

Expression von Neuropilin 2 bei high-grade serösen Ovarialkarzinomen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Rebecca Maria Witteler

aus Morristown, USA

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea
2. Gutachter: Prof. Dr. Georg Feldmann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2026

Aus der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Das Ovarialkarzinom	7
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik	7
1.1.2. Histopathologische Einteilung	9
1.1.3 Einteilung nach FIGO und TNM	10
1.1.4 Therapie	12
1.1.5 Nachsorge, Rezidivdiagnostik und -therapie	14
1.1.6 Stellenwert des high-grade serösen Ovarialkarzinoms	16
1.2 Neuropiline	17
1.2.1 Struktur und Überblick über die Funktionen der Neuropiline	17
1.2.2 NRP2: Interaktion mit VEGFs und SEMAs	18
1.2.3 NRP2: Physiologisches Vorkommen	19
1.2.4 NRP2: Tumorimmunologie	20
1.2.5 NRP2: Regulation von Metastasierungsprozessen	21
1.2.6 NRP2: Expression bei verschiedenen Krebsentitäten	23
1.2.7 Expression von NRPs bei epithelialen Ovarialkarzinomen	24
1.3 Fragestellung	27
2. Material und Methoden	29
2.1 Kohorte	29
2.2 Klinische Datenerhebung	29
2.3 Immunhistochemische Färbung	31
2.3.1 Auswahl und Vorbereitung der Gewebeschnitte	31
2.3.2 Entparaffinierung, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) und endogene Peroxidaseblockierung	32
2.3.3 Spezifische Färbung mit Primär- und Sekundärantikörper	32
2.3.4 Entwicklung mit Chromogen, Gegenfärbung und Dehydrierung	34
2.3.5 Qualitätskontrolle: Positiv- und Negativkontrollen	35
2.3.6 Reagenzien, Detektionssysteme, Materialien und Geräte	36

2.4	Auswertung der immunhistochemischen Färbung	37
2.5	Statistische Auswertung	40
3.	Ergebnisse	42
3.1	Initiale Kohorte	42
3.2	Beschreibung der endgültigen Kohorte	43
3.2.1	Epidemiologische Daten	43
3.2.2	Unterteilung der Kohorte nach FIGO-Stadien	45
3.2.3	Operation	45
3.2.4	Überlebenszeitanalyse	48
3.2.5	Systemtherapie	50
3.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung	50
3.3.1	Überblick	50
3.3.2	Fotos NRP2-positiver Präparate	53
3.3.3	NRP2-Expression in tumorumgebenden Lymphozyten	56
3.4	Assoziation der NRP2-Expression mit klinischen Parametern und dem Überleben	57
3.4.1	Klinische Parameter	57
3.4.2	Überleben	60
4.	Diskussion	62
4.1	Einordnung der Ergebnisse der statistischen Auswertung in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext	62
4.2	Einordnung der epidemiologischen Daten der Kohorte	64
4.3	Expression von NRP2 in TZ-Kernen bei HGSCs	65
4.4	Expression von NRP2 in tumorumgebenden Lymphozyten bei HGSCs	66
4.5	Auswertbarkeit und Limitationen	67
5.	Zusammenfassung	69
6.	Abbildungsverzeichnis	71
7.	Tabellenverzeichnis	72
8.	Literaturverzeichnis	73
9.	Erklärung zum Eigenanteil	93
10.	Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ASA-Score	Klassifikation der American Society of Anesthesiologists
AGO	Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CA-125	Cancer-Antigen 125
CSF-1	Colony Stimulating Factor 1
CT	Computertomographie
CXCR4	Chemokinrezeptor 4
DFS	Krankheitsfreies Überleben (disease-free survival)
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FDG	Fluordesoxyglucose
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FFPE-Gewebe	Formalin-fixiertes Paraffin-eigebettetes Gewebe
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HGSC	High-grade seröses Ovarialkarzinom
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval
HRS-POD	Meerrettich-Peroxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGFR	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IRS	Immunreaktiver Score nach Remmele
MRT	Magentresonanztomographie
NF-KB	Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells
NRP1	Neuropilin 1
NRP2	Neuropilin 2

OS	Gesamtüberleben (overall survival)
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCI	Peritoneal Cancer Index
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PD-L1	Programmed Cell Death 1 Ligand 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIGF	Placental Growth Factor
POD	Peroxidase
SEMA	Semaphorin
SI	Farbintensität (stainig intensity)
STIC	Serous tubal intraepithelial carcinoma
Tab.	Tabelle
TAM	Tumor-assoziierte Makrophage
TZ	Tumorzelle
UKB	Universitätsklinikum Bonn
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik

Das Ovarialkarzinom steht an dritter Stelle der häufigsten gynäkologischen Tumoren weltweit und stellt eine der führenden Krebstodesursachen für das weibliche Geschlecht dar (Sung et al., 2021). Die globale Inzidenz lag für das Jahr 2020 bei 313.959, wobei die höchste Anzahl an Neuerkrankungen mit einer altersstandardisierten Rate von 10,7 pro 100.000 Menschen in Zentral- und Osteuropa zu verzeichnen war. Mit einer Mortalitätsrate von 5,6 pro 100.000 liegt Europa über dem weltweiten Durchschnittswert von 4,2 (Huang et al., 2022). In Deutschland macht das Ovarialkarzinom etwa die Hälfte aller Todesursachen durch maligne Erkrankungen der weiblichen Genitale aus. Im überwiegenden Anteil der Fälle wird die Diagnose erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt, was die schlechte Prognose der Erkrankung bedingt: Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt dann bei 42 % (Stadium III) bzw. 21 % (Stadium IV). Es gilt die Klassifikation nach der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) und TNM. Sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität waren in den vergangenen 20 Jahren in Deutschland rückläufig.

Die Rate an Neuerkrankungen nimmt bis zum 85. Lebensjahr stetig zu, das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 68 Jahren (Robert-Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019).

Zu den Risikofaktoren zählen Mutationen verschiedener Gene, darunter BRCA1/2, MSH6 und TP53, die hormonelle Ersatztherapie der Peri- und Postmenopause, das Vorliegen einer Endometriose, und die Asbestexposition (Beral et al., 2007; Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, 2015; Constanza Camargo et al., 2011; Pearce et al., 2012; Walsh et al., 2011). Auch das Bestehen einer Adipositas, insbesondere bis zum Abschluss der Menopause, erhöht das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Liu et al., 2015; Leitzmann et al., 2009). Während die Nulliparität zu den weiteren Risikofaktoren gehört, sinkt die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit einer steigenden Anzahl an Geburten im Leben einer Frau (Jordan et al., 2008; Jul Mosgaard et al., 1997). Zusätzlich gelten die Einnahme

oralen Kontrazeptiva sowie das Stillen als protektiv (Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, 2008; Jordan et al., 2008).

Das Ovarialkarzinom zeigt in frühen Stadien zumeist keine charakteristischen Symptome. Das verdrängende Wachstum des Tumors führt oft erst spät zum Auftreten unspezifischer Beschwerden. Zu diesen zählen bspw. Unterbauchschmerzen, eine Bauchumfangszunahme, Miktionsbeschwerden, gastrointestinale Anzeichen oder vaginale Blutungen (Lasch und Fillenberg, 2017).

Im Folgenden wird sich auf die Empfehlungen des Leitlinienprogramms Onkologie (2022) bezogen.

Ein reines Screening zur Frühdetektion maligner Veränderungen der Ovarien, in etwa mittels Analyse des Tumormarkers Cancer-Antigen 125 (CA-125) oder einer transvaginalen Ultraschalluntersuchung, stellte in der randomisierten kontrollierten PLCO-Studie keinen Vorteil hinsichtlich des Überlebens dar und wird nicht empfohlen, dies gilt auch für Patientinnen der Risikopopulation (Buys et al., 2011; Karlan et al., 1999). Zur Risikopopulation gehören Frauen, deren erkrankte Angehörige eine für das Ovarialkarzinom relevante Keimbahnmutationen nachgewiesenermaßen aufweisen. Diese Patientengruppe könnte ggf. von einer genetischen Testung und anschließenden Salpingoophorektomie im Sinne einer signifikanten Risikoreduktion profitieren, weshalb das Leitlinienprogramm Onkologie (2022) in diesen Fällen eine klare Empfehlung zur multidisziplinären Beratung ausspricht (Finch et al., 2006).

Besteht der Verdacht auf ein Ovarialkarzinom, werden primär eine vaginale Spekulum- und Tastuntersuchung sowie eine transvaginale Sonographie durchgeführt. Zur weiteren Beurteilung möglicher Differenzialdiagnosen bzw. der Tumorausmaße eignen sich bildgebende Verfahren wie eine Computertomographie (CT), eine Magnetresonanztomographie (MRT) oder eine Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Ergänzend kann eine PET mit Fluordesoxyglucose (FDG) zur besseren Einschätzung von Lymphknotenmetastasen zum Einsatz kommen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Yuan et al., 2012). Die präoperative Bildgebung hat allerdings keinen Stellenwert bei der Vorhersehbarkeit der Operabilität des Tumors (Axtell et al., 2007).

In der Tat ist derzeit kein Verfahren verfügbar, das eine operative Laparotomie sowohl zum definitiven Staging, als auch zur Entfernung der maximalen Tumormasse ersetzt. Da beide Genannten in einer gemeinsamen Operation abgehandelt werden, wird auf die einzelnen Schritte im Kapitel „1.1.4: Therapie“ genauer eingegangen.

Die laparoskopische Ausbreitungsdiagnostik ist mit dem hohen Risiko der Tumorzellverschleppung verbunden und aus Sicht des Leitlinienprogramms Onkologie (2022) außerhalb von Studien nicht ratsam (Kindermann et al., 1996).

1.1.2 Histopathologische Einteilung

Die histopathologische Einteilung der Ovarialkarzinome erfolgt nach der Klassifikation der World Health Organization (WHO) von 2014. Es wird zwischen epithelialen und nicht-epithelialen Raumforderungen unterschieden. Tabelle (Tab.) 1 führt die malignen Tumoren des Ovars auf. Bei einigen Subtypen erfolgt eine zusätzliche Graduierung: Ab einer Einstufung von G2 spricht man beim unreifen Teratom von einer high-grade Läsion, beim serösen Typ ist dies ab G3 der Fall.

Eine eigene Untergruppe bilden die Borderlinetumore: Sie bezeichnen eine Dignität zwischen benignem Zystadenom und malignem Karzinom und können eine Vorstufe für fast jeden histologischen Subtyp der epithelialen Ovarialkarzinome darstellen. Borderlinetumore zeichnen sich mitunter durch atypische Epithelzellproliferationen aus, ohne dabei invasiv zu wachsen. Die differenzialdiagnostische Abgrenzung orientiert sich am prozentualen Anteil vorliegender Tumorzelltypen (Kurman et al., 2014).

Tab. 1: Histopathologische Einteilung maligner Ovarialtumore nach der Klassifikation der WHO von 2014

Es wird zwischen epithelialen und nicht-epithelialen Karzinomen unterschieden. Einige Subtypen werden weiter nach ihrer Graduierung unterteilt.

	Maligne Ovarialtumore	Graduierung
	Epitheliale Tumore	
	Seröses Karzinom	G1, G3
	Muzinöses Karzinom	-
	Seromuzinöses Karzinom	-
	Endometrioides Karzinom	G1, G2, G3
	Klarzelliges Karzinom	Immer G3
	Undifferenziertes Karzinom	Hochmaligne
	Maligner Brennertumor	-
	Karzinomsarkom	Hochmaligne
	Nicht-epitheliale Tumore	
Keimzelltumoren des Ovars	Dysgerminom	-
	Dottersacktumor	-
	Embryonales Karzinom	-
	Chorionkarzinom	-
	Unreifes Teratom	G1, G2, G3
	Gemischte Tumoren	-
Keimstrang-Stroma-Tumoren des Ovars	Granulosazelltumor	-
	Sertoli-Leydigzelltumor	-
	Malignes Fibrosarkom	-
Metastasen	Oft Mamma-Ca, Endometrium-Ca, maligne Lymphome, Tumoren des Gastrointestinaltrakts	-

1.1.3 Einteilung nach FIGO und TNM

Im Jahr 2014 wurde von der FIGO die aktuelle Klassifikation zur Stadieneinteilung maligner Tumoren von Ovar, Tube und Peritoneum publiziert (Tab. 2); sie ist mit der TNM-Klassifikation übereinstimmend und schließt sowohl epitheliale als auch nicht-epitheliale Karzinome sowie Borderlinetumore mit ein (Prat, 2014; Union of International Cancer Control, 2017). Ab einem FIGO-Stadium III spricht man von einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom.

Neben dem lymphogenen Metastasierungsweg nutzen Tumorzellen (TZs) des Ovarialkarzinoms passive Mechanismen zur Ausbildung intraabdominaler Metastasen: Aktuell wird angenommen, dass dieser Vorgang dank der intraperitonealen Lage der Ovarien über die direkte Zellverschleppung mit der sich bewegenden Peritonealflüssigkeit von statten geht (Lengyel, 2010). Bei vielen Patientinnen zeigen

sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Metastasen am Omentum und/oder Zwerchfell.

Tab. 2: Klassifikation maligner Tumore von Ovar, Tube und Peritoneum nach FIGO und TNM (2014)

Die Tumorformel TNM ist ein Akronym aus T = Tumor, N = Nodus (regionäre Lymphknoten) und M = Metastasen (Fernmetastasen). Der Ursprung des Tumors wird mit dem entsprechenden Suffix angegeben: OV = Ovar, FT = Tube, P = Peritoneum, X = Keine Bestimmung möglich.

TNM	FIGO	Definition
TX	-	Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
T0	-	Kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Auf Ovarien/Tuben beschränkter Tumor
T1a	IA	Befall eines Ovars/Tube (Kapsel/Serosa intakt), Oberfläche tumorfrei, Spülzytologie negativ
T1b	IB	Befall beider Ovarien/Tuben (Kapsel/Serosa intakt), Oberfläche tumorfrei, Spülzytologie negativ
T1c	IC	Befall einer/beider Ovarien/Tuben, zusätzlich einer der folgenden Punkte (IC1 - IC3):
		IC1/T1c1: Iatrogene Kapsel-/Serosaruptur
		IC2/T1c2: Präoperative Kapsel-/Serosaruptur oder Tumor auf der Ovar-/Tubenoberfläche
IC3/T1c3: Maligne Zellen im Aszites/in der Spülzytologie		
T2	II	Tumor befällt ein/beide Ovarien/Tuben mit Ausbreitung in das kleine Becken (zytologischer/histologischer Nachweis) oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Befall und/oder Tumorimplantate des Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
T2b	IIB	Befall weiterer intraperitonealer Strukturen im kleinen Becken
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein/beide Ovarien/Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens (zytologischer/histologischer Nachweis) und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a, N1b, T3a, jedes N	IIIA	A1: Retroperitoneale Metastasen (A1i/N1a: ≤1 c, A1ii/N1b: >1 cm)
		A2/T3a, jedes N: Mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit/ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b, jedes N	IIIB	Makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit/ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c, jedes N	IIIC	Makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens >2 cm mit/ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; beinhaltet Befall der Leber-/Milzkapsel
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
M1a	IVA	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

1.1.4 Therapie

Das therapeutische Vorgehen bei Keimstrang- und Keimzelltumoren unterscheidet sich teilweise von dem bei epithelialen Ovarialkarzinomen. In diesem Kapitel wird auf die Therapie der epithelialen Tumoren eingegangen.

Die Längsschnittlaparotomie dient sowohl dem endgültigen diagnostischen Staging, als auch der Entfernung der maximal resektablen Tumorlast. Das Ziel der Operation ist das Erreichen makroskopischer Tumorfreiheit: In einer groß angelegten Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass dieser Ausgang den Patientinnen einen entscheidenden Überlebensvorteil bietet (du Bois et al., 2009).

Ein sorgfältig abwägendes Verhalten unter Berücksichtigung des allgemeinen Gesundheitszustandes sowie der individuellen Prognose der Patientin ist jedoch stets ratsam, da gewisse operative Vorgehensweisen zum möglichen Erlangen einer vollständigen Resektion, wie bspw. die radikale Manipulation an Pankreas und Leber, das perioperative Mortalitätsrisiko erheblich steigern. Auch sind der Operabilität Grenzen gesetzt, wenn der Tumor das Mesenterium des Dünndarms befällt – in diesem Fall ist nicht davon auszugehen, dass komplette Tumorfreiheit erzielt wird (Heitz et al., 2016).

Die Operation beinhaltet das folgende Vorgehen:

- Medianer Längsschnitt von Symphyse zum Xiphoid
- Retroperitonealer Zugang: Resektion pelviner (und paraaortaler) Lymphknoten (bis FIGO Stadium IIa), ansonsten nur Entfernung von stark vergrößerten Lymphknoten
- En-bloc-Resektion von Uterus und Adnexen
- Resektion des Omentum majus und milznaher Anteile
- Inspektion der Bursa omentalis
- Appendektomie: immer bei muzinöser/unklarer Histologie, sonst nur bei Tumorbefall
- Folgende Organane sollten bei bestehendem Tumorbefall durch das fortgeschrittene Ovarialkarzinom außerdem reseziert werden: Peritoneum von Zwerchfell, Blase und Douglasraum; sämtliche Darmabschnitte (das Colon sigmoideum kann in Verbindung mit dem En-Bloc-Resektat entfernt werden); Leber, Milz

Aus diagnostischer Sicht steht intraoperativ außerdem der Ausschluss einer großflächigen Infiltration innerhalb des Situs im Vordergrund: Neben der Entnahme von Biopsien makroskopisch auffälliger Stellen wird eine Peritonealzytologie gewonnen und der gesamte Abdominalraum inspiziert und palpiert. Kategorisch werden darüber hinaus Biopsien des Peritoneums von Douglasraum, Blase, beider Beckenwände, beider parakolischer Rinnen und beider Zwerchfellkuppen gewonnen, sofern hier kein auffälliger sichtbarer Befund vorliegt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Alle Patientinnen profitieren in Hinblick auf das Gesamt- sowie das krankheitsfreie Überleben nachweislich von einer systemischen Chemotherapie im Anschluss an die Operation - ausgenommen von dieser Empfehlung sind lediglich Frauen mit einem gesicherten FIGO-Stadium IA bei einem Grading von G1 (Trimbos et al., 2003). Eine adjuvante Monotherapie mit Carboplatin ist Patientinnen bis zum FIGO-Stadium IC3 vorbehalten, ab Stadium II wird basierend auf zahlreichen Studien eine Kombinationschemotherapie bestehend aus Carboplatin und Paclitaxel über sechs Zyklen empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Ab einem FIGO-Stadium IIIB soll Patientinnen zusätzlich eine Erhaltungstherapie mit dem Angiogenesehemmer Bevacizumab oder einem Inhibitor der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) zugeführt werden. Zur Gruppe der PARP-Inhibitoren gehören Niraparib und Olaparib; Letzteres bietet vorrangig Patientinnen mit nachgewiesener BRCA1/2-Mutation einen Vorteil des rezidivfreien Überlebens und kann auch mit Bevacizumab kombiniert werden (Moore et al., 2018; Ray-Coquard et al., 2019). Niraparib wird ungeachtet des Mutationsstatus eingesetzt (González-Martín et al., 2019). Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der den angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) neutralisiert und somit Mechanismen der Angiogenese unterbindet (Ferrara et al., 2005; Muller et al., 1998). In der Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms verbesserte die Gabe des Angiogenesehemmers sowohl das krankheitsfreie als auch das Gesamtüberleben der Patientinnen (Perren et al., 2011).

Eine Alternative zum primär operativen Verfahren mit adjuvanter Systemtherapie stellt die neoadjuvante Chemotherapie mit sich anschließender Intervalloperation dar. Die

Intervalloperation wird in einem folgenden Schritt noch um eine Komplettierung der Chemotherapie ergänzt, sodass sich diese dann meist aus drei präoperativen und drei postoperativen Zyklen zusammensetzt. Das Prozedere kommt v.a. für Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium in Frage, die in der Primärsituation nicht tumorfrei zu operieren sind.

Es wurden zahlreiche Studien mit der Fragestellung der möglichen Überlegenheit eines der beiden Verfahren durchgeführt, ohne dass sich dabei deutliche Unterschiede des Langzeitüberlebens der Patientinnen nachweisen ließen. Es wird aufgrund der aktuellen Studienlage zur Primäroperation mit anschließender Chemotherapie geraten (Greimel et al., 2013; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Tangjitgamol et al., 2010; Vergote et al., 2010). Eine umfangreiche randomisierte Studie der European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) bestätigte diese Empfehlung weitestgehend. Tatsächlich ließ sich jedoch ein Überlebensvorteil für Patientinnen im FIGO-Stadium IV nach neoadjuvanter Chemotherapie und Intervalloperation beobachten, während im Stadium IIIC die Primäroperation mit einem besseren Ausgang assoziiert war (Vergote et al., 2018). Allerdings muss zu den benannten Studien ergänzt werden, dass es länderabhängig zu einer sehr heterogenen Operationsbereitschaft kam; auch verhielten sich die Raten bzgl. des Erreichens von Tumorfreiheit stark voneinander abweichend. Um die Wahl des Verfahrens klarer abzugrenzen, hat die Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologisches Onkologie (AGO) die TRUST-Studie initiiert, deren Ergebnisse voraussichtlich im nächsten Jahr vorliegen werden. Allgemein gilt es, den individuellen Gesundheitszustand der Patientin sowie sämtliche vorliegende Faktoren zu berücksichtigen.

1.1.5 Nachsorge, Rezidivdiagnostik und -therapie

Die Patientinnen erhalten Nachsorgetermine in regelmäßigen Abständen von drei Monaten innerhalb der ersten drei Jahre, bzw. sechs Monaten im vierten und fünften Jahr nach Abschluss der Primärtherapie. Es stehen die Anamnese sowie die gynäkologische körperliche Untersuchung inkl. transvaginalem Ultraschall im Vordergrund. Der Verdacht auf ein Rezidiv begründet den Einsatz bildgebender Verfahren wie einer CT, MRT oder PET-CT/MRT (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Die Rolle des Tumormarkers CA-125 in der Nachsorge gilt als umstritten: Zwar steigt er bei Krankheitsprogress in vielen Fällen schon Monate vor dem erneuten Auftreten klinischer Symptome an, ein klarer Überlebensvorteil für die darauf basierende frühzeitigere Therapieeinleitung erwies sich jedoch nicht (Rustin et al. 2001, 2010; van der Burg et al., 1990). Aus diesem Grund kann die routinemäßige Erhebung von CA-125 zwar zum Nutzen einer Therapieüberwachung erwogen werden, als reines Screeninginstrument wird sie in der Rezidivdiagnostik allerdings nicht empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Kommt es zum Auftreten eines Rezidivs, so richtet sich die Wahl der Behandlung nach dem Ansprechen auf die initial durchgeführte Chemotherapie mit Carboplatin: Rezidive können entweder der Gruppe der platinsensitiven oder der platinresistenten Tumore zugeordnet werden. Patientinnen mit platinresistentem Rezidiv wird eine platinfreie Zytostatikamonotherapie mit Doxorubicin, Topotecan, Gemcitabin oder Paclitaxel empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Patientinnen mit platinsensiblen Rezidiv soll eine Kombinationschemotherapie mit Carboplatin und entweder Gemcitabin, Paclitaxel oder Doxorubicin angeboten werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Weiter kann insbesondere diese Gruppe hinsichtlich der Prognose von einer zytoreduktiven Operation vor Beginn der erneuten Chemotherapie profitieren, sofern auch bei diesem Eingriff makroskopische Tumorfreiheit erreicht wird (Eisenkop et al., 2000; Harter et al., 2006). Die DESKTOP-III-Studie konnte dies bzgl. den AGO-Score als klaren Handlungsalgorithmus definieren: Bei einem Performance-Status gemäß der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) von 0, Aszites mit weniger als 500 ml und dem Erreichen von Tumorfreiheit bei der letzten Operation ist eine erneute Operation des Rezidivs sinnvoll, da hierbei 75,5 % aller Patientinnen nochmals tumorfrei operiert werden können, was sich in einem signifikanten Überlebensvorteil von fast einem Jahr manifestierte (Harter et al, 2021). Der ECOG-Score stellt ein Bewertungssystem zur Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustands von Krebspatienten dar (Oken et al., 1982).

Bevacizumab kann sowohl bei Resistenz als auch bei Ansprechen auf platinsensitive Zytostatika zum Therapieregime hinzugefügt werden. Für beide Gruppen zeigte sich ein

positiver Einfluss des Medikaments auf das krankheitsfreie Überleben (Aghajanian et al., 2012; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Pujade-Lauraine et al., 2014).

1.1.6 Stellenwert des high-grade serösen Ovarialkarzinoms

High-grade seröse Ovarialkarzinome (HGSCs) machen mehr als die Hälfte aller malignen Ovarialtumoren aus. Im Gegensatz zu einigen anderen histologischen Untergruppen werden sie in 70 % der Fälle erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, was die zumeist eingeschränkte Operabilität und damit verbundene schlechte Prognose der Erkrankung bedingt. Ein Großteil der Patientinnen befindet sich zum Erkrankungszeitpunkt im postmenopausalen Alter, das mediane Überleben beläuft sich auf nur 30 Monate (Lengyel, 2010; Vaughan et al., 2011).

Der high-grade seröse Subtyp zeichnet sich u.a. durch sein aggressives Wachstum aus: Histopathologisch zeigen sich ein hoher Mitoseindex, zahlreiche pleomorphe Tumorzellkerne und diverse Mutationsmuster des Tumorsuppressorproteins P53 (Prat, 2014).

Kurman konnte zeigen, dass sich HGSCs in Form von serösen intraepithelialen Präkanzerosen (serous tubal intraepithelial carcinoma = STIC) in den Tuben entwickeln. Diese STICs gelten als Vorläufer der HGSCs (Kurman und Shih, 2011). Darauf basiert auch der Trend zur Empfehlung der opportunistischen Eileiterresektion bei abgeschlossener Familienplanung (Schweizerische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2020).

Low-grade seröse Karzinome sind laut aktuellem Wissensstand eine eigene Entität und somit nicht als Vorstufe von HGSCs anzusehen. Sie entwickeln sich in den meisten Fällen aus Borderlinetumoren und sind im Allgemeinen mit einer deutlich besseren Prognose assoziiert: Patientinnen sind bei Diagnosestellung zumeist jung, das Gesamtüberleben beträgt durchschnittlich 82 Monate, ein Vielfaches der Prognose der Erkrankten mit HGSC (Gershenson et al., 2006; Lengyel, 2010).

1.2 Neuropiline

1.2.1 Struktur und Überblick über die Funktionen der Neuropiline

Neuropiline (NRPs) sind Glykoproteine, die zur Gruppe der Non-Tyrosinkinaserzeptoren gehören. Bisher sind die beiden strukturell identischen Neuropiline Neuropilin 1 (NRP1) und Neuropilin 2 (NRP2) bekannt: Ihre lange extrazelluläre Region besteht aus den Domänen a1a2, b1b2 und c, außerdem haben sie eine transmembranäre und eine kurze zytoplasmatische Domäne (Chen et al., 1997; Dutta et al., 2016; Kawakami et al., 1996).

NRP1 und NRP2 bestehen jeweils aus 17 Exons und 16 Introns und stimmen auf Ebene ihrer Aminosäuresequenz zu 44 % miteinander überein, wobei die transmembranären Regionen die größte Homologie aufweisen (Chen et al., 1997; Rossignol et al., 2000). Innerhalb der c-Domäne befindet sich eine Aminosäuresequenz namens MAM-Domäne, mittels der NRP1 und NRP2 Homo- sowie Heterodimere untereinander ausbilden können (Chen et al., 1998).

Es konnten unterschiedliche Isoformen der NRPs identifiziert und zudem bewiesen werden, dass sie sowohl als membranständige Rezeptoren als auch als lösliche Moleküle vorliegen. Lösliche NRP-Isoformen entstehen durch Splicingmechanismen und bestehen nur aus den a- und b-Domänen des Proteins. Sie fungieren im Gegensatz zu den membranständigen NRPs und agieren als Rezeptorantagonisten (Chen et al., 1997; Rossignol et al., 2000).

Auf molekularer Ebene interagieren NRPs mit einigen unterschiedlichen transmembranären Rezeptoren, darunter der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und der Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGFR), und nehmen so auf diverse Signalkaskaden Einfluss (Dutta et al., 2016; Goel et al., 2012).

Über ihre Interaktion mit Semaphorinen (SEMAPs) spielen NRPs eine wesentliche Rolle in der embryonalen Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems (Giger et al., 1998, 2000).

Weitere Funktionen übernehmen sie mittels Bindung der VEGFs und deren Rezeptoren in der Entwicklung sowohl von Lymph- als auch Blutgefäßen, und gewinnen somit nicht nur in der Neonatalperiode, sondern auch in der Karzinogenese an zentraler Bedeutung (Caunt et al., 2008; Herzog et al., 2001; Yuan et al., 2002).

Auf die genannten Aspekte soll in nachfolgenden Kapiteln noch detaillierter eingegangen werden.

1.2.2. NRP2: Interaktion mit VEGFs und SEMAs

VEGFs wurden erstmalig von Tischer et al. (1989) beschrieben und beinhalten eine Gruppe von Signalmolekülen, die durch Bindung verschiedener Rezeptoren Einfluss auf die Angio- und Lymphogenese nehmen (Kondo et al., 1995; Karkkainen et al., 2004). Nach dem heutigen Stand sind die sieben Vertreter VEGF-A/B/C/D/E/F und der Placental Growth Factor (PlGF) bekannt, von denen einzelne weiter über Isoformen verfügen (Achen et al., 1998; Joukov et al., 1996; Ogawa et al., 1998; Olofsson et al., 1996; Yamazaki et al., 2003; Ylä-Herttuala et al., 2007).

Als Rezeptoren für VEGFs dienen einerseits die Vascular Endothelial Growth Factor Receptors (VEGFRs) 1-3, die zu den Rezeptortyrosinkinasen gehören. Andererseits binden einige der Wachstumsfaktoren auch NRPs. NRPs interagieren sowohl in ihrer löslichen als auch in ihrer membrangebundenen Form mit den VEGFs und deren Rezeptoren.

Ein wichtiger Ligand des membrangebundenen NRP2 ist VEGF-A mit seinen Isoformen VEGF-145 und VEGF-165, die durch alternatives Splicing entstehen und maßgeblich an Prozessen der Angiogenese sowie der Erhöhung der vaskulären Permeabilität beteiligt sind (Goel et al., 2011; Gluzman-Poltorak et al., 2001; Kondo et al., 1995; Murohara et al., 1998; Tischer et al., 1991). Bildet NRP2 überdies Komplexe mit VEGFR-1, verstärkt sich die Bindung zwischen VEGF-165 mit NRP2 (Gluzman-Poltorak et al., 2001).

Weitere NRP2-Liganden aus der Familie sind PlGF, VEGF-D und VEGF-C; letzterer ist maßgeblich an Prozessen der Lymphangiogenese beteiligt (Gluzman-Poltorak et al., 2000; Kärpänen et al., 2006; Yasuoka et al., 2009). Caunt et al. (2008) haben nachgewiesen, dass NRP2 im Falle von VEGF-C als zusätzlicher Corezeptor gemeinsam mit VEGFR-3 agiert und so zudem eine Rolle als Modulator der Lymphangiogenese übernimmt. Weiter wurde die isolierte Interaktion zwischen NRP2 und VEGFR-3 beschrieben. Die Bedeutsamkeit von NRP2 in der Lymphogenese konnte in einem Experiment von Yuan et al. (2002) veranschaulicht werden: So wiesen Mäuse mit NRP2-Defizit nur ansatzweise ausgebildete oder gar nicht vorhandene Lymphgefäße auf.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass VEGFR-2, einer der gemeinsamen Rezeptoren für VEGF-A und -C, als Komplex mit NRP2 vorliegend eine bessere Phosphorylierung erzielt als allein. Darüber hinaus induziert die Bindung zwischen VEGF-A/-C und NRP2 die Ausbildung solcher Komplexe. Schließlich führen beide beschriebenen Mechanismen dazu, dass die von VEGF-A und -C angestoßenen Prozesse der Lymphe- und Angiogenese unter NRP2-Einfluss in verstärktem Maße ausgeführt werden (Favier et al., 2006).

In der Gesamtheit lässt sich feststellen, dass das Zusammenspiel zwischen der VEGF-Familie und NRP2 komplexen Funktionsweisen und Regelkreisläufen unterliegt, die sich gegenseitig modulieren können.

Die Familie der SEMAs beinhaltet Proteine, die in löslicher und membrangebundener Form verschiedene Funktionen während der Entwicklung des Nervensystems übernehmen (Chen et al., 1997; Kolodkin et al., 1993). Es sind mehrere unterschiedliche Gruppen von SEMAs bekannt, von denen einige durch axonale Repulsion an der Organisation von Neuronen während der Embryonalperiode beteiligt sind (Messersmith et al., 1995; Püschel et al., 1995, 1996). Einen Einfluss auf diesen Prozess nimmt NRP2 als Rezeptor für SEMAs der Klasse 3: Hier spielt es durch seine Interaktion mit SEMA3C und SEMA3F eine unentbehrliche Rolle in der Ausrichtung und Faszikulation einiger Hirn- und Spinalnerven (Giger et al., 2000; Sahay et al., 2003).

Liegt NRP2 gebunden an SEMA3F vor, kommt es überdies zu einer Abschwächung der Effekte, die mit NRP2 als Corezeptor durch VEGF-A und -C hervorgerufen wurden (Favier et al., 2006). Das beschriebene Phänomen lässt vermuten, dass SEMAs und VEGFs als Liganden um die Bindung mit ihrem gemeinsamen Rezeptor NRP2 konkurrieren.

1.2.3 NRP2: Physiologisches Vorkommen

Dank seiner Interaktionen mit SEMAs und VEGFs ist NRP2 maßgeblich an lympho- und angiogenetischen sowie neuronalen Prozessen beteiligt und wird physiologischerweise hauptsächlich von Nerven, Lymph- und Blutgefäßen exprimiert (Chen et al., 1998; Yuan et al., 2002).

NRP2 konnte u.a. von Rushing et al. (2012) in zahlreichen gesunden menschlichen Geweben immunhistochemisch nachgewiesen werden. Hervorzuheben sind aufgrund

ihrer moderaten bis starken Expression Hoden, Nieren, Plazenta, Haut, Leber und die gestreifte Muskulatur. Weiter zeigen pankreatische Langerhansinseln und Azinuszellen, sowie Lymph- und Blutgefäße der Schilddrüse physiologischerweise NRP2-Signale (Fukahi et al., 2004; Yasuoka et al., 2011).

Darüber hinaus wird NRP2 auch in den weiblichen Geschlechtsorganen exprimiert: Es zeigte sich eine erhöhte Proteinexpression in den Epithelzellen des Uterus von Ratten, welche der Östrogenregulation innerhalb des Brunstzyklus unterlag (Pavelock et al., 2001). In gesundem humanem Brustgewebe konnte NRP2 wiederum in Lymph- und Blutgefäßen nachgewiesen werden. In Tierexperimenten wurde außerdem die Mitbeteiligung von NRP2 an pubertären Brustdrüsenreifungsprozessen gezeigt (Goel et al., 2011; Yasuoka et al., 2009).

Drenberg et al. (2009) haben bewiesen, dass NRP2 in gesunden Epithelzellen des menschlichen Ovars in über zwei Dritteln der untersuchten Fälle exprimiert wird, bei ovariellen Stromazellen sind es bis zu 90 %. Auch konnten erhöhte Mengen des Glykoproteins in solchen Epithelien nachgewiesen werden, die Inklusions- und parafollikuläre Ovarialzysten auskleiden.

1.2.4 NRP2: Tumorummunologie

Im akut entzündlichen Geschehen konnte ein erheblicher Anstieg der NRP2-Konzentration bei alveolären Makrophagen gemessen werden, der auf den Einfluss des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells (NF-KB) zurückzuführen ist (Immormino et al., 2018).

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) sind spezialisierte Zellen des angeborenen Immunsystems, denen man in der aktuellen Forschung tumorfördernde Eigenschaften, darunter positive Effekte auf Tumorzellextavasation und -wachstum, beimisst (Noy und Pollard, 2014). Roy et al. (2018) konnten die begünstigende Wirkung von NRP2 auf immunsupprimierende Charakteristika der TAMs belegen, welche nachließ und darüber hinaus von immunstimulierenden Prozessen innerhalb der Immunzellen abgelöst wurde, sobald der Einfluss von NRP2 wegfiel.

Auch wird die Funktion von NRP2 an der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort diskutiert und gewinnt für die Onkologie zunehmend an

Bedeutung: Es wird in seiner polysialylierten Form in dendritischen Zellen exprimiert und ist in diesem Zustand in der Lage, die von den dendritischen Zellen betriebene T-Lymphozyten-Aktivierung zu regulieren (Curreli et al., 2007). Weiter hat das Team um Wang et al. (2023) in In-Vitro-Experimenten von Prostatakarzinomzellen beobachtet, dass es bei NRP2-Unterdrückung zu einer Stimulation der T-Zell-Antwort kam. Zusätzlich resultierte die Aufhebung der VEGF-NRP2-Verbindung in einer verminderten TZ-Expression von Programmed Cell Death 1 Ligand 1 (PD-L1) sowie einem rückläufigen Krebswachstum.

Regulatorischen Aufgaben kommt NRP2 überdies bei der Entwicklung der Immuntoleranz nach: In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass NRP2 die Funktion regulatorischer B-Lymphozyten modulieren kann (Wang et al., 2022).

Vor dem Hintergrund der wachsenden Bedeutung zielgerichteter Immuntherapien zur Behandlung verschiedener onkologischer Krankheitsbilder bieten die bisher gewonnenen Erkenntnisse einen wichtigen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen der genauen Funktionsweisen und Interaktionen, denen NRP2 mit diversen Vertretern der angeborenen und der adaptiven Immunantwort nachkommt.

1.2.5 NRP2: Regulation von Metastasierungsprozessen

Es sind einige molekulare Mechanismen bekannt, anhand derer NRP2 verschiedene Prozesse der Karzinogenese beeinflussen kann.

NRP2 ist maßgeblich an der Tumorangiogenese beteiligt und moduliert auf mehreren Ebenen sowohl das Krebswachstum des Primarius durch Neovaskularisation, als auch die hämatogene Tumorzellaussaat. Beide NRPs konnten in Tumorkapillaren nachgewiesen werden, Kawakami et al. (2002) belegten außerdem einen positiven Einfluss auf die Krebsprogression bei gleichzeitiger Expression von NRP1 und NRP2 (Fukahi et al., 2004).

Darüber hinaus kann NRP2 einerseits direkt, andererseits indirekt über die Bindung des Platelet Derived Growth Factor (PDGF) Einfluss auf Proliferations- und Migrationsprozesse glatter Gefäßmuskelzellen in der Tunica media nehmen (Pellet-Many et al., 2015).

Über seine Interaktion mit Alpha-5-Integrinen auf Endothelzellen beeinflusst NRP2 einen entscheidenden Schritt der hämatogenen Metastasierung: Wird das Glykoprotein in TZs

exprimiert, können diese an Integrine von Endothelzellen binden und nachfolgend die Tumorzellextravasation herbeiführen (Cao et al., 2013). Weitere potente Liganden, die interagierend mit NRP2 die Endothelzellproliferation vorantreiben, sind der Hepatocyte Growth Factor (HGF), VEGF-165 und VEGF-D (Kärpänen et al., 2006; Sulpice et al., 2008).

Auch können NRP2 beeinflussende Effekte auf die lymphogene Metastasierung zugeschrieben werden. Einen wichtigen Mechanismus dafür stellt die Verbindung des Glykoproteins zur VEGF-Familie dar: Die Überexpression von VEGF-C bewirkt eine Hyperplasie des Lymphgewebes in unmittelbarer Umgebung maligner Tumoren und bedingt dadurch die vereinfachte Tumorzellaussaat (Hoshida et al., 2006; Mandriota et al., 2001). Durch die bereits erwähnten Interaktionen zwischen NRP2 und VEGF-C sowie seinen Rezeptoren kann dieser Mechanismus entscheidend moduliert werden.

Entsprechend konnten Yasuoka et al. (2009) erhöhte Konzentrationen des Wachstumsfaktors in gleichzeitiger Präsenz von NRP2 im Zytoplasma von Brustkrebszellen messen; weiter gelang der Nachweis eines signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von NRP2, dem Vorkommen von VEGF-C, und dem Ausmaß von Lymphknotenmetastasen.

Gründlich erforscht sind darüber hinaus zahlreiche Mechanismen, über die der Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) zum Progress maligner Tumoren beiträgt (Chatterjee et al., 2014). Eine Korrelation zwischen der CXCR4-Expression und dem Metastasierungsmaß, sowie der Prognose wurde von Barbolina et al. (2010) auch für epitheliale Ovarialkarzinome beschrieben. Yasuoka et al. (2009) haben gezeigt, dass die Expression von NRP2 beim Mammakarzinom mit der von CXCR4 korreliert, umgekehrt führte eine Signalunterdrückung von NRP2 in In-Vitro-Experimenten zu einer verminderten CXCR4-Konzentration und einer damit verbunden reduzierten Krebszellmigration. Die Erkenntnis lässt auch in diesem Beispiel erneut eine Regulatorfunktion von NRP2 in Metastasierungsprozessen vermuten.

1.2.6 NRP2: Expression bei verschiedenen Krebsentitäten

NRP2 wird in TZs der folgenden Krebsarten exprimiert: Hepatozelluläres Karzinom, Karzinoid, Kolorektalkarzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Magenkarzinom, malignes Melanom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Pankreaskarzinom und papilläres Schilddrüsenkarzinom. Von einigen Autoren wurde die Lokalisation von NRP2 innerhalb der TZs genauer beschrieben: NRP2 ließ sich beim Kolorektal-, Magen-, Mamma-, Prostata-, papillären Schilddrüsenkarzinom und dem malignen Melanom im Zytoplasma und/oder an der Zellmembran nachweisen (Borkowetz et al., 2020; Cao et al., 2013; Gray et al., 2008; Kawakami et al., 2002; Rushing et al., 2012; Samuel et al., 2011; Wittmann et al., 2015; Yasuoka et al. 2009, 2011).

Erstmals konnte ein NRP2-Signal von Dutta et al. (2022) auch innerhalb der Zellkerne von Prostatakarzinomzellen gemessen werden.

Fukahi et al. (2004) beobachteten die Expression von NRP2 beim Pankreