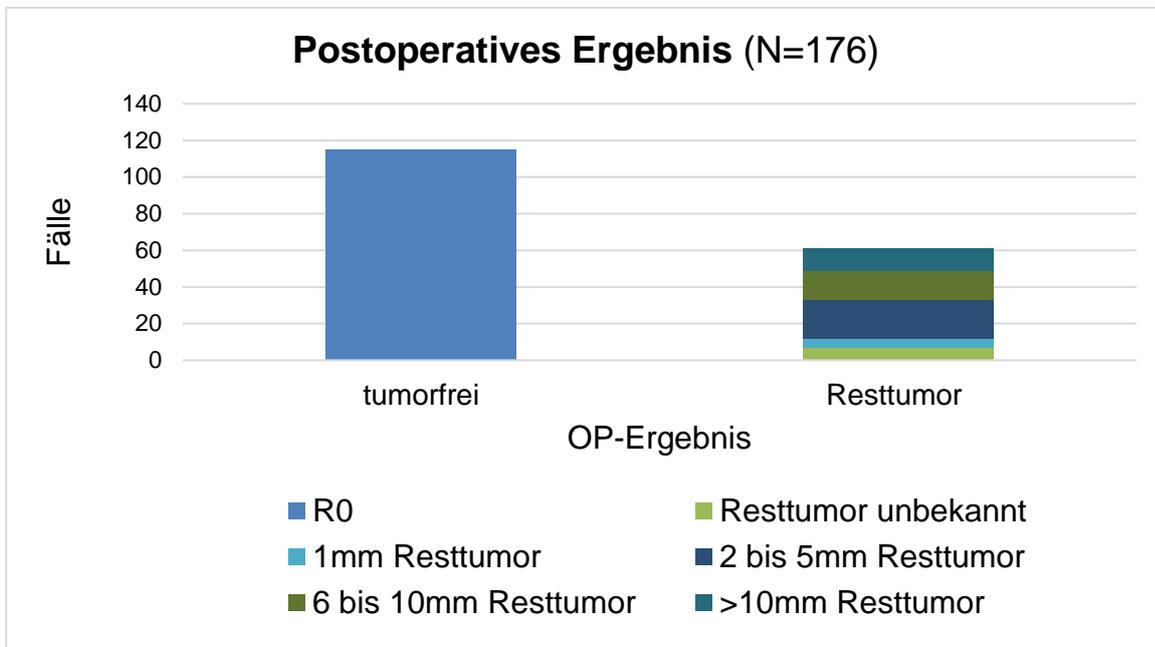


Abb. 15: Postoperative Tumorlast

Der überwiegende Teil der Patientinnen konnte makroskopisch tumorfrei operiert werden. Tumorresiduen zeigten in den meisten Fällen eine Größe von mindestens 2 mm.

Das Dünndarmmesenterium war mit 36,1 % die häufigste Resttumorlokalisation, dicht gefolgt von Dünn- und Dickdarmanteilen selber, wo sich zu 27,9 % Tumorreste befanden. Bei 14,8 % der Tumorresiduen handelte es sich um eine diffuse Ausbreitung in der Bauchhöhle. In jeweils 3,3 % zeigte sich ein Befall des Dickdarmmesenteriums und des Retroperitoneums, in jeweils 6,6 % waren die Leber inklusive der Leberpforte sowie die Zwerchfelle beteiligt. Die Arteria mesenterica superior und das Pankreas waren in 1,6 % betroffen (Abb. 16).

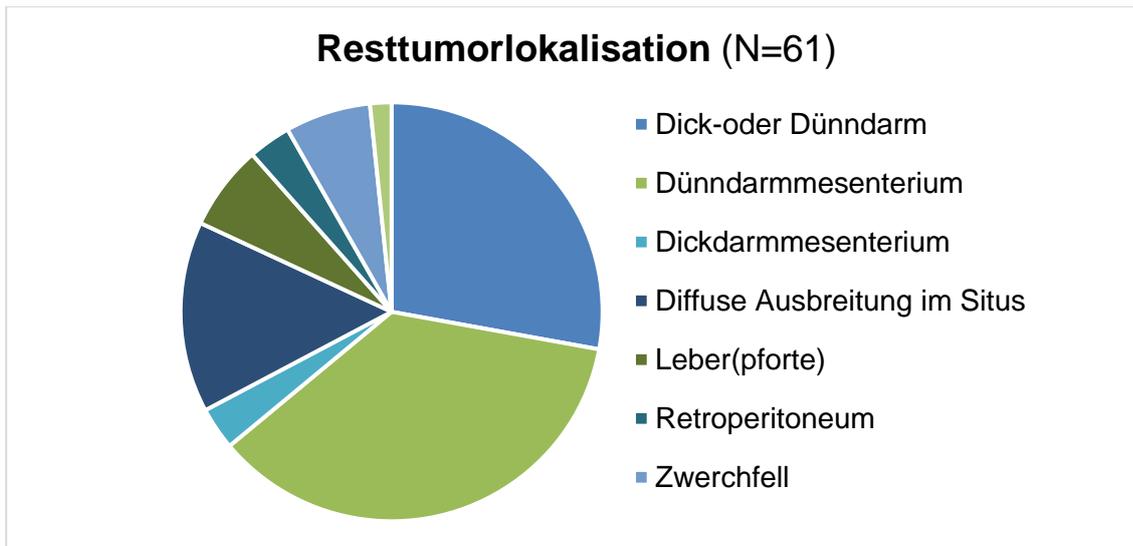


Abb. 16: Lokalisationen der postoperativ verbliebenen Tumorresiduen

In 61 Fällen konnte in der durchgeführten Operation keine makroskopische Tumorfreiheit erreicht werden. Am häufigsten fanden sich Residuen im Dünndarmmesenterium.

Der PCI (Jacquet und Sugarbaker, 1996) wurde intraoperativ bei 174 Patientinnen durch die Operierenden erhoben und dient der Quantifizierung der peritonealen Tumormasse. Im Durchschnitt lag er bei 12,81 (\pm SD 6,2), der Median betrug 13 mit einer Spannbreite von 2 bis 30.

Für die FIGO-Stadien IA bis IIIA (N = 34), die einen lokalisierten Tumor mit einer maximal mikroskopisch extrapelvinen Ausbreitung beschreiben, ergab sich ein gemittelter PCI von 4,7. Weit fortgeschrittene FIGO-Stadien ab IIIB, welche mit einer makroskopischen Tumorausbreitung über das kleine Becken hinaus einhergehen (N = 140), hatten im Mittel einen PCI von 14,8. Beim Vorliegen von makroskopischer Tumorfreiheit lag der PCI durchschnittlich bei 11, bei einem postoperativen Tumorrest bei 16,2.

3.2.4 Staging

Die Verteilung der FIGO-Stadien und Lymphknotenmetastasen repräsentiert Tabelle 10.

Tab. 10: Informationen zur Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms. Die Erkrankung wird standardmäßig anhand der FIGO-Klassifikation charakterisiert. FIGO-Stadium und Lymphknotenstatus wurden in der untersuchten Kohorte dokumentiert und ausgewertet. (Die prozentualen Angaben in der folgenden Tabelle sind auf die erste Nachkommastelle gerundet, wodurch ihre Summe bei einzelnen Parametern marginal von 100% abweicht.)

	Anzahl	Relativer Anteil (%)
FIGO-Stadium (N=176)		
FIGO I	10	5,7
A	4	2,3
B	2	1,1
C	4	2,3
FIGO II	10	5,7
A	4	2,3
B	6	3,4
FIGO III	135	76,7
A	14	8,0
A1	11	6,3
A2	3	1,7
B	10	5,7
C	111	63,1
FIGO IV	21	11,9
A	17	9,7
B	4	2,3
Lymphknotenmetastasen (N=176)		
ja	91	51,7
pelvin	72	40,9
paraaortal	12	6,8
pelvin und paraaortal	4	2,3
axillär und supraklavikulär	3	1,7
nein	51	29,0
Nx	34	19,3

Mit fast 63,1 % lag der größte Teil der operativ diagnostizierten Tumore in der Kohorte in einem FIGO-Stadium IIIC vor. Jeweils 5,7 % der Patientinnen wurden mit einem auf die Ovarien begrenzten Karzinom im Stadium I bzw. einer Tumorausbreitung ins kleine Becken und somit einem Stadium II erstdiagnostiziert. 88,6 % der Ovarialtumoren waren zum Diagnosezeitpunkt bereits in einem fortgeschrittenen Stadium, davon 86,5 % in einem Stadium III und 13,5 % in einem Stadium IV (Abb. 17).

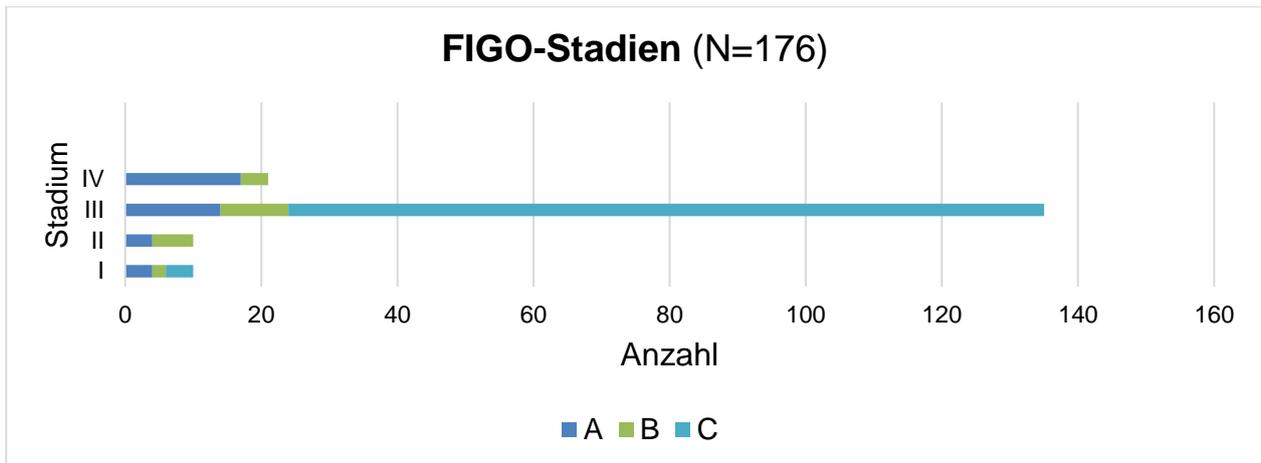


Abb. 17: Verteilung der FIGO-Stadien I bis IV

Die Erstdiagnose erfolgte beim Großteil der Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium III. Hierunter war das Stadium IIIC am häufigsten vertreten.

Nach histologischer Aufarbeitung zeigte sich in 51,7 % der Fälle eine Tumorausbreitung in die Lymphknoten, wovon der überwiegende Anteil mit 79,1 % die pelvinen Lymphstationen betraf. Bei 19,3 % der Patientinnen war keine Aussage über den Lymphknotenstatus möglich (Nx), bei 29 % präsentierten sich die Lymphknoten unauffällig (Abb. 18).

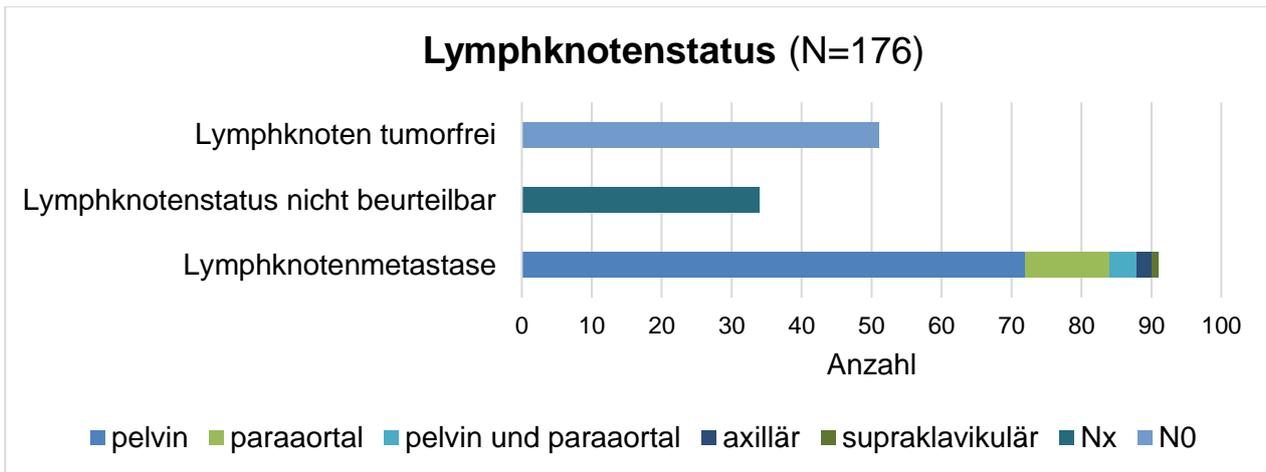


Abb. 18: Tumorausbreitung in die Lymphknoten

In über der Hälfte der Fälle waren in der histopathologischen Aufarbeitung der intraoperativ entnommenen Lymphknoten Tumorzellen nachweisbar. Hierbei handelte es sich überwiegend um pelvine Lymphknoten. Paraaortale, axilläre und supraklavikuläre Lymphknotenmetastasen traten seltener auf. Bei fast 20 % der Patientinnen war der Lymphknotenstatus unbekannt (Nx).

3.2.5 Durchgeführte Therapiemaßnahmen

In Tabelle 11 sind die therapeutischen Maßnahmen dargestellt, die im Rahmen der Behandlung des Ovarialkarzinoms durchgeführt wurden. Bei 93,7 % der Patientinnen mit dem oben beschriebenen ovariellen Karzinom erfolgte eine adjuvante medikamentöse Therapie im Anschluss an die Debulking-Operation.

43,7 % der Patientinnen erhielten vor der Operation eine neoadjuvante Chemotherapie, wobei es sich in dieser Gruppe bei 97,4 % der Fälle um ein FIGO-Stadium IIIB bis IV handelte. Nach primärer Chemotherapie und anschließender Intervalloperation konnte in 50,6 % eine makroskopische Tumorfreiheit erreicht werden. Eine primäre Zytoreduktion erfolgte hingegen in 56,3 % der Fälle. Hier lag bei 67,7 % der Patientinnen ein FIGO-Stadium von mindestens IIIB vor und 76,8 % der Patientinnen wurden makroskopisch tumorfrei operiert.

Im Rahmen des Therapiekonzepts wurden 46 % der Patientinnen mit dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab behandelt. In einem dieser Fälle musste die Gabe bei neu aufgetretener arterieller Hypertonie frühzeitig abgebrochen werden.

Tab. 11: Medikamentöse Behandlung bei den in die Studie eingeschlossenen Patientinnen. Entsprechend der Diagnose und dem individuellen Allgemeinzustand fand die Therapie vor und/oder nach dem operativen Eingriff statt. Eine Gabe des VEGF-Hemmers Bevacizumab erfolgte ab dem Stadium IIIB. (Die prozentualen Angaben in der folgenden Tabelle sind auf die erste Nachkommastelle gerundet, wodurch ihre Summe bei einzelnen Parametern marginal von 100% abweicht.)

	Anzahl	Relativer Anteil (%)
Neoadjuvante Chemotherapie (N=176)		
ja	77	43,7
nein	99	56,3
Postoperative Nachbehandlung (N=176)		
ja	165	93,7
nein	11	6,3
Therapie mit Bevacizumab (N=176)		
ja	81	46,0
nein	95	54,0

3.3 5-Jahres-Überleben nach FIGO-Stadium

Tabelle 12 veranschaulicht das 5-Jahres-Gesamtüberleben (5-year overall survival, 5YOS) und das krankheitsfreie 5-Jahres-Überleben (5-year disease-free survival, 5YDFS) abhängig vom FIGO-Stadium. Die Überlebensanalysen erfolgten anhand der Kaplan-Meier-Methode (siehe Anhang 2).

Tab. 12: 5-Jahres-Gesamtüberleben (5YOS) und krankheitsfreies 5-Jahres-Überleben (5YDFS) entsprechend Krankheitsstadium nach Kaplan-Meier-Methode.

FIGO-Stadium	5YOS (%)	5YDFS (%)
FIGO I	100,00	90,00
FIGO II	85,71	33,33
FIGO III	42,68	9,27
FIGO IV	19,64	0,00

Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums im März 2022 waren 50 % der in die Kohorte eingeschlossenen Patientinnen verstorben. Das durchschnittliche Überleben der Patientinnen zum Ende des Beobachtungszeitraums im März 2022 betrug 35,4 Monate. Mit einem fortgeschrittenen FIGO-Stadium ging ein geringeres 5YOS einher. Während im Stadium I 100 % und im Stadium II 85,71 % der Patientinnen überlebten, lag das 5YOS im Stadium III bei 42,68 %. Für das Stadium IV reduzierte sich dieser Wert nochmals auf 19,64 % (Abb. 19).

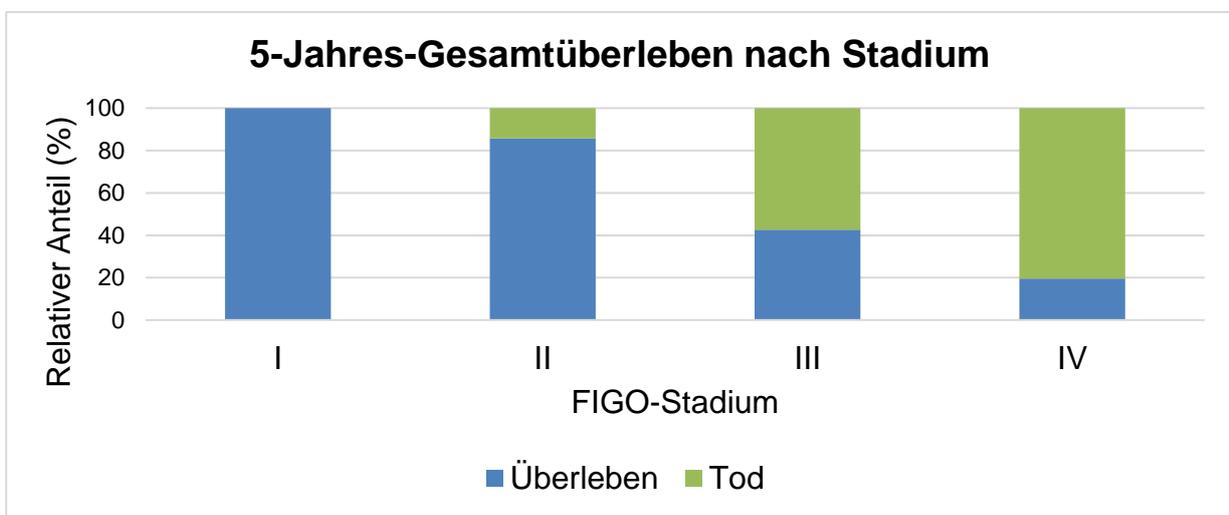


Abb. 19: 5-Jahres-Gesamtüberleben (5YOS) nach FIGO-Stadium

In den frühen FIGO-Stadien I und II lag das 5YOS bei 100 beziehungsweise 85 %. Die fortgeschrittenen Stadien III und IV war mit einem 5YOS von unter 50 % assoziiert.

71 % der zwischen Januar 2010 und Dezember 2020 erstdiagnostizierten Patientinnen entwickelten bis März 2022 ein Rezidiv ihres Ovarialkarzinoms. Die durchschnittliche Dauer bis zum Wiederauftreten der Tumorerkrankung betrug 23,8 Monate. Im FIGO-Stadium I lag das 5YDFS bei 90 %, im Stadium II bei 33,33 % und im Stadium III bei 9,27 %. Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom des FIGO-Stadiums IV erkrankten ohne Ausnahme innerhalb von fünf Jahren an einem Rezidiv (Abb. 20).

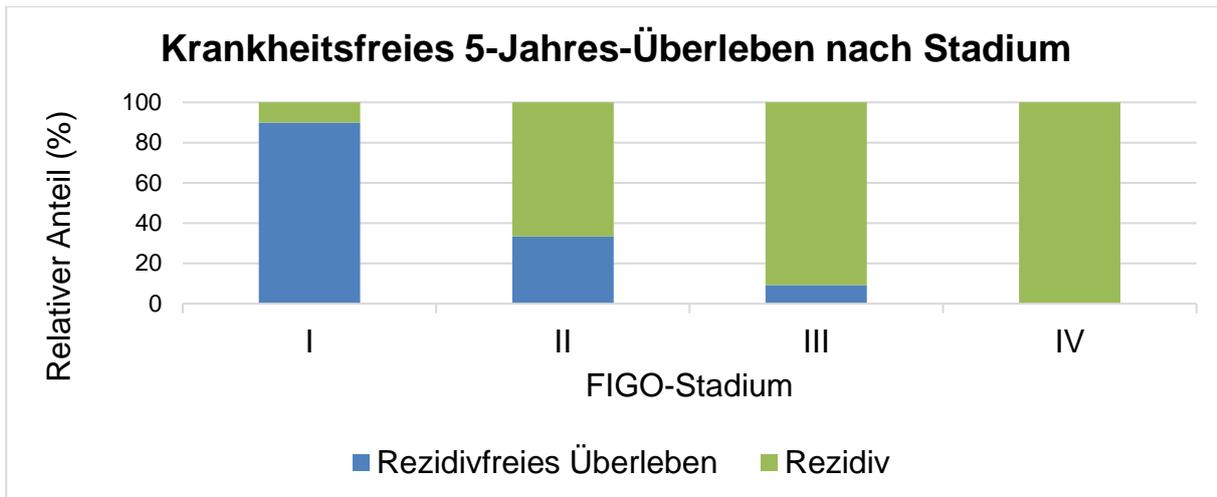


Abb. 20: Krankheitsfreies 5-Jahres-Überleben (5YDFS) nach FIGO-Stadium

Die fortgeschrittenen FIGO-Stadien III und IV waren im 5-Jahres-Intervall mit einer höheren Rezidivrate assoziiert als die frühen Stadien I und II.

3.4 Überlebenszeitanalyse

Im Rahmen der schließenden Statistik wurden 5YOS und 5YDFS abhängig von den Unterkategorien der verschiedenen immunhistochemischen Auswertungskriterien mit dem Log-Rank-Test analysiert und danach auf Signifikanz geprüft (siehe Kapitel 2.6). In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse dargestellt. Für die allgemeine Paucimannosefärbung ergab sich beispielsweise für keine bis wenige gefärbte Zellen ein 5YOS von 42,94 % und ein 5YDFS von 11,00 %, während die Färbung vieler Zellen mit einem 5YOS von 42,94 % und ein 5YDFS von 12,69 % einherging. Die auf der Basis dieser Daten berechneten p -Werte für 5YOS und 5YDFS abhängig von der allgemeinen Paucimannosefärbung lagen über dem kritischen Wert von 0,05 und waren somit nicht signifikant. Die Auswertungskriterien Färbeintensität, Prozentanteil gefärbter Tumorzellen nach IRS, IRS, genauer Prozentanteil gefärbter Tumorzellen und der H-Score wiesen in Bezug auf die Überlebenskurven von 5YOS und 5YDFS ebenfalls p -Werte oberhalb des Signifikanzniveaus von 0,05 auf. Signifikante Ergebnisse zeigten sich hingegen für die immunhistochemische Färbung von Immunzellen. Das 5YDFS lag für Präparate mit gefärbten Immunzellen bei 16,06 %, während Präparate ohne Immunzellfärbung ein 5YDFS von 6,16 % hatten ($p = 0,035$). Für das 5YOS ergab sich für den Unterschied der beiden

Unterkategorien der Immunzellfärbung ein p -Wert von 0,052, der gerundet ebenfalls als signifikant gewertet wurde. Weiterhin lagen die Differenzen im 5YOS bei der Betrachtung des Hot Spots der Präparate mit einem p -Wert von 0,029 deutlich unter dem kritischen Wert. Fälle mit einer Tumorzellfärbung von maximal 50 % in 400-facher Vergrößerung hatten ein 5YOS von 46,72 %. Bei einer Tumorzellfärbung von über 50 % in derselben Vergrößerung lag das 5YOS im Vergleich dazu bei 23,68 %. Auch Rezidive traten bei einer Tumorzellfärbung des Hot Spots von maximal 50 % weniger auf. Bezüglich des 5YDFS ergaben sich allerdings keine signifikanten Ergebnisse ($p = 0,700$).

Tab. 13: Outcome nach immunhistochemischem Auswertungskriterium. Die Unterkategorien der acht Auswertungskriterien wurden hinsichtlich des 5-Jahres-Gesamtüberlebens (5YOS) und des krankheitsfreien 5-Jahres-Überlebens (5YDFS) verglichen. Mithilfe des Log-Rank-Tests wurde pro Kriterium ein p-Wert berechnet der anschließend auf Signifikanz geprüft wurde. Signifikante Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle durch orange-farbene Markierungen gekennzeichnet.

Auswertungskriterium	Unterkategorien					p-Wert
1. Paucimannosefärbung der Tumorzellen allgemein (0 - 2)	Keine bis wenige Zellen gefärbt (0 - 1)	Viele Zellen gefärbt (2)				
5YOS	42,94 %	44,29 %				0,991
5YDFS	11,00 %	12,69 %				0,073
2. Farbeintensität (0 - 3)	Keine Färbung (0)	Schwache bis mittlere Intensität (1 - 2)	Starke Intensität (3)			
5YOS	29,33 %	45,51 %	47,01 %			0,233
5YDFS	14,22 %	7,10 %	13,62 %			0,530
3. Prozentanteil gefärbter Tumorzellen nach Immunreaktivem Score (0 - 4)	keine Färbung, < 10% (0 - 1)	10 - 50%, 51 - 80%, > 80% (2 - 4)				
5YOS	45,39 %	38,05 %				0,477
5YDFS	11,13 %	12,95 %				0,151
4. Immunreaktiver Score (Farbintensität x Prozentanteil gefärbter Tumorzellen)	0 - 1	2 - 3				
5YOS	45,47 %	42,35 %				0,856
5YDFS	10,51 %	16,81 %				0,126
5. Färbung von Immunzellen (0 - 2)	Immunzellen-gefärbt (1)	Keine Immunzellen gefärbt oder andere Zellen gefärbt (0, 2)				
5YOS	42,20 %	36,70 %				0,052
5YDFS	16,06 %	6,16 %				0,032
6. Genauer Prozentanteil gefärbter Tumorzellen für H-Score	Keine Färbung (0)	< 5 % (1 - 2)	5 - < 10 % (3)	10 - 20 % (4-5)	30 - 80 % (6 - 11)	
5YOS	28,15 %	49,43 %	54,75 %	34,37 %	38,37 %	0,185
5YDFS	13,61 %	9,06 %	12,25 %	14,16 %	13,47 %	0,238
7. H-Score in % (Farbintensität x genauer Prozentanteil gefärbter Tumorzellen)	0 - 50 %	51 - 100 %	101 - 200 %	201 - 300 %		
5YOS	45,45 %	36,93 %	37,50 %	66,67 %		0,650
5YDFS	11,80 %	10,73 %	18,23 %	66,67 %		0,829
8. Hot Spot (x40)	≤ 50 %	> 50 %				
5YOS	46,72 %	23,68 %				0,029
5YDFS	12,33 %	9,56 %				0,700

3.5 Korrelationsanalyse

Unter Anwendung des Spearman-Tests wurden die acht immunhistochemischen Auswertungskriterien mit vier klinisch-intraoperativen Parametern in Korrelation gesetzt (siehe Kapitel 2.6). Für keine der Variablen PCI, FIGO-Stadium, Tumorbefall oder Tumorfreiheit zeigten sich in Korrelation mit den Auswertungskriterien der Paucimannosefärbungen signifikante Ergebnisse (Tab. 14).

Tab. 14: Korrelationsanalyse mit dem Spearman-Test. Die vier klinisch-intraoperativen Parameter Peritonealkarzinoseindex (PCI), FIGO-Stadium, Tumorausbreitung auf den Dünndarm und Operationsergebnis wurden jeweils mit den acht Auswertungskriterien korreliert und auf Signifikanz geprüft. Oberhalb der festgelegten Grenzen wirken sich die Parameter negativ auf die Prognose aus.

Parameterbereich	Auswertungskriterium	p-Wert
PCI ≤ 9 vs. PCI > 9	Paucimannosefärbung allgemein	p=0,697
	Färbeintensität	p=0,714
	Prozentanteil gefärbter Tumorzellen n. Remmele	p=0,784
	Remmele-Score	p=0,846
	Färbung von Immunzellen	p=0,594
	Genauer Prozentanteil gefärbter Tumorzellen	p=0,946
	H-Score	p=0,778
	Hot-Spot	p=0,862
FIGO-Stadium IA-IIA vs. FIGO IIB-IVA	Paucimannosefärbung allgemein	p=0,343
	Färbeintensität	p=0,069
	Prozentanteil gefärbter Tumorzellen n. Remmele	p=0,801
	Remmele-Score	p=0,471
	Färbung von Immunzellen	p=0,124
	Genauer Prozentanteil gefärbter Tumorzellen	p=0,594
	H-Score	p=0,249
	Hot-Spot	p=0,992
Kein Tumorbefall des Dünndarms vs. Tumorbefall des Dünndarms	Paucimannosefärbung allgemein	p=0,575
	Färbeintensität	p=0,134
	Prozentanteil gefärbter Tumorzellen n. Remmele	p=0,858
	Remmele-Score	p=0,824
	Färbung von Immunzellen	p=0,227
	Genauer Prozentanteil gefärbter Tumorzellen	p=0,898
	H-Score	p=0,679
	Hot-Spot	p=0,538
Tumorfreiheit vs. postoperative Tumorresiduen	Paucimannosefärbung allgemein	p=269
	Färbeintensität	p=0,266
	Prozentanteil gefärbter Tumorzellen n. Remmele	p=0,200
	Remmele-Score	p=0,164
	Färbung von Immunzellen	p=0,161
	Genauer Prozentanteil gefärbter Tumorzellen	p=0,175
	H-Score	p=0,141
	Hot-Spot	p=0,713

4. Diskussion

4.1 Überblick

Die vorliegenden Ergebnisse stellen die Bedeutung des immunhistochemischen Paucimannose-Nachweises beim HGSOc heraus. Im Folgenden werden die immunhistochemische Färbemethode, die klinisch erhobenen Variablen und die Bedeutung einer effektiven Früherkennung für die Diagnose des Ovarialkarzinoms diskutiert und in den aktuellen Forschungsstand eingeordnet.

4.2 Immunhistochemische Färbung

4.2.1 Methode und Antikörper

Hinsichtlich der Färbemethode mit dem Paucimannose-spezifischen Antikörper Mannitou wurde auf verschiedene frühere immunhistochemische Untersuchungen zurückgegriffen. Vor der Antikörperinkubation erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität und unspezifischer proteinbindender Strukturen (Becker et al., 2019; Dahmen et al., 2015; Zipser et al., 2012). In vorherigen Studien zur Paucimannoseexpression wurde der Antikörper Mannitou unverdünnt (Dahmen et al., 2015) beziehungsweise in einer Verdünnung von 1:80 (Becker et al., 2019) verwendet. Nach sorgfältigen Vorversuchen wurde für die durchgeführten Färbungen eine an die Laborbedingungen angepasste Verdünnung von 1:50 gewählt. Im Glykan-Array des Consortium for Functional Glycomics zeigte der Antikörper Mannitou eine hohe Selektivität bei der Identifizierung der paucimannosidischen Struktur $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ und eine im Vergleich geringere Aktivität für Pentamannosen (Man_5) (Zipser et al., 2012). Entsprechend den Ergebnissen von Zipser *et al.* und Dahmen *et al.* wurde Mannitou für die Negativkontrolle mit 0,5 M Methyl- α -D-mannopyranosid vorbehandelt, wodurch der Primärantikörper nicht mehr für die Bindung paucimannosidischer Epitope der Schnitte zur Verfügung stand. Im Vergleich zur Methode von Zipser *et al.* wurde im Rahmen des vorliegenden Projekts keine Hitze induzierte Antigendemaskierung vor dem eigentlichen Färbeprozess durchgeführt. Diese kann nach Formalinbehandlung

der Rekonstruktion der Epitope dienen und sie so für Antikörper zugänglicher machen. Wie Vorversuche bestätigten ist eine Demaskierung für die Interaktion einiger Glykane und ihrer Antikörper, darunter auch Paucimannose und Mannitou, nicht notwendig und kann bei hitzelabilen Zuckerresten wie Polysialinsäuren sogar kontraproduktiv sein.

Der initial genutzte braune Farbstoff ImmPact DAB wurde im Verlauf der immunhistochemischen Färbungen nicht mehr verwendet, da der rote Farbstoff ImmPact NovaRED bei gleichem Färbeergebnis besser von unspezifischen Zellkernfärbungen und anderen Artefakten zu differenzieren war.

4.2.2 Paucimannoseexpression und Färbemuster

Die in Kapitel 3.2.1 aufgeführten Ergebnisse zur Paucimannoseexpression beim Ovarialkarzinom präsentierten sich ähnlich wie die Daten von Kaprio *et al.* (2015) zur N-Glykosylierung beim kolorektalen Karzinom. Im Rahmen einer Studie zur Charakterisierung des N-Glykoms beim Rektumkarzinom wurden Tumorpräparate von 220 Patientinnen und Patienten mit einem kolorektalen Karzinom immunhistochemisch hinsichtlich ihrer Paucimannoseexpression untersucht. In 55,3 % der Fälle zeigte sich ein negatives bis niedriges Signal für Paucimannose, während in 44,7 % der Fälle eine moderate bis starke Expression beschrieben wurde. Bei der immunhistochemischen Auswertung dieses Projekts wiesen 50,6 % der Ovarialkarzinompräparate ein negatives bis niedriges Signal und 49,4 % eine Färbung vieler Zellen auf. Auch wenn sich die Daten zur Paucimannoseexpression ähneln, ist die Vergleichbarkeit durch die Untersuchung von zwei verschiedenen Malignitäten reduziert. Ein weiterer limitierender Faktor für die Übertragbarkeit der Ergebnisse ist die Verwendung des Antikörpers mAb100-4G11-A anstelle von Mannitou bei der Färbung von kolorektalen Proben.

Der Antikörper mAb100-4G11-A IgM bindet ebenfalls die Kernstruktur $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ und wurde auch von Stavenhagen *et al.* (2021) in einer immunhistochemischen Untersuchung der Paucimannoseexpression verschiedener maligner Gewebe verwendet. Sowohl in Ovarialkarzinom- als auch in Kolonkarzinomproben wurde eine Paucimannosefärbung beobachtet, die jedoch jeweils nur in einem von drei Fällen stärker ausgeprägt war als in

benignem Kontrollgewebe. Es wäre interessant, die beiden Antikörper Mannitou und mAb100-4G11-A immunhistochemisch in denselben Proben zu vergleichen und ihre Selektivität für trimannosidische Glykane zu untersuchen.

Zwischen der Paucimannosefärbung der Ovarialkarzinompräparate in 400-facher Vergrößerung (Hot Spot) und dem Gesamtüberleben zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang. Eine Färbung von maximal 50 % der Tumorzellen im Hot Spot war mit einem 5YOS von 46,72 % assoziiert, während eine Färbung von über 50 % der Tumorzellen im Hot Spot mit einem 5YOS von 23,68 % einherging ($p = 0,029$). Dieses Ergebnis deutet auf eine negative Korrelation zwischen Paucimannosefärbung und Prognose hin. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Paucimannosefärbung und dem 5YOS konnte anhand der übrigen Auswertungskriterien wie der allgemeinen Paucimannosefärbung, der Farbintensität oder dem IRS nicht bestätigt werden.

Frühere Forschungsergebnisse schreiben Paucimannose ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Prognose maligner Erkrankungen zu. In massenspektrometrischen Analysen wiesen rektale Karzinome im Vergleich zu Rektumadenomen eine deutliche gesteigerte Paucimannoseexpression auf. Fortgeschrittene Karzinome mit einer schlechten Prognose waren in der Untersuchung signifikant mit einer hohen Paucimannoseexpression assoziiert (Kaprio et al., 2015).

Becker *et al.* (2019) zeigten in ihrer Untersuchung von zwei Zelllinien des Glioblastoms eine Korrelation zwischen der Paucimannoseexpression und der Aggressivität der Zellen. Darüber hinaus konnte nach Inkubation der Tumorzellen mit dem Mannitou-Antikörper eine verlangsamte Proliferation, Migration und Zelladhäsion nachgewiesen und nach Anwendung eines Zytostatikums eine verstärkte Paucimannoseexpression beobachtet werden. Dies führte dazu, dass erstmals eine negative regulatorische Funktion der Paucimannosylierung diskutiert wurde. Aufgrund der Analyse von einzelnen Zelllinien *in vitro* sowie der Betrachtung einer anderen Tumorentität sind diese Ergebnisse nur bedingt mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar.

Da der immunhistochemische Nachweis von Paucimannose bisher wenig erforscht ist, finden sich in der Literatur insgesamt nur wenige Daten zu diesem Thema. Um die Rele-

vanz der Paucimannosefärbung für die Prognose von Ovarialtumoren genauer zu untersuchen, ist ein immunhistochemischer Vergleich mit dem Paucimannose-Profil von benignem Ovarialgewebe erforderlich.

Im Hinblick auf die gefärbten Strukturen und das Färbungsmuster der Tumorzellen stimmen die Erkenntnisse dieser Arbeit mit den Forschungsergebnissen von Kaprio *et al.* und Zipser *et al.* überein. Auch die immunhistochemische Färbung kolorektaler Präparate zeigte primär eine zytoplasmatische und granuläre Expression von Paucimannose (Kaprio *et al.*, 2015; Zipser *et al.*, 2012). Eine Anreicherung im Membranbereich der Tumorzellen trat selten auf, eine Kernfärbung war nie sichtbar. Eine signifikante Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern konnte aus den Färberegebnissen ebenso wie im vorliegenden Projekt nicht abgeleitet werden. (Kaprio *et al.*, 2015).

Die immunhistochemische Färbung von fortgeschrittenen Glioblastompräparaten mit Mannitou zeigten als weitere Tumorentität ebenfalls eine deutliche Paucimannosefärbung des Zytosomas und der Zellfortsätze der Tumorzellen, während das umgebende, nicht-tumoröse Gewebe eine deutlich geringere Färbung aufwies (Becker *et al.*, 2019).

Über das Korrelat der Paucimannose-positiven Granula und die genaue Lokalisation und Entstehung von paucimannosidischen Glykanen in humanen Zellen herrscht aktuell noch Unklarheit. Enzyme aus der Gruppe der N-Acetyl- β -hexosaminidasen produzieren Paucimannosen in verschiedenen Zelltypen, darunter möglicherweise auch Tumorzellen (Tjondro *et al.*, 2019). Diese abbauenden Enzyme befinden sich typischerweise in Lysosomen, mit denen auch viele der bisher identifizierten paucimannosidischen Proteine assoziiert sind (Loke *et al.*, 2016). Neben dem Abbau von Biomolekülen übernehmen diese Zellorganellen wichtige Aufgaben im Bereich der Exozytose und des Proteintransports (Chatterjee *et al.*, 2019). Die Paucimannose-reichen Granula der neutrophilen Granulozyten haben einen lysosomenähnlichen Charakter. Ihre Sekretion wurde im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen nachgewiesen und deutet auf eine mögliche biofunktionelle Rolle von Paucimannose im Kontext der Immunantwort hin (Thaysen-Andersen *et al.*, 2015).

4.2.3 Immunzellfärbung

In den untersuchten Tumorpräparaten befanden sich neben Ovarialkarzinomzellen auch verschiedene Zellen des Immunsystems, darunter vor allem Makrophagen (siehe Kapitel 3.1). Der Körper versucht in der Regel, eine Krebserkrankung durch eine Immunantwort zu bekämpfen. Unter den das Tumorgebiet infiltrierenden Immunzellen befinden sich zum großen Teil tumorassoziierte Makrophagen (TAMs). In der immunsuppressiven Umgebung des Tumors kann der proinflammatorische Phänotyp der Makrophagen in einen alternativ aktivierten, antiinflammatorischen Zustand übergehen, welcher die Proliferation und Neoangiogenese des Tumors fördert (De Palma und Lewis, 2013).

Eine verschobene Kern-Plasma-Relation und erkennbare Nukleoli im Zellkern kennzeichnen die morphologischen Veränderungen der stark proliferierenden Tumorzellen. Zellüberlagerungen und ähnliche Durchmesser von Tumorzellen und Makrophagen stellten eine Herausforderung für die Unterscheidung der beiden Zelltypen dar. Um die von den Zellen ausgehenden Paucimannose-Signale richtig zuzuordnen, war die Anwendung eines gegen das für Makrophagen spezifische Molekül CD68 gerichteten Antikörpers relevant. Die bei einigen Präparaten im Anschluss an die Paucimannosefärbung durchgeführte Doppelfärbung mit dem CD-68-Antikörper (siehe Kapitel 2.4) diente der Bestätigung der vorherigen Einordnung von Ovarialkarzinomzellen und Makrophagen nach histologischen Kriterien und wurde daher nur exemplarisch durchgeführt.

Bei CD68 handelt es sich um ein transmembranes Glykoprotein, das insbesondere von monozytären Zellen wie Makrophagen, Mikroglia und Osteoklasten exprimiert wird. Es gibt Hinweise darauf, dass CD68 an verschiedenen Entzündungsvorgängen beteiligt ist und eine Rolle in tumorimmunologischen Prozessen spielt. TAMs in der direkten Tumorumgebung weisen eine Überexpression von CD68 auf (Chistiakov et al., 2017; Zhang et al., 2022).

Durch die Paucimannose-CD68-Doppelfärbung wurden bestimmte Zellen eindeutig als monozytär identifiziert. Paucimannose gilt als typisches von Neutrophilen und Makrophagen exprimiertes Glykan. (Hare et al., 2017; Loke et al., 2016). Bei der Differenzierung von monozytären Leukämiezellen der Zelllinie THP-1 in Makrophagen konnte eine deutliche Veränderung des Glykoms festgestellt werden, was die Bedeutung der Glykosylierung für

das Immunsystem unterstreicht (Delannoy et al., 2017). Auch nach Pathogenkontakt verändern sich das Glykosylierungsprofil und die Paucimannoseexpression von Makrophagen (Hare et al., 2017).

Darüber hinaus sind zahlreiche bioaktive, antimikrobielle Proteine in den Granula aktivierter neutrophiler Granulozyten Paucimannose-positiv (Thaysen-Andersen et al., 2015). Apoptotische Neutrophile werden mit ihren proteinreichen Granula von Makrophagen endozytiert, wodurch der Transfer der bioaktiven Granula erfolgt. Dieser Mechanismus verbessert die Immunantwort der Makrophagen und kann als kooperative Strategie des angeborenen Immunsystems gewertet werden (Tan et al., 2006).

Insgesamt zeigten fast 62 % der Präparate eine Immunzellfärbung, in den übrigen Fällen waren keine Immunzellen Paucimannose-positiv. Bei den in den Tumorpräparaten vorhandenen Immunzellen handelte es sich überwiegend um Makrophagen. Seltener waren Lymphozyten als Teil der Mikroumgebung des Tumors gefärbt. Dies könnte als Hinweis darauf gedeutet werden, dass TAMs ebenso wie nicht tumorassoziierte Makrophagen Paucimannose exprimieren.

Zwischen der Paucimannosefärbung von Immunzellen und den Outcome-Parametern 5YDFS und 5YOS wurde ein signifikanter Zusammenhang festgestellt. Tumorproben mit Immunzellen, die ein Paucimannose-Signal aufwiesen, waren invers mit der Mortalität und einem Rezidivaufreten im 5-Jahres-Intervall assoziiert ($p = 0,052$ und $p = 0,032$). Im Gegensatz zur Tumorzellfärbung im Hot Spot, die negativ mit dem 5-Jahres-Überleben korrelierte, konnte ein positiver Effekt zwischen der Paucimannosylierung der Immunzellen und den 5-Jahres-Überlebenskurven für Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben nachgewiesen werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass paucimannosidische Epitope auf verschiedenen Zelltypen über unterschiedliche Funktionen verfügen. Um eine mögliche protektive Funktion von Paucimannose im Hinblick auf die Immunzellfärbung zu prüfen, wäre es interessant, die Unterschiede in der Paucimannoseexpression zwischen klassisch aktivierten, den Tumor bekämpfenden und alternativ aktivierten, das Tumorstadium fördernden TAMs zu untersuchen.

Die signifikanten Ergebnisse bezüglich der Immunzellfärbung unterstreichen in jedem Fall die Rolle von Makrophagen im Tumorgeschehen. Bisherige Forschung hat gezeigt, dass

Tumorgewebe mit einem hohen Anteil an Makrophagen eine ungünstige Prognose aufweist. In einer immunhistochemischen Analyse zur Makrophagendifferenzierung bei epithelialen Ovarialkarzinomen wurden TAMs überwiegend in einem antiinflammatorischen, das Tumorstadium fördernden Phänotyp gefunden. Im Vergleich zu anderen histologischen Subtypen wiesen muzinöse und seröse Ovarialkarzinome signifikant mehr CD68-positive TAMs auf. Die Anzahl der CD68-positiven TAMs korrelierte außerdem mit dem histologischen Malignitätsgrad der Karzinome (Kawamura et al., 2009). Als Kritikpunkt am Studiendesign kann die relativ kleine Stichprobengröße von 40 Ovarialkarzinomen angeführt werden.

Die Bedeutung der Paucimannoseexpression von Makrophagen im Tumorgebiet ist zum aktuellen Zeitpunkt noch unklar. Stavenhagen *et al.* (2021) stellten in ihrer Arbeit zum Bindungsprofil des Makrophagenrezeptors CD206 die Hypothese auf, dass Tumorzellen durch die Präsentation von Paucimannose an den für dieses N-Glykan selektiven Rezeptor CD206 auf TAMs binden. In diesem Zusammenhang wird der Paucimannosebindung ein antiinflammatorischer Effekt zugeschrieben, der maligne Prozesse in der Tumorumgebung begünstigt. In der beschriebenen Publikation war die Übertragbarkeit auf das Ovarialkarzinom allerdings begrenzt, da die Expression des Makrophagenrezeptors und von Paucimannose in den Kontrollgeweben zum Teil genauso hoch war wie in den Karzinomproben.

Die funktionelle Rolle der Makrophagen in der Tumorbio­logie ist Gegenstand weiterer Forschung. Die Bedeutung der Paucimannose als Regulator maligner Prozesse und das Phänomen der Paucimannosylierung bei immunologischen Prozessen sollten ebenfalls weiter untersucht werden.

4.2.4 Weitere Zellfärbungen

Auch in den gefärbten Präparaten enthaltene Fibroblasten zeigten ein zytoplasmatisches Paucimannose-Signal. Hierzu passt eine Untersuchung des Glykoproteoms fetaler Fibroblasten aus dem Jahr 2016. Eine Analyse mittels Chromatographie und Massenspektrometrie konnte paucimannosidische Strukturen in lysosomalen Proteinen und solchen

des endoplasmatischen Retikulums nachweisen (Takakura et al., 2016). Bei der Paucimannosefärbung von Plattenepithel und Perizyten bleibt zu diskutieren, ob es sich um Zellfärbungen im eigentlichen Sinne oder um Artefakte handelt. Im Plattenepithel der Wangenschleimhaut konnten paucimannosidische Glykane bereits identifiziert werden (Everest-Dass et al., 2012).

4.3 Demographie und allgemeiner Gesundheitszustand

Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose lag in der untersuchten Kohorte mit 61,8 Jahren unter dem mittleren Erkrankungsalter in Deutschland von 68 Jahren (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2023). Ein höheres Alter bedingt als demographischer Risikofaktor mehr Komorbiditäten, die wiederum die Durchführung aggressiver Therapiemaßnahmen einschränken und somit zu einer erhöhten Mortalität des Ovarialkarzinoms führen können (Momenimovahed et al., 2019).

Zur Vollständigkeit und zur Charakterisierung der Kohorte wurde der körperliche Allgemeinzustand der Patientinnen mittels anästhesiologischer ASA-Klassifikation erhoben und der Ernährungszustand anhand des BMI dokumentiert.

Obwohl der ASA-Score als Annäherung an den Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Patientenstatus genutzt werden kann, um die Dauer des Krankenhausaufenthalts vorherzusagen (Young et al., 2015), kann er diesen nicht ersetzen. Insbesondere im Bereich der onkologischen Chirurgie ist der ECOG Patientenstatus für die Beurteilung von Aktivität und Allgemeinzustand von Tumorerkrankten relevant und sollte in weiterführenden Studien zusätzlich erhoben werden.

Bei knapp über der Hälfte der Patientinnen in der betrachteten Kohorte (53,4 %) lag der BMI mit über 24,9 kg/m² oberhalb der Norm. Insgesamt bestand bei 30,5 % der Patientinnen Präadipositas (bis 30 kg/m²) und bei 23 % Adipositas des Grades I bis III (>30 kg/m²). In mehreren Metaanalysen wurden Übergewicht und Adipositas als eindeutige Risikofaktoren für die Entstehung des Ovarialkarzinoms beschrieben (Lahmann et al., 2010; Liu et

al., 2015). Körperliche Aktivität ist hingegen mit einem reduzierten Auftreten von epithelialen Ovarialkarzinomen assoziiert (Cottreau et al., 2000). In einer Metaanalyse von 21 Studien konnte eine inverse Assoziation zwischen dem BMI und dem Überleben von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom festgestellt werden (Nagle et al., 2015).

4.4 Operatives Staging und Therapie

4.4.1 Laparoskopische Diagnosesicherung

59,1 % der in die Kohorte eingeschlossenen Patientinnen erhielten eine diagnostische Laparoskopie vor der Debulking-Operation. Diese ist laut Leitlinie kein Standard, wird aber im Rahmen von Studien durchgeführt. Technisch ist eine laparoskopische Adnektomie im Rahmen eines laparoskopischen Stagings unter Vermeidung einer Ruptur zwar möglich (Medeiros et al., 2008). Die gesamte Exploration des Peritoneums und aller abdominellen Strukturen kann durch eine Längslaparotomie jedoch mit höherer Sicherheit erreicht werden als mit einem laparoskopischen Eingriff (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Zur Beurteilung der Tumormanifestationen nach neoadjuvanter Therapie und zur Identifikation von Kandidatinnen für eine operative Zytoreduktion im Verlauf kann eine Laparoskopie sinnvoll sein (Fagotti et al., 2010). Im Rahmen einer Studie von Fagotti *et al* (2013) wurde bei 300 Patientinnen mit einem fortgeschrittenen epithelialen Ovarialkarzinom ein standardisiertes laparoskopisches Staging durchgeführt. Je nach laparoskopischem Befund wurden die Patientinnen primär operiert oder erhielten zunächst eine neoadjuvante Chemotherapie und eine Operation im Intervall. Unter dem Aspekt einer individualisierten Therapie und der Vermeidung von Laparotomie-assoziierten Komplikationen kann nach diesen Studienergebnissen die laparoskopische Diagnosesicherung bei fortgeschrittenen Tumorstadien erwogen werden. Kritisch zu sehen ist allerdings, dass in der Studie bei 50 % der Patientinnen nach laparoskopischem Staging eine neoadjuvante Therapie erfolgte. Dieser Anteil ist in der Realität in großen Zentren deutlich niedriger (Mueller et al., 2016).

4.4.2 Operationsergebnis und Lokalisation des Resttumors

Die Prognose des Ovarialkarzinoms hängt unmittelbar von den postoperativ verbleibenden Tumorresiduen beziehungsweise von der Radikalität der operativen Zytoreduktion ab. In diesem Zusammenhang beschreibt die Resterkrankung den größten Durchmesser des verbleibenden Tumors. Als „optimaler“ Tumorrest wurden von der Gynecologic Oncology Group Residuen bis 10 mm definiert. Ein allgemeiner Konsens über die Definition des optimalen Resttumors existiert bisher jedoch nicht (Chang et al., 2013). In den letzten Jahren wird ein chirurgisches Ergebnis mit ausschließlich mikroskopischem Tumorrest angestrebt, da belegt werden konnte, dass ein längeres Überleben mit der Entfernung aller makroskopischen Tumorresiduen korreliert (du Bois et al., 2009). Die Studiengruppe Ovarialkarzinom der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie und die Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire untersuchten in einer Metaanalyse mehrerer prospektiv randomisierter Phase-III-Studien die Operationsdaten von über 3000 Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom des Stadiums IIIB bis IV. Die makroskopische Komplettresektion wurde mit der oben beschriebenen optimalen Resektion mit Tumorresiduen von 1 bis 10 mm und der „suboptimalen“ Resektion mit einem Resttumor-Durchmesser von über 10 mm verglichen, wobei die Komplettresektion mit einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben und einem verlängerten krankheitsfreien Überleben für alle untersuchten FIGO-Stadien assoziiert war ($p < .0001$). Eine optimale Tumorsektion war einer suboptimalen Resektion hinsichtlich der progressionsfreien Zeit und des Gesamtüberlebens signifikant überlegen, wenngleich die Unterschiede weniger deutlich ausgeprägt waren (du Bois et al., 2009). Diese Ergebnisse konnten von anderen Autoren bestätigt werden (Chang et al., 2013; Horowitz et al., 2015).

In der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Kohorte konnte in fast 2/3 der Fälle (65,3 %) makroskopisch tumorfrei operiert werden. Im Falle von verbleibenden Tumorresiduen (34,7 %), hatten diese in 69 % einen maximalen Durchmesser von 10 mm und können somit als optimale Resektionsergebnisse bezeichnet werden. Suboptimale Tumorergebnisse mit einem makroskopischen Resttumor von über 10 mm wurden hingegen in 19,7 % dokumentiert. In den übrigen Fällen war der Durchmesser des Resttumors unbekannt.

Makroskopische Tumorresiduen befanden sich in 63,9 % auf den Darmschlingen oder auf dem Dünndarmmesenterium. Diffuse Tumormanifestationen im Situs wurden bei 14,8 % der Patientinnen mit Resttumor dokumentiert. Seltener waren die Leberpforte oder die Zwerchfellregion beteiligt (jeweils 6,6 %). Diese Ergebnisse entsprechen Forschungserkenntnissen zum Ausbreitungsmuster der Resterkrankung beim Ovarialkarzinom. In einer Studie mit über 500 Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Karzinom, die eine operative Zytoreduktion erhielten, konnten korrespondierend zu den Daten der untersuchten Kohorte 196 (33,9 %) Patientinnen nicht tumorfrei operiert werden. In 79,8 % der Fälle zeigte sich eine diffuse Ausbreitung auf Dünndarm und Mesenterium, die Leberpforte und das Ligamentum hepatoduodenale waren in 10,1 % betroffen (Heitz et al., 2016).

4.4.3 Darmanastomose bei intestinaler Tumorausbreitung

Im Rahmen des operativen Debulking kann eine ausgedehnte Resektion von Teilen des Darms notwendig sein, wenn hierdurch die Tumorfreiheit erreicht wird. Eine Infiltration der Mesenterialwurzel sowie eine ausgeprägter Tumorausbreitung in die Dünndarmwand limitieren eine radikale Zytoreduktion (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Studienergebnissen zufolge trägt die Resektion des Rektosigmoids bei fortgeschrittenen Tumorstadien signifikant zum Erreichen der makroskopischen Komplettresektion bei und senkt so die Rate an Rezidiven im Bereich des Beckens deutlich (Peiretti et al., 2012).

Ye *et al.* (2022) untersuchte über zwei Jahre hinweg Debulking-Operationen mit Darmresektionen bei 282 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom. Das Rektosigmoid war mit 83,8 % der am häufigsten resezierte Abschnitt und wurde bei einer ausgedehnten Resektion mehrerer Darmsegmente immer mitentfernt. Ähnlich verhielt es sich in der untersuchten Kohorte: Bei über der Hälfte der eingeschlossenen Patientinnen (52,9 %) mussten aufgrund der Tumormanifestationen Teile des Darms reseziert werden. Hierbei handelte es sich wie in der oben aufgeführten Studie bei den meisten Fällen um das Rektosigmoid und somit um eine Descendorektostomie. Auch die Entfernung mehrerer Darmabschnitte beinhaltete in fast allen Fällen die Rektosigmoidresektion, sodass dieser Darmabschnitt in 77,4 % der Operationen mit Darmresektion entfernt wurde.

4.4.4 Lymphonodektomie

Die Tumorausbreitung in die Lymphknoten tritt beim Ovarialkarzinom häufig auf und wird ebenfalls als prognosebestimmender Faktor gewertet. Auf das Becken beschränkte Karzinome des FIGO-Stadiums I oder II werden durch okkulte Lymphknotenmetastasen als fortgeschrittene Tumore des Stadiums III klassifiziert (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Die beidseitige pelvine und paraaortale Lymphonodektomie wird als Teil des operativen Stagings in Frühstadien bis FIGO IIA zur Identifikation von Lymphknotenmetastasen genutzt. In verschiedenen Studien bestätigte sich nach systematischer pelviner und paraaortaler Lymphonodektomie in 44 bis 53 % der Fälle histologisch ein Tumorbefall der Lymphknoten (Harter et al., 2007; Morice et al., 2003). Dies führte dazu, dass die systematische Lymphknotenextirpation mit einem Überlebensvorteil in Zusammenhang gebracht wurde.

Die internationale AGO LION Studie prüfte den Einfluss einer systematischen pelvinen und paraaortalen Lymphonodektomie beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom auf das OS. 647 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom im Stadium IIB bis IV wurden hinsichtlich der Durchführung einer Lymphonodektomie intraoperativ randomisiert. Inklusionskriterien waren klinisch unauffällige Lymphknoten und eine makroskopische Tumorfreiheit nach Zytoreduktion. Das mediane Überleben nach Lymphonodektomie betrug 65,5 Monate und ohne Lymphknotenentfernung 69,2 Monate, ein Überlebensvorteil durch die systematische Lymphknotenextirpation konnte nicht bestätigt werden. Das progressionsfreie Überleben lag in beiden Gruppen bei 25,5 Monaten. Allerdings war eine Lymphonodektomie häufiger mit postoperativen Komplikationen wie einer Re-Laparotomie und einer erhöhten 60-Tages-Mortalität assoziiert ($p = 0,01$ und $p = 0,049$) (Harter et al., 2019). Die Studienergebnisse gelten nicht für die systematische Lymphonodektomie beim frühen Ovarialkarzinom.

Die in das vorliegende Projekt eingeschlossenen Patientinnen erhielten nach den Daten der digitalen Patientinnenakten zu 58,5 % eine pelvine und paraaortale Lymphonodektomie. In 68 % dieser Fälle bestätigten sich Lymphknotenmetastasen in der histopathologischen Aufarbeitung.

4.4.5 Peritonealkarzinoseindex (PCI)

Der PCI wurde intraoperativ erhoben und im Operationsprotokoll dokumentiert. Der von Jacquet und Sugarbaker (1996) ursprünglich für Mesotheliome und kolorektale Karzinome entwickelte Punktescore charakterisiert 13 abdominale Regionen hinsichtlich des peritonealen Tumorbefalls. Diese Regionen beinhalten den Abdomen in einem 3 x 3 Raster sowie vier Dünndarmregionen. Zusätzlich wird die Tumorgöße nach dem Lesion Size Score mit 0 bis 3 beschrieben und mit der Anzahl der betroffenen Regionen multipliziert, sodass bei 13 möglichen Lokalisationen ein maximaler PCI von 39 erreicht werden kann. Bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen erlaubt der PCI eine Aussage über das Ausmaß der peritonealen Tumorlast. In einer prospektiven Beobachtungsstudie wurde bei 96 Patientinnen mit einem fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom des Stadiums IIIB bis IVA der PCI bestimmt und anschließend in Hinblick auf die Vollständigkeit der chirurgischen Zytoresektion und das Überleben untersucht. Ein PCI von über 13 war mit einem signifikant schlechteren Überleben assoziiert ($p = 0.050$). Ab einem PCI von über 12 war eine Komplettresektion deutlich unwahrscheinlicher. Insgesamt kam die Studie zu dem Ergebnis, dass sich mithilfe des PCIs zuverlässig eine Vorhersage zur Tumorlast und zum Erreichen einer chirurgischen Komplettresektion machen lässt und dass eine suboptimale Zytoreduktion als Prädiktor für das Gesamtüberleben genutzt werden kann ($p = 0.005$). Allerdings erwies sich der Index selber nicht als unabhängiges Prognoseinstrument für das Überleben mit einem serösen Ovarialkarzinom (Elzarkaa et al., 2018). Mehrere retrospektive Studien bestätigen den Nutzen des PCI als Prognosefaktor für fortgeschrittene Ovarialkarzinome in Bezug auf eine vollständige Komplettresektion und auch hinsichtlich des OS. Während viele Autorinnen und Autoren für die Untersuchung der Resektabilität und des Überlebens PCI-Grenzwerte zwischen 10 und 15 vorschlagen (Tentes et al., 2003), belegen Daten von Jónsdóttir *et al* (2021) eine starke Assoziation von PCI-Werten ab 24 und der Inoperabilität der Patientinnen. Insbesondere bei Patientinnen mit HGSOCS zeigte der PCI eine hohe Vorhersagbarkeit für das Erreichen einer kompletten Resektion und korrelierte invers mit 5YOS und 5YDFS ($p < 0.001$). Auch perioperative Komplikationen traten bei einem PCI-Score von über 9 signifikant häufiger auf ($p = 0.0023$) (Egger et

al., 2022). Aufgrund von Erfahrungswerten des gynäko-onkologischen Zentrums des Universitätsklinikums Bonn kann ein PCI-Wert bis einschließlich 9 auch als Annäherung für das Erreichen der makroskopischen Tumorfreiheit verwendet werden (siehe Kapitel 2.6).

Im Rahmen des Projekts wurde der PCI bei 174 Patientinnen erhoben und lag insgesamt durchschnittlich bei einem Score von 12,8. Für die FIGO-Stadien IA bis IIIA ergab sich ein gemittelter PCI von 4,7, während der PCI ab dem fortgeschrittenen FIGO-Stadium IIIB mit makroskopischer Tumorausbreitung über das kleine Becken hinaus bei 14,8 lag. Für ein postoperatives Ergebnis ohne Tumorresiduen lag der Punktescore durchschnittlich bei 11, im Falle von postoperativ verbleibendem Resttumor hingegen bei 16,2. Diese Ergebnisse untermauern die Korrelation zwischen peritonealer Tumormasse und dem Erreichen einer Komplettresektion.

4.4.6 Neoadjuvante Chemotherapie

Eine neoadjuvante Chemotherapie wurde bei 43,7 % der Patientinnen durchgeführt. Im Anschluss erfolgte in allen Fällen eine Intervalloperation. Bei 97,4 % der Patientinnen, die eine primäre Chemotherapie erhielten, befand sich das Ovarialkarzinom bereits in einem FIGO-Stadium IIIB bis IV. Das Vorliegen von fast ausschließlich fortgeschrittenen Tumoren erklärt mit hoher Wahrscheinlichkeit das Operationsergebnis des Intervalldebulkings. Nach neoadjuvanter Therapie konnten nur 50,6 % der Patientinnen makroskopisch tumorfrei operiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in 76,8 % der Fälle mit einer primären Zytoreduktion Tumorfreiheit erreicht. Bei Letzterer lag allerdings nur in 67,7 % ein Stadium IIIB bis IV vor.

Die primäre Chemotherapie mit anschließender operativer Zytoreduktion zeigte bisher keine Überlegenheit gegenüber dem primären Debulking. Ein möglicher Nutzen der neoadjuvanten Chemotherapie wird jedoch seit Langem kontrovers diskutiert.

In einer Analyse aus dem Jahr 2018 wurden die Langzeitergebnisse der randomisierten EORTC- und CHORUS-Studie zusammenfassend betrachtet. Insgesamt wurden 1220 Frauen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom untersucht, die entweder eine primäre Zy-

toreduktion oder eine neoadjuvante Chemotherapie mit anschließendem Debulking erhielten. Wie bereits in den Einzelstudien beschrieben, zeigte sich kein signifikanter Unterschied im medianen Überleben der beiden Subgruppen ($p = 0,586$). Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom im Stadium IV überlebten allerdings nach primärer Chemotherapie signifikant länger und zeigten zudem ein längeres progressionsfreies Überleben ($p = 0,048$, $p = 0,049$) (Vergote et al., 2018).

Nach diesen Metadaten könnte die primäre Chemotherapie insbesondere bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Stadium IV oder bei eingeschränkter Operationsfähigkeit aufgrund eines reduzierten Allgemeinzustandes und Komorbiditäten sinnvoll sein. Bei Limitationen der bisherigen Daten hinsichtlich operativer Radikalität und Qualitätsstandards bleiben die Ergebnisse der ARGO Trust Studie abzuwarten. Diese untersucht derzeit international randomisiert den optimalen Operationszeitpunkt des Ovarialkarzinoms. (AGO Study Group, 2023).

4.5 Limitationen

Die vorliegende Promotionsarbeit liefert eine Reihe von neuartigen Erkenntnissen und ist eine der ersten Untersuchungen zum immunhistochemischen Paucimannose-Nachweis beim Ovarialkarzinom. Allerdings gibt es gewisse Faktoren, die ihre Aussagekraft beeinträchtigen. Die durchgeführten Untersuchungen der Ovarialkarzinompräparate von 176 Patientinnen erfolgten im Rahmen einer retrospektiven Kohortenstudie. Ob sich die Ergebnisse dieser Arbeit auch in prospektiven Studien mit einer größeren Kohorte reproduzieren lassen, bleibt abzuwarten. Darüber hinaus wurden nur Tumorpräparate von Patientinnen mit einem HGSOc untersucht, welches mindestens 70 % der Ovarialkarzinome ausmacht (Prat, 2012). Eine Übertragbarkeit auf andere Subtypen ist durch die vorliegenden Forschungsergebnisse nicht gegeben. 43,7 % der Patientinnen in der untersuchten Kohorte erhielten eine neoadjuvante Chemotherapie vor der zytoreduktiven Operation. Bei 17,6 % der Patientinnen handelte es sich hierbei um einen Rezidiveingriff. Um die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse zu erhöhen, könnte ein Patientinnenkollektiv herangezogen werden, das ausschließlich Primärfälle ohne neoadjuvante Chemotherapie

umfasst. Wenn möglich, wurde für die Gewebekollektion das Hauptpräparat des Adnex-tumors verwendet. In einigen Fällen war jedoch die Untersuchung von Präparaten anderer Lokalisationen erforderlich. Ein immunhistochemischer Vergleich mit gesundem Ovarial-gewebe wäre relevant, um die Paucimannoseexpression von Ovarialkarzinomzellen bes-ser einordnen zu können. Die Verfügbarkeit von benignem Gewebe für diesen Vergleich ist jedoch begrenzt und könnte eine ethische Herausforderung darstellen.

Für die mikroskopische Auswertung der Präparate wurden immunhistochemische Scores wie der IRS und ein modifizierter H-Score angewandt. Die Erfassung von Tumorzellen, die Abschätzung des Prozentanteils gefärbter Zellen und die Bewertung der Farbintensität waren jedoch subjektiv und von der betrachtenden Person abhängig. Computer-gestützte Auswertungsmethoden und mehrere unabhängige Betrachtende könnten die mikroskopi-sche Auswertung immunhistochemischer Färbungen verbessern.

Die Ergebnisse dieser Dissertation liefern Hinweise darauf, dass paucimannosidische Proteine an Tumorerkrankungen und damit verbundenen immunologischen Prozessen beteiligt sind. Die Daten sind schwer einzuordnen, da Paucimannose ein bisher wenig erforschtes N-Glykan ist. Derzeit gibt es kaum Publikationen zum immunhistochemischen Nachweis von paucimannosidischen Strukturen beim Ovarialkarzinom. Bei verschiede-nen anderen malignen Erkrankungen wurde Paucimannose mittels immunhistochemi-scher Methoden nachgewiesen (Becker et al., 2019; Kaprio et al., 2015; Zipser et al., 2012). Vielversprechende Forschungsergebnisse zur Charakterisierung des N-Glykoms beim Ovarialkarzinom heben die Bedeutung von Veränderungen der N-Glyosylierung im Tumorumfeld hervor. (Briggs et al., 2019).

4.6 Stellenwert der Früherkennung beim Ovarialkarzinom und Ausblick

Ziel einer effektiven Früherkennung ist die Senkung der Mortalität durch die Erkennung von Karzinomen in frühen, behandelbaren Stadien. Beim Zervixkarzinom konnte bei-spielsweise durch die 1971 in Deutschland eingeführte jährliche gynäkologische Untersu-chung von Frauen zwischen 20 und 34 Jahren die Inzidenz und Mortalität deutlich gesenkt werden (Bujan Rivera und Klug, 2018). Trotz des insgesamt seltenen Auftretens stellt das

Ovarialkarzinom ein erhebliches Gesundheitsproblem für die Betroffenen dar. Die chirurgische Therapieoption der maximalen Zytoreduktion ist in fortgeschrittenen Stadien häufig nicht durchführbar. Zielpopulation für Früherkennungsmethoden ist einerseits die weibliche Allgemeinbevölkerung, in der ein Lebenszeitrisiko von etwa 1,3 % für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms herrscht (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2023). Andererseits können Risikopopulationen, die mithilfe einer Familienanamnese und Gentests identifiziert werden, gescreent werden. Bei diesen erhöht sich das Lebenszeitrisiko auf mindestens 10 %. Das individuelle Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, wird darüber hinaus von Lebensstil-assoziierten und reproduktiven Faktoren bestimmt (Nash und Menon, 2020). Bisher existiert keine Früherkennungsmethode, die in der Lage ist, die hohe Mortalität des Ovarialkarzinoms zu beeinflussen.

Die diagnostischen Methoden TVUS und CA-125 (siehe Kapitel 1.1.5) wurden in der Vergangenheit hinsichtlich ihres Früherkennungspotentials am meisten untersucht. Es gibt Hinweise darauf, dass ein multidimensionales Screening, bestehend aus CA-125-Bestimmung, Risikoeinschätzung mittels ROCA-Score und risikoadaptiertem TVUS, zu einer Reduktion der Mortalität von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom führen könnte. In Folgeuntersuchungen der UKTOCS-Studie wird das Potential eines multidimensionalen Screenings weiter geprüft (Jacobs et al., 2016).

Weitere Ansätze für die Früherkennung des Ovarialkarzinoms basieren unter anderem auf der Analyse von zellfreier, im Blut zirkulierender Tumor-DNA und auf der Identifikation von spezifischen Mutationen im Vaginalsekret (Cohen et al., 2018; Erickson et al., 2014). Darüber hinaus sind tumorbiologische Mechanismen für die frühzeitige Diagnose des Ovarialkarzinoms relevant. Tumorfiltrierende Lymphozyten sowie Vorgänge auf der Ebene der Genexpression und der Zellzyklusregulation sind Gegenstand aktueller Forschung und von prognostischer und prädiktiver Bedeutung (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Tumorbedingt veränderte Glykosylierungsmuster haben das Potenzial, als Biomarker die Früherkennung von Ovarialkarzinomen zu verbessern. Veränderte Glykane sind in Tumorzellen zahlreich vorhanden und spezifische Glykanstrukturen werden auf Tumorzellen

eindeutig exprimiert (Thomas et al., 2021). In den letzten Jahren hat sich die Analyse des Glykoms sowie des Glykoproteoms stetig weiterentwickelt. Die Charakterisierung des O-Glykosylierungsprofils von CA-125 verbesserte beispielsweise die Sensitivität des Biomarkers bei der Differenzierung von benignen und malignen Ovarialtumoren (Chen et al., 2013). Analysen von Serum, Plasma, Zelllinien und Gewebeproben zeigen abweichende N-Glykosylierungsmuster bei Ovarialkarzinomen (Briggs et al., 2019). Veränderungen der N-Glykane tragen zu einem besseren Verständnis der Tumormikroumgebung bei und könnten als Ansatzpunkt für neue Screeningmethoden und Therapiestrategien dienen.

5. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom vom high-grade serösen Typ ist eine aggressive gynäkologische Krebserkrankung mit einer schlechten Prognose. Aufgrund unspezifischer Symptome und des Mangels an effektiven Früherkennungsmaßnahmen erfolgt die Diagnose meist erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien.

In dieser Dissertation wurden die Daten von 176 Patientinnen mit einem high-grade serösen Ovarialkarzinom, die im Zeitraum zwischen 2010 und 2020 in der gynäkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Bonn eine operative Zytoreduktion erhielten, retrospektiv erhoben. Konservierte Präparate des intraoperativ gewonnenen Tumorgewebes wurden immunhistochemisch mit dem Paucimannose-spezifischen Antikörper Mannitou gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

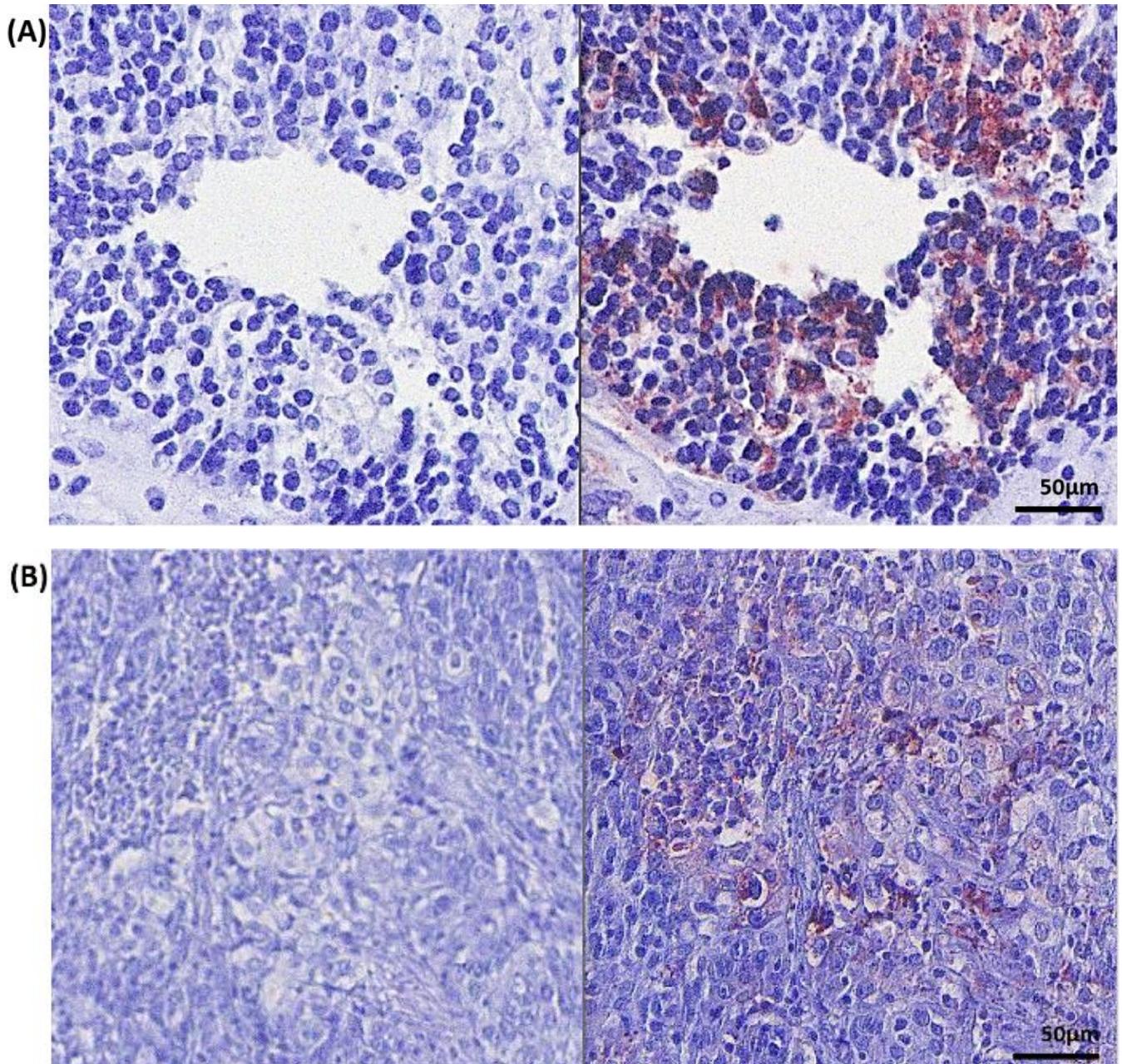
Das Ziel der Arbeit bestand darin, den Nachweis von Paucimannose beim Ovarialkarzinom zu erforschen. Hierfür wurde eine Korrelation zwischen der immunhistochemischen Paucimannoseexpression und dem Gesamtüberleben sowie dem krankheitsfreien Überleben untersucht. Außerdem wurden Zusammenhänge zwischen klinischen beziehungsweise intraoperativen Parametern und der Paucimannoseexpression geprüft.

Die mit Mannitou gefärbten Ovarialkarzinompräparate zeigten zu 85,8 % ein positives Signal für Paucimannose. Verschiedene immunhistochemische Auswertungskriterien wurden mithilfe des Log-Rank-Tests hinsichtlich des 5-Jahres-Gesamtüberlebens und des krankheitsfreien 5-Jahres-Überlebens ausgewertet. Eine Tumorzellfärbung von über 50 % in 400-facher Vergrößerung (Hot Spot) war, verglichen mit einer Tumorzellfärbung bis 50 %, signifikant mit einer niedrigeren 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate und folglich mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

Neben den Tumorzellen wiesen auch Immunzellen und insbesondere Makrophagen eine Paucimannosefärbung auf. Makrophagen sind wesentliche Vertreter unter den Immunzellen, die das Tumorgebiet infiltrieren. Die Färbung von Immunzellen im Tumorgebiet war signifikant mit dem 5-Jahres-Gesamtüberleben sowie dem krankheitsfreien 5-Jahres-Überleben und daher mit einer günstigeren Prognose assoziiert.

Die vorliegende Arbeit belegt, dass Paucimannose Teil des Glykosylierungsprofils von Ovarialkarzinomzellen und Makrophagen ist. Zudem liefert sie Hinweise auf unterschiedliche Funktionen paucimannosidischer Glykane in diesen zwei Zellentitäten. Die Ergebnisse zur Paucimannoseexpression in Ovarialkarzinomzellen legen nahe, dass das kurzkettige N-Glykan an der Regulation von tumorassoziierten Prozessen beteiligt ist. Über die genaue Funktion von paucimannosidischen Epitopen herrscht jedoch noch viel Unklarheit. Es bedarf weiterer Forschung, um das Zusammenwirken von Immunsystem und Tumorgeschehen sowie die funktionelle Rolle von Paucimannose in dieser Interaktion zu untersuchen. N-Glykane wie Paucimannose könnten in Zukunft möglicherweise als prognostische oder prädiktive Parameter eingesetzt werden und die Früherkennung des Ovarialkarzinoms erleichtern.

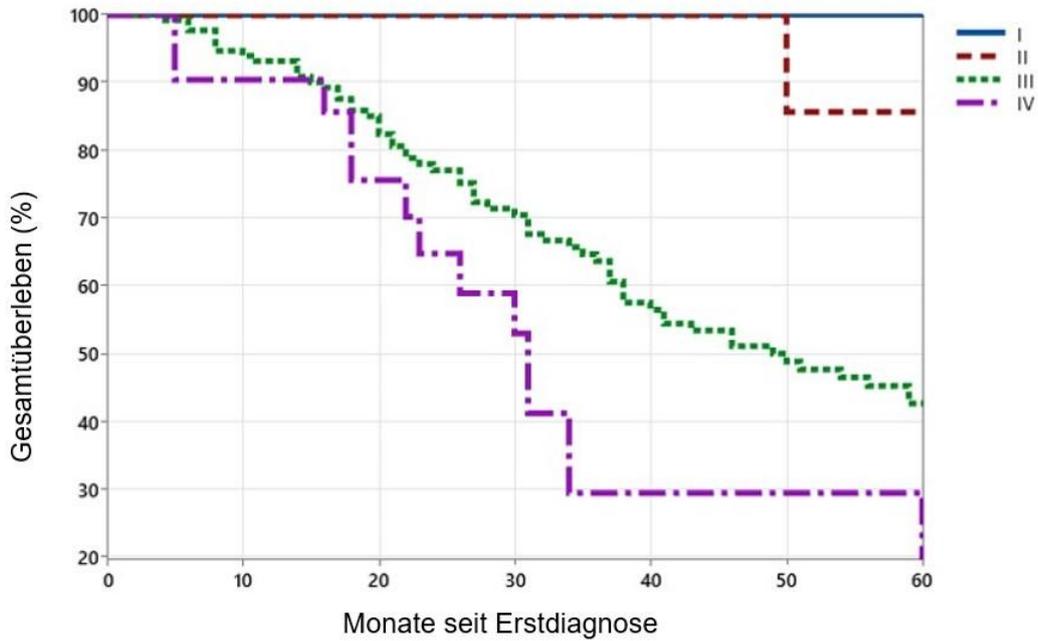
6. Anhang



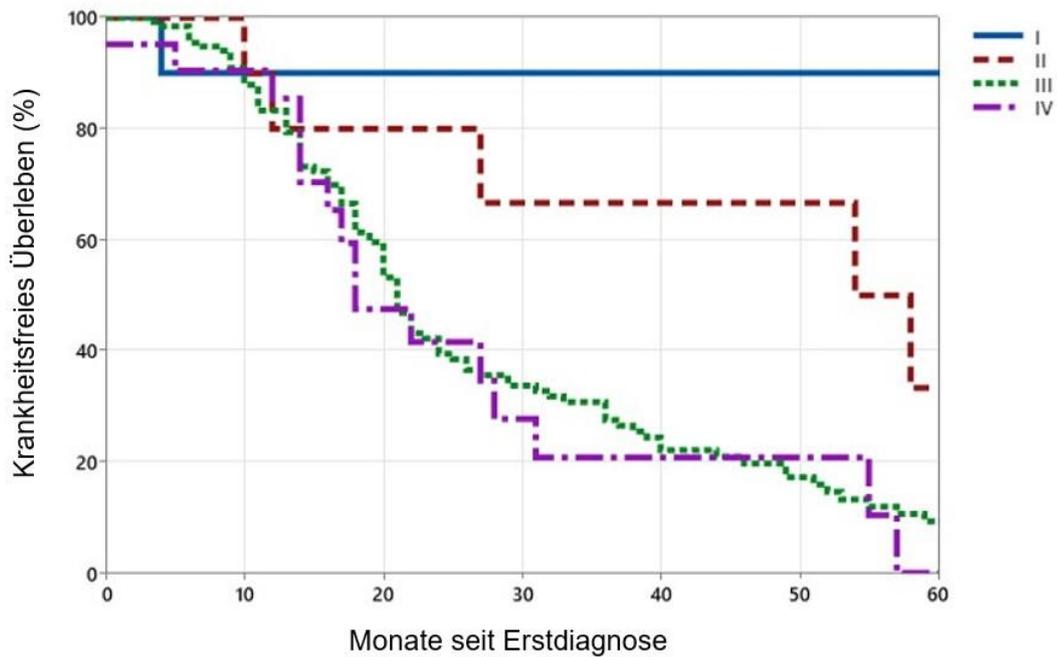
Anhang 1: Scans der Paucimannosefärbungen mit der Software PathoZoom ®

Präparatfärbungen mit ImmPact NovaRED (rechts) und Ausschnitte der jeweiligen Negativkontrollen (links) wurden eingescannt und gegenübergestellt.

1.) Gesamtüberleben nach FIGO-Stadium



2.) Krankheitsfreies Überleben nach FIGO-Stadium



Anhang 2: 5-Jahres-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier

Kaplan-Meier-Analysen für das 5-Jahres-Gesamtüberleben (1) und das krankheitsfreie 5-Jahres-Überleben (2) nach den FIGO-Stadien I bis IV.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Subtypen der N-Glykane	24
Abbildung 2: Eingrenzung der Kohorte im Verlauf des Projekts.....	29
Abbildung 3: Die ABC-Technik als Basis der immunhistochemischen Färbung.....	35
Abbildung 4: Farbintensitäten 0 bis 3 zur Berechnung des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und des modifizierten H-Scores.	38
Abbildung 5: Mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation des Färbeprozesses	43
Abbildung 6: Granuläre Färbung der Tumorzellen mit dem Paucimannose-spezifischen Antikörper Mannitou.....	44
Abbildung 7: Andere Zelltypen mit Paucimannose-Signal nach immunhistochemischer Färbung.....	45
Abbildung 8: Doppelfärbung mit CD68-spezifischem Antikörper zur Identifizierung von Makrophagen.....	46
Abbildung 9: Allgemeine Paucimannosefärbung in den Präparaten enthaltenen Tumorzellen	48
Abbildung 10: Anwendung des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner	49
Abbildung 11: Immunzellen mit Paucimannose-Signal	50
Abbildung 12: Verteilung der Risikoklassifikation der American Society of Anesthesiologists (ASA) und des BMI in der Patientinnenkohorte.....	52
Abbildung 13: Ausprägung des intraabdominellen Tumorgeschehens	54
Abbildung 14: Verteilung der verschiedenen intraoperativ geschaffenen Darmanastomosen.....	55
Abbildung 15: Postoperative Tumorlast	56
Abbildung 16: Lokalisationen der postoperativ verbliebenen Tumorresiduen	57
Abbildung 17: Verteilung der FIGO-Stadien I bis IV	59
Abbildung 18: Tumorausbreitung in die Lymphknoten	60
Abbildung 19: 5-Jahres-Gesamtüberleben (5YOS) nach FIGO-Stadium.....	62
Abbildung 20: Krankheitsfreies 5-Jahres-Überleben (5YDFS) nach FIGO-Stadium	63

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM und FIGO Klassifikation der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms entsprechend des Leitlinienprogramms Onkologie 2022.....	9
Tabelle 2:	Erhobene Informationen anhand der digitalen Patientinnenakten.....	30
Tabelle 3:	Auflistung der verwendeten Chemikalien, Zellen, Materialien und Geräte.....	32
Tabelle 4:	Auswertungskriterien der immunhistochemischen Färbungen.....	37
Tabelle 5:	Angewandte immunhistochemische Scores zur Evaluation der Paucimannosefärbung der Tumorzellen (TZ).....	40
Tabelle 6:	Verteilung der immunhistochemischen Auswertungskriterien nach Unterkategorie	47
Tabelle 7:	Erhobene Parameter zur Einschätzung des Gesundheitszustand.....	51
Tabelle 8:	Im Kontext der zytoreduktiven Operation erhobene Parameter in absoluten Zahlen und Prozentangaben.....	53
Tabelle 9:	Lagemaße mit Standardabweichung (SD) und Spannweite des intraoperativ erhobenen Peritonealkarzinoseindex (PCI).....	54
Tabelle 10:	Informationen zur Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms	58
Tabelle 11:	Medikamentöse Behandlung bei den in die Studie eingeschlossenen Patientinnen.....	61
Tabelle 12:	5-Jahres-Gesamtüberleben (5YOS) und krankheitsfreies 5-Jahres-Überleben (5YDFS) entsprechend Krankheitsstadium nach Kaplan-Meier-Methode.	61
Tabelle 13:	Outcome nach immunhistochemischem Auswertungskriterium	65
Tabelle 14:	Korrelationsanalyse mit dem Spearman-Test	67

9. Literaturverzeichnis

Abbott KL, Nairn AV, Hall EM, Horton MB, McDonald JF, Moremen KW, Dinulescu DM, Pierce M. Focused glycomic analysis of the N-linked glycan biosynthetic pathway in ovarian cancer. *Proteomics* 2008; 8: 3210-3220

AGO Study Group, 2023: Trial on Radical Upfront Surgery in Advanced Ovarian Cancer. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02828618> (Zugriffsdatum: 15.04.2024)

Allam H, Aoki K, Benigno BB, McDonald JF, Mackintosh SG, Tiemeyer M, Abbott KL. Glycomic analysis of membrane glycoproteins with bisecting glycosylation from ovarian cancer tissues reveals novel structures and functions. *J Proteome Res* 2015; 14: 434-446

American Society of Anesthesiologists, 2020 ASA Physical Status Classification System. <https://www.asahq.org/standards-and-practice-parameters/statement-on-asa-physical-status-classification-system> (Zugriffsdatum: 15.04.2024)

Anugraham M, Jacob F, Everest-Dass AV, Schoetzau A, Nixdorf S, Hacker NF, Fink D, Heinzelmann-Schwarz V, Packer NH. Tissue glycomics distinguish tumour sites in women with advanced serous adenocarcinoma. *Mol Oncol* 2017; 11: 1595-1615

Bankhead CR, Kehoe ST, Austoker J. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG* 2005; 112: 857-865

Becker Y, Förster S, Gielen GH, Loke I, Thaysen-Andersen M, Laurini C, Wehrand K, Pietsch T, Diestel S. Paucimannosidic glycoepitopes inhibit tumorigenic processes in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* 2019; 10: 4449-4465

Berek JS, Renz M, Kehoe S, Kumar L, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *Int J Gynaecol Obstet* 2021; 155: 61-85

du Bois A, Ewald-Riegler N, de Gregorio N, Reuss A, Mahner S, Fotopoulou C, Kommos F, Schmalfeldt B, Hilpert F, Fehm T, Burges A, Meier W, Hillemanns P, Hanker L, Hasenburg A, Strauss H-G, Hellriegel M, Wimberger P, Keyver-Paik M-D, Baumann K, Canzler U, Wollschlaeger K, Forner D, Pfisterer J, Schröder W, Münstedt K, Richter B, Kommos

S, Hauptmann S, Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) Study Group. Borderline tumours of the ovary: A cohort study of the Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) Study Group. *Eur J Cancer* 2013; 49: 1905-1914

du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. *Cancer* 2009; 115: 1234-1244

Briggs MT, Condina MR, Klingler-Hoffmann M, Arentz G, Everest-Dass AV, Kaur G, Oehler MK, Packer NH, Hoffmann P. Translating N-Glycan Analytical Applications into Clinical Strategies for Ovarian Cancer. *Proteomics Clin Appl* 2019; 13: e1800099

Budwit-Novotny DA, McCarty KS, Cox EB, Soper JT, Mutch DG, Creasman WT, Flowers JL, McCarty KS. Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. *Cancer Res* 1986; 46: 5419-5425

Bujan Rivera J, Klug SJ. Gebärmutterhalskrebsscreening in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2018; 61: 1528-1535

Chang S-J, Hodeib M, Chang J, Bristow RE. Survival impact of complete cytoreduction to no gross residual disease for advanced-stage ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2013; 130: 493-498

Chatterjee S, Lee LY, Kawahara R, Abrahams JL, Adamczyk B, Anugraham M, Ashwood C, Sumer-Bayraktar Z, Briggs MT, Chik JHL, Everest-Dass A, Förster S, Hinneburg H, Leite KRM, Loke I, Möginger U, Moh ESX, Nakano M, Recuero S, Sethi MK, Srougi M, Stavenhagen K, Venkatakrishnan V, Wongtrakul-Kish K, Diestel S, Hoffmann P, Karlsson NG, Kolarich D, Molloy MP, Muders MH, Oehler MK, Packer NH, Palmisano G, Thaysen-Andersen M. Protein Paucimannosylation Is an Enriched N-Glycosylation Signature of Human Cancers. *Proteomics* 2019; 19: e1900010

Chen K, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Steentoft C, Marcos-Silva L, Mandel U, Jacobs I, Dawnay A, Menon U, Blixt O. Microarray Glycoprofiling of CA125 Improves Differential Diagnosis of Ovarian Cancer. *J Proteome Res* 2013; 12: 1408-1418

Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 2017; 97: 4-13

Choi K-C, Kang SK, Tai C-J, Auersperg N, Leung PCK. Follicle-Stimulating Hormone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Preneoplastic and Neoplastic Ovarian Surface Epithelial Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2245-2253

Cibula D, Widschwendter M, Zikan M, Dusek L. Underlying mechanisms of ovarian cancer risk reduction after tubal ligation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011; 90: 559-563

Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, Douville C, Javed AA, Wong F, Mattox A, Hruban RalphH, Wolfgang CL, Goggins MG, Molin MD, Wang T-L, Roden R, Klein AP, Ptak J, Dobbyn L, Schaefer J, Silliman N, Popoli M, Vogelstein JT, Browne JD, Schoen RE, Brand RE, Tie J, Gibbs P, Wong H-L, Mansfield AS, Jen J, Hanash SM, Falconi M, Allen PJ, Zhou S, Bettgowda C, Diaz LA, Tomasetti C, Kinzler KW, Vogelstein B, Lennon AM, Papadopoulos N. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018; 359: 926-930

Cottreau CM, Ness RB, Kriska AM. Physical activity and reduced risk of ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 609-614

Dahmen A-C, Fergen M-T, Laurini C, Schmitz B, Loke I, Thaysen-Andersen M, Diestel S. Paucimannosidic glycoepitopes are functionally involved in proliferation of neural progenitor cells in the subventricular zone. *Glycobiology* 2015; 25: 869-880

Delannoy CP, Rombouts Y, Groux-Degroote S, Holst S, Coddeville B, Harduin-Lepers A, Wuhrer M, Ellass-Rochard E, Guérardel Y. Glycosylation Changes Triggered by the Differentiation of Monocytic THP-1 Cell Line into Macrophages. *J Proteome Res* 2017; 16: 156-169

De Palma M, Lewis CE. Macrophage Regulation of Tumor Responses to Anticancer Therapies. *Cancer Cell* 2013; 23: 277-286

Egger E, Merker F, Ralser DJ, Condic M, Marinova M, Muders M, Stope M, Mustea A. Tumor Load Matters – the Peritoneal Cancer Index in Patients With High-grade Serous Ovarian Cancer. *Anticancer Res* 2022; 42: 4825-4831

Elzarkaa AA, Shaalan W, Elemam D, Mansour H, Melis M, Malik E, Soliman AA. Peritoneal cancer index as a predictor of survival in advanced stage serous epithelial ovarian cancer: a prospective study. *J Gynecol Oncol* 2018; 29: e47

Erickson BK, Kinde I, Dobbin ZC, Wang Y, Martin JY, Alvarez RD, Conner MG, Huh WK, Roden RBS, Kinzler KW, Papadopoulos N, Vogelstein B, Diaz LA, Landen CN. Detection of somatic TP53 mutations in tampons of patients with high-grade serous ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2014; 124: 881-885

Everest-Dass AV, Jin D, Thaysen-Andersen M, Nevalainen H, Kolarich D, Packer NH. Comparative structural analysis of the glycosylation of salivary and buccal cell proteins: innate protection against infection by *Candida albicans*. *Glycobiology* 2012; 22: 1465-1479

Fagotti A, Fanfani F, Vizzielli G, Gallotta V, Ercoli A, Paglia A, Costantini B, Vigliotta M, Scambia G, Ferrandina G. Should laparoscopy be included in the work-up of advanced ovarian cancer patients attempting interval debulking surgery? *Gynecologic Oncology* 2010; 116: 72-77

Fagotti A, Vizzielli G, Fanfani F, Costantini B, Ferrandina G, Gallotta V, Alletti SG, Tortorella L, Scambia G. Introduction of staging laparoscopy in the management of advanced epithelial ovarian, tubal and peritoneal cancer: Impact on prognosis in a single institution experience. *Gynecol Oncol* 2013; 131: 341-346

Falconer H, Yin L, Grönberg H, Altman D. Ovarian Cancer Risk After Salpingectomy: A Nationwide Population-Based Study. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107: dju410

Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2: 163

Finch A, Beiner M, Lubinski J, Lynch HT, Moller P, Rosen B, Murphy J, Ghadirian P, Friedman E, Foulkes WD, Kim-Sing C, Wagner T, Tung N, Couch F, Stoppa-Lyonnet D, Ainsworth P, Daly M, Pasini B, Gershoni-Baruch R, Eng C, Olopade OI, McLennan J, Karlan B, Weitzel J, Sun P, Narod SA, Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group for the Salpingo-oophorectomy and the Risk of Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Cancers in Women With a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *JAMA* 2006; 296: 185-192

Förster S, Chong YE, Siefker D, Becker Y, Bao R, Escobedo E, Qing Y, Rauch K, Burman L, Burkart C, Kainz P, Cubitt A, Muders M, Nangle LA. Development and Characterization of a Novel Neuropilin-2 Antibody for Immunohistochemical Staining of Cancer and Sarcoidosis Tissue Samples. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2023; 42: 157-165

Fotopoulou C, Sehouli J, Mahner S, Harter P, Nieuwenhuysen EV, Gonzalez-Martin A, Vergote I, Chiva L, Bois AD. HIPEC: HOPE or HYPE in the fight against advanced ovarian cancer? *Ann Oncol* 2018; 29: 1610-1613

Gagneux P, Henet T, Varki A. 7. Biological Functions of Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Mohnen D, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, Hrsg. *Essentials of Glycobiology*, 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022

Gaona-Luviano P, Medina-Gaona LA, Magaña-Pérez K. Epidemiology of ovarian cancer. *Chin Clin Oncol* 2020; 9: 47

Gu P, Pan L-L, Wu S-Q, Sun L, Huang G. CA 125, PET alone, PET-CT, CT and MRI in diagnosing recurrent ovarian carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Radiol* 2009; 71: 164-174

Gupta V, Bernardini MQ. Algorithms Used in Ovarian Cancer Detection: A Minireview on Current and Future Applications. *J Appl Lab Med* 2018; 3: 290-299

Hare NJ, Lee LY, Loke I, Britton WJ, Saunders BM, Thaysen-Andersen M. Mycobacterium tuberculosis Infection Manipulates the Glycosylation Machinery and the N-Glycoproteome of Human Macrophages and Their Microparticles. *J Proteome Res* 2017; 16: 247-263

Harter P, Gnauert K, Hils R, Lehmann TG, Fisseler-Eckhoff A, Traut A, du Bois A. Pattern and clinical predictors of lymph node metastases in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 1238-1244

Harter P, Sehouli J, Lorusso D, Reuss A, Vergote I, Marth C, Kim J-W, Raspagliesi F, Lampe B, Aletti G, Meier W, Cibula D, Mustea A, Mahner S, Runnebaum IB, Schmalfeldt B, Burges A, Kimmig R, Scambia G, Greggi S, Hilpert F, Hasenburg A, Hillemanns P, Giorda G, von Leffern I, Schade-Brittinger C, Wagner U, du Bois A. A Randomized Trial of Lymphadenectomy in Patients with Advanced Ovarian Neoplasms. *N Engl J Med* 2019; 380: 822-832

Harter P, Sehouli J, Vergote I, Ferron G, Reuss A, Meier W, Greggi S, Mosgaard BJ, Selle F, Guyon F, Pomel C, Lécuru F, Zang R, Avall-Lundqvist E, Kim J-W, Ponce J, Raspagliesi F, Kristensen G, Classe J-M, Hillemanns P, Jensen P, Hasenburg A, Ghaem-Maghami S, Mirza MR, Lund B, Reinthaller A, Santaballa A, Olaitan A, Hilpert F, du Bois A, DESKTOP III Investigators. Randomized Trial of Cytoreductive Surgery for Relapsed Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2021; 385: 2123-2131

Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Nakajima Y, Kawanishi T, Yamaguchi T. Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: relative quantification of N-glycans using an isotope-tagging method. *Immunology* 2009; 126: 336-345

Häuselmann I, Borsig L. Altered Tumor-Cell Glycosylation Promotes Metastasis. *Front Oncol* 2014; 4: 28

Heitz F, Harter P, Alesina PF, Walz MK, Lorenz D, Groeben H, Heikaus S, Fisseler-Eckhoff A, Schneider S, Ataseven B, Kurzeder C, Prader S, Beutel B, Traut A, du Bois A. Pattern of and reason for postoperative residual disease in patients with advanced ovarian cancer following upfront radical debulking surgery. *Gynecol Oncol* 2016; 141: 264-270

Hirata T, Kizuka Y. N-Glycosylation. *Adv Exp Med Biol* 2021; 1325: 3–24

Horowitz NS, Miller A, Rungruang B, Richard SD, Rodriguez N, Bookman MA, Hamilton CA, Krivak TC, Maxwell GL. Does Aggressive Surgery Improve Outcomes? *Interaction*

Between Preoperative Disease Burden and Complex Surgery in Patients With Advanced-Stage Ovarian Cancer: An Analysis of GOG 182. *J Clin Oncol* 2015; 33: 937-943

Huang J, Chan WC, Ngai CH, Lok V, Zhang L, Lucero-Prisno DE, Xu W, Zheng Z-J, Elcarte E, Withers M, Wong MCS, on behalf of NCD Global Health Research Group of Association of Pacific Rim Universities (APRU). Worldwide Burden, Risk Factors, and Temporal Trends of Ovarian Cancer: A Global Study. *Cancers* 2022; 14: 2230

Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Kalsi JK, Amso NN, Apostolidou S, Benjamin E, Cruickshank D, Crump DN, Davies SK, Dawnay A, Dobbs S, Fletcher G, Ford J, Godfrey K, Gunu R, Habib M, Hallett R, Herod J, Jenkins H, Karpinskyj C, Leeson S, Lewis SJ, Liston WR, Lopes A, Mould T, Murdoch J, Oram D, Rabideau DJ, Reynolds K, Scott I, Seif MW, Sharma A, Singh N, Taylor J, Warburton F, Widschwendter M, Williamson K, Woolas R, Fallowfield L, McGuire AJ, Campbell S, Parmar M, Skates SJ. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387: 945-956

Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res* 1996; 82: 359-374

Jang MH, Kim HJ, Chung YR, Lee Y, Park SY. A comparison of Ki-67 counting methods in luminal Breast Cancer: The Average Method vs. the Hot Spot Method. *PLoS One* 2017; 12: e0172031

Jónsdóttir B, Lomnytska M, Poromaa IS, Silins I, Ståhlberg K. The Peritoneal Cancer Index is a Strong Predictor of Incomplete Cytoreductive Surgery in Ovarian Cancer. *Ann Surg Oncol* 2021; 28: 244-251

Juliant S, Harduin-Lepers A, Monjaret F, Catieau B, Violet M-L, Cérutti P, Ozil A, Duonor-Cérutti M. The α 1,6-Fucosyltransferase Gene (fut8) from the Sf9 Lepidopteran Insect Cell Line: Insights into fut8 Evolution. *PLoS One* 2014; 9: e110422

Kaprio T, Satomaa T, Heiskanen A, Hokke CH, Deelder AM, Mustonen H, Hagström J, Carpen O, Saarinen J, Haglund C. N-glycomic Profiling as a Tool to Separate Rectal Adenomas from Carcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14: 277-288

Kawamura K, Komohara Y, Takaishi K, Katabuchi H, Takeya M. Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathol Int* 2009; 59: 300-305

Kehoe S, Hook J, Nankivell M, Jayson GC, Kitchener H, Lopes T, Luesley D, Perren T, Bannoo S, Mascarenhas M, Dobbs S, Essapen S, Twigg J, Herod J, McCluggage G, Parmar M, Swart A-M. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet* 2015; 386: 249-257

Kizuka Y, Taniguchi N. Enzymes for N-Glycan Branching and Their Genetic and Nongenetic Regulation in Cancer. *Biomolecules* 2016; 6: 25

Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, Leung S, Bowen NJ, Ionescu DN, Rajput A, Prentice LM, Miller D, Santos J, Swenerton K, Gilks CB, Huntsman D. Ovarian Carcinoma Subtypes Are Different Diseases: Implications for Biomarker Studies. *PLoS Med* 2008; 5: e232

Kroeger PT, Drapkin R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017; 29: 26-34

Kurman RJ, Shih I-M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol* 2016; 186: 733-747

Lahmann PH, Cust AE, Friedenreich CM, Schulz M, Lukanova A, Kaaks R, Lundin E, Tjønneland A, Halkjær J, Severinsen MT, Overvad K, Fournier A, Chabbert-Buffet N, Clavel-Chapelon F, Dossus L, Pischon T, Boeing H, Trichopoulou A, Lagiou P, Naska A, Palli D, Grioni S, Mattiello A, Tumino R, Sacerdote C, Redondo M-L, Jakszyn P, Sánchez M-J, Tormo M-J, Ardanaz E, Arriola L, Manjer J, Jirström K, Bueno-de-Mesquita HB, May AM, Peeters PHM, Onland-Moret NC, Bingham S, Khaw K-T, Allen NE, Spencer E, Rinaldi S, Slimani N, Chajes V, Michaud D, Norat T, Riboli E. Anthropometric measures and epithelial ovarian cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2010; 126: 2404-2415

Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott C, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Macpherson E, Watkins C, Carmichael J, Matulonis U. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 1382-1392

Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nucci M, Medeiros F, Saleemuddin A, Garber J, Birch C, Mou H, Gordon R, Cramer D, McKeon F, Crum C. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol* 2007; 211: 26-35

Leitlinienprogramm Onkologie. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2022: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 5.1. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/> (Zugriffsdatum: 15.04.2024)

Lisio M-A, Fu L, Goyeneche A, Gao Z, Telleria C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 952

Liu Z, Zhang T-T, Zhao J-J, Qi S-F, Du P, Liu D-W, Tian Q-B. The association between overweight, obesity and ovarian cancer: a meta-analysis. *Jpn J Clin Oncol* 2015; 45: 1107-1115

Loke I, Kolarich D, Packer NH, Thaysen-Andersen M. Emerging roles of protein mannosylation in inflammation and infection. *Mol Aspects Med* 2016; 51: 31-55

Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, Bewtra C, Lynch JF, Butts M, Godwin AK. Hereditary ovarian carcinoma: Heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol* 2009; 3: 97-137

McCluggage WG, Judge MJ, Clarke BA, Davidson B, Gilks CB, Hollema H, Ledermann JA, Matias-Guiu X, Mikami Y, Stewart CJ, Vang R, Hirschowitz L. Data set for reporting of ovary, fallopian tube and primary peritoneal carcinoma: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Mod Pathol* 2015; 28: 1101-1122

Medeiros F, Muto MG, Lee Y, Elvin JA, Callahan MJ, Feltmate C, Garber JE, Cramer DW, Crum CP. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 230-236

Medeiros LRF, Rosa DD, Bozzetti MC, Rosa MI, Edelweiss MI, Stein AT, Zelmanowicz A, Ethur AB, Zanini RR. Laparoscopy versus laparotomy for FIGO Stage I ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 4: CD005344

Meezan E, Wu HC, Black PH, Robbins PW. Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. II. Separation of glycoproteins and glycopeptides by sephadex chromatography. *Biochemistry* 1969; 8: 2518-2524

Meinhold-Heerlein I. Borderline-Tumoren des Ovars. *Gynäkologe* 2014; 47: 951-960

Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P, Hauptmann S, Sehouli J. Statement by the Kommission Ovar of the AGO: The New FIGO and WHO Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2015; 75: 1021-1027

Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health* 2019; 11: 287-299

Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, Steinhoff M, Messerlian G, DiSilvestro P, Granai CO, Bast RC. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2008; 108: 402-408

Morice P, Joulie F, Camatte S, Atallah D, Rouzier R, Pautier P, Pomel C, Lhommé C, Duvillard P, Castaigne D. Lymph node involvement in epithelial ovarian cancer: analysis of 276 pelvic and paraaortic lymphadenectomies and surgical implications. *J Am Coll Surg* 2003; 197: 198-205

Mueller JJ, Zhou QC, Iasonos A, O'Cearbhaill RE, Alvi FA, El Haraki A, Eriksson AGZ, Gardner GJ, Sonoda Y, Levine DA, Aghajanian C, Chi DS, Abu-Rustum NR, Zivanovic O.

Neoadjuvant chemotherapy and primary debulking surgery utilization for advanced-stage ovarian cancer at a comprehensive cancer center. *Gynecol Oncol* 2016; 140: 436-442

Nagle CM, Dixon SC, Jensen A, Kjaer SK, Modugno F, deFazio A, Fereday S, Hung J, Johnatty SE, Fasching PA, Beckmann MW, Lambrechts D, Vergote I, Van Nieuwenhuysen E, Lambrechts S, Risch HA, Rossing MA, Doherty JA, Wicklund KG, Chang-Claude J, Goodman MT, Ness RB, Moysich K, Heitz F, du Bois A, Harter P, Schwaab I, Matsuo K, Hosono S, Goode EL, Vierkant RA, Larson MC, Fridley BL, Høgdall C, Schildkraut JM, Weber RP, Cramer DW, Terry KL, Bandera EV, Paddock L, Rodriguez-Rodriguez L, Wentzensen N, Yang HP, Brinton LA, Lissowska J, Høgdall E, Lundvall L, Whitemore A, McGuire V, Sieh W, Rothstein J, Sutphen R, Anton-Culver H, Ziogas A, Pearce CL, Wu AH, Webb PM. Obesity and survival among women with ovarian cancer: results from the Ovarian Cancer Association Consortium. *Br J Cancer* 2015; 113: 817-826

Nakamura K, Banno K, Yanokura M, Iida M, Adachi M, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, Nomura H, Hirasawa A, Tominaga E, Aoki D. Features of ovarian cancer in Lynch syndrome (Review). *Mol Clin Oncol* 2014; 2: 909-916

Nam EJ, Yun MJ, Oh YT, Kim JW, Kim JH, Kim S, Jung YW, Kim SW, Kim YT. Diagnosis and staging of primary ovarian cancer: Correlation between PET/CT, Doppler US, and CT or MRI. *Gynecol Oncol* 2010; 116: 389-394

Nash Z, Menon U. Ovarian cancer screening: Current status and future directions. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2020; 65: 32-45

Naumann RW, Brown J. Ovarian cancer screening with the Risk of Ovarian Cancer Algorithm (ROCA): Good, bad, or just expensive? *Gynecol Oncol* 2018; 149: 117-120

Parmar MKB, Ledermann JA, Colombo N, du Bois A, Delaloye J-F, Kristensen GB, Wheeler S, Swart AM, Qian W, Torri V, Floriani I, Jayson G, Lamont A, Tropé C, ICON and AGO Collaborators. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet* 2003; 361: 2099-2106

Pavone ME, Lyttle BM. Endometriosis and ovarian cancer: links, risks, and challenges faced. *Int J Womens Health* 2015; 7: 663-672

Peiretti M, Bristow RE, Zapardiel I, Gerardi M, Zanagnolo V, Biffi R, Landoni F, Bocciolone L, Aletti GD, Maggioni A. Rectosigmoid resection at the time of primary cytoreduction for advanced ovarian cancer. A multi-center analysis of surgical and oncological outcomes. *Gynecol Oncol* 2012; 126: 220-223

Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Kurzeder C, du Bois A, Sehouli J, Kimmig R, Stähle A, Collinson F, Essapen S, Gourley C, Lortholary A, Selle F, Mirza MR, Lemin A, Plante M, Stark D, Qian W, Parmar MKB, Oza AM, ICON7 Investigators. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2011; 365: 2484-2496

Pignata S, Cecere S, Du Bois A, Harter P, Heitz F. Treatment of recurrent ovarian cancer. *Ann Oncol* 2017; 28: viii51-viii6

Prat J. New insights into ovarian cancer pathology. *Ann Oncol* 2012; 23: x111x7

Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A, Poveda A, Kristensen G, Sorio R, Vergote I, Witteveen P, Bamias A, Pereira D, Wimberger P, Oaknin A, Mirza MR, Follana P, Bollag D, Ray-Coquard I. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2014; 32: 1302-1308

Rasmussen CB, Jensen A, Albieri V, Andersen KK, Kjaer SK. Is Pelvic Inflammatory Disease a Risk Factor for Ovarian Cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017; 26: 104-109

Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 1987; 8: 138-140

van Remoortere A, Bank CMC, Nyame AK, Cummings RD, Deelder AM, van Die I. *Schistosoma mansoni*-infected mice produce antibodies that cross-react with plant, insect, and

mammalian glycoproteins and recognize the truncated biantennaryN-glycan Man3GlcNAc2-R. *Glycobiology* 2003; 13: 217-225

Risch HA. Hormonal Etiology of Epithelial Ovarian Cancer, With a Hypothesis Concerning the Role of Androgens and Progesterone. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1774-1786

Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2023: Krebs in Deutschland 2019/2020. <https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Eierstockkrebs/eierstockkrebs.html> (Zugriffsdatum:15.04.2024)

Rosenthal AN, Fraser LSM, Philpott S, Manchanda R, Burnell M, Badman P, Hadwin R, Rizzuto I, Benjamin E, Singh N, Evans DG, Eccles DM, Ryan A, Liston R, Dawnay A, Ford J, Gunu R, Mackay J, Skates SJ, Menon U, Jacobs IJ. Evidence of Stage Shift in Women Diagnosed With Ovarian Cancer During Phase II of the United Kingdom Familial Ovarian Cancer Screening Study. *J Clin Oncol* 2017; 35: 1411-1420

Rustin GJ, van der Burg ME, Griffin CL, Guthrie D, Lamont A, Jayson GC, Kristensen G, Mediola C, Coens C, Qian W, Parmar MK, Swart AM. Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial. *Lancet* 2010; 376: 1155-1163

Saad AF, Hu W, Sood AK. Microenvironment and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. *Horm Cancer* 2010; 1: 277-290

Salani R, Khanna N, Frimer M, Bristow RE, Chen L. An update on post-treatment surveillance and diagnosis of recurrence in women with gynecologic malignancies: Society of Gynecologic Oncology (SGO) recommendations. *Gynecol Oncol* 2017; 146: 3-10

Saldova R, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM. Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis. *Dis Markers* 2008; 25: 219-232

Samuel D, Diaz-Barbe A, Pinto A, Schlumbrecht M, George S. Hereditary Ovarian Carcinoma: Cancer Pathogenesis Looking beyond BRCA1 and BRCA2. *Cells* 2022; 11: 539

Schachter H. Paucimannose N-glycans in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Carbohydr Res* 2009; 344: 1391-1396

Schildkraut JM, Schwingl PJ, Bastos E, Evanoff A, Hughes C. Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 1996; 88: 554-559

Sehouli J, Stengel D, Oskay-Oezcelik G, Zeimet AG, Sommer H, Klare P, Stauch M, Paulenz A, Camara O, Keil E, Lichtenegger W. Nonplatinum topotecan combinations versus topotecan alone for recurrent ovarian cancer: results of a phase III study of the North-Eastern German Society of Gynecological Oncology Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3176-3182

Singh N. WHO Classification of Tumors of the Ovary. In: van Krieken JHJM, Hrsg. *Encyclopedia of Pathology*. Cham: Springer International Publishing, 2022, 1-4

Specht E, Kaemmerer D, Sanger J, Wirtz RM, Schulz S, Lupp A. Comparison of immunoreactive score, HER2/neu score and H score for the immunohistochemical evaluation of somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Histopathology* 2015; 67: 368-377

Stanley P, Moremen KW, Lewis NE, Taniguchi N, Aebi M. 9. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Mohnen D, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, Hrsg. *Essentials of Glycobiology*, 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022

Stavenhagen K, Laan LC, Gao C, Mehta AY, Heimburg-Molinaro J, Glickman JN, van Die I, Cummings RD. Tumor cells express pauci- and oligomannosidic N-glycans in glycoproteins recognized by the mannose receptor (CD206). *Cell Mol Life Sci* 2021; 78: 5569-5585

Takakura D, Tada M, Kawasaki N. Membrane glycoproteomics of fetal lung fibroblasts using LC/MS. *Proteomics* 2016; 16: 47-59

Tan BH, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa MT, Krutzik SR, Bloom BR, Ganz T, Modlin RL, Stenger S. Macrophages Acquire Neutrophil Granules for Antimicrobial Activity against Intracellular Pathogens¹. *J Immunol* 2006; 177: 1864-1871

Tentes A-AK, Tripsiannis G, Markakidis SK, Karanikiotis CN, Tzegas G, Georgiadis G, Avgidou K. Peritoneal cancer index: a prognostic indicator of survival in advanced ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 69-73

Thaysen-Andersen M, Venkatakrishnan V, Loke I, Laurini C, Diestel S, Parker BL, Packer NH. Human Neutrophils Secrete Bioactive Paucimannosidic Proteins from Azurophilic Granules into Pathogen-Infected Sputum. *J Biol Chem* 2015; 290: 8789-8802

Thomas D, Rathinavel AK, Radhakrishnan P. Altered glycosylation in cancer: A promising target for biomarkers and therapeutics. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2021; 1875: 188464

Timmerman D, Planchamp F, Bourne T, Landolfo C, Bois A du, Chiva L, Cibula D, Concin N, Fischerova D, Froyman W, Madueño GG, Lemley B, Loft A, Mereu L, Morice P, Querleu D, Testa AC, Vergote I, Vandecaveye V, Scambia G, Fotopoulou C. ESGO/ISUOG/IOTA/ESGE Consensus Statement on pre-operative diagnosis of ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer* 2021; 31: 961-982

Tjondro HC, Loke I, Chatterjee S, Thaysen-Andersen M. Human protein paucimannosylation: cues from the eukaryotic kingdoms. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2019; 94: 2068-2100

Toss A, Tomasello C, Razzaboni E, Contu G, Grandi G, Cagnacci A, Schilder RJ, Cortesi L. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 341723

Trabert B, Ness RB, Lo-Ciganic W-H, Murphy MA, Goode EL, Poole EM, Brinton LA, Webb PM, Nagle CM, Jordan SJ, Risch HA, Rossing MA, Doherty JA, Goodman MT, Lurie G, Kjær SK, Hogdall E, Jensen A, Cramer DW, Terry KL, Vitonis A, Bandera EV, Olson S, King MG, Chandran U, Anton-Culver H, Ziogas A, Menon U, Gayther SA, Ramus SJ, Gentry-Maharaj A, Wu AH, Pearce CL, Pike MC, Berchuck A, Schildkraut JM, Wentzensen N. Aspirin, Nonaspirin Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug, and Acetaminophen Use and Risk of Invasive Epithelial Ovarian Cancer: A Pooled Analysis in the Ovarian Cancer Association Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: djt431

UICC. TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, Hrsg. New York: Wiley Blackwell, 2017

Varki A, Kornfeld S. 1. Historical Background and Overview. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Mohnen D, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, Hrsg. Essentials of Glycobiology, 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022

Vector Laboratories, 2024: VECTASTAIN® ABC Protocol. <https://vectorlabs.com/browse/abc-avidin-biotin-complex-kits> (Zugriffsdatum: 15.04.2024)

van der Velde NM, Mourits MJE, Arts HJG, de Vries J, Leegte BK, Dijkhuis G, Oosterwijk JC, de Bock GH. Time to stop ovarian cancer screening in BRCA1/2 mutation carriers? Int J Cancer 2009; 124: 919-923

Vergote I, Coens C, Nankivell M, Kristensen GB, Parmar MKB, Ehlen T, Jayson GC, Johnson N, Swart AM, Verheijen R, McCluggage WG, Perren T, Panici PB, Kenter G, Casado A, Mendiola C, Stuart G, Reed NS, Kehoe S, EORTC, MRC CHORUS study investigators. Neoadjuvant chemotherapy versus debulking surgery in advanced tubo-ovarian cancers: pooled analysis of individual patient data from the EORTC 55971 and CHORUS trials. Lancet Oncol 2018; 19: 1680-1687

Vergote I, Tropé CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, Verheijen RHM, van der Burg MEL, Lacave AJ, Panici PB, Kenter GG, Casado A, Mendiola C, Coens C, Verleye L, Stuart GCE, Pecorelli S, Reed NS. Neoadjuvant Chemotherapy or Primary Surgery in Stage IIIC or IV Ovarian Cancer. N Engl J Med 2010; 363: 943-953

Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2017; 41: 3-14

WHO Classification of Tumours Editorial Board. Female Genital Tumours. In: WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 4. Lyon: IARC Press, 2020

Ye S, Wang Y, Chen L, Wu X, Yang H, Xiang L. The surgical outcomes and perioperative complications of bowel resection as part of debulking surgery of advanced ovarian cancer patients. *BMC Surg* 2022; 22: 81

Young J, Badgery-Parker T, Dobbins T, Jorgensen M, Gibbs P, Faragher I, Jones I, Currow D. Comparison of ECOG/WHO performance status and ASA score as a measure of functional status. *J Pain Symptom Manage* 2015; 49: 258-264

Zanetta G, Chiari S, Rota S, Bratina G, Maneo A, Torri V, Mangioni C. Conservative surgery for stage I ovarian carcinoma in women of childbearing age. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 1030-1035

Zhang J, Li S, Liu F, Yang K. Role of CD68 in tumor immunity and prognosis prediction in pan-cancer. *Sci Rep* 2022; 12: 7844

Ziegler A, Lange S, Bender R. Survival analysis: Log rank test. *Dtsch med Wochenschr* 2004; 129: T4-T6

Zipser B, Bello-DeOcampo D, Diestel S, Tai M-H, Schmitz B. Mannitou Monoclonal Antibody Uniquely Recognizes Paucimannose, a Marker for Human Cancer, Stemness, and Inflammation. *J Carbohydr Chem* 2012; 31: 504-518

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich in den vergangenen Jahren bei der Anfertigung dieser Dissertation tatkräftig unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Michael Muders für das Überlassen dieses spannenden Promotionsthemas und das Beantworten vieler Fragen zur mikroskopischen Auswertung der Färbungen.

Ein großer Dank gilt Frau PD Dr. med. Eva Egger für die Mitbetreuung und -organisation des Projekts, für ihre Expertise von gynäko-onkologischer Seite sowie für die stets freundliche Hilfe und den konstruktiven Austausch bei sämtlichen Fragestellungen.

Außerdem möchte ich Herrn Markus Schmidt für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meinen Dank aussprechen.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Sarah Förster für ihre umfassende und geduldige Betreuung während der Laborarbeit und darüber hinaus. Ihre zuverlässige Unterstützung, ihre zahlreichen Ratschläge zur Methodik und ihre wertvollen Korrekturen haben wesentlich zur Durchführung des Projekts und zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke den Mitarbeitenden des pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Bonn Christiane Esch und Carsten Golletz für ihre große Hilfsbereitschaft beim Anfertigen der Paraffin-Schnitte für die immunhistochemischen Färbungen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von Herzen bei meinem Freund Tim Schwarzwald für seine Geduld und sein offenes Ohr und bei meinen Eltern Carolin Bender und Rainer Adloff für viele ermutigende Gespräche und eine großartige Unterstützung während meines gesamten Medizinstudiums.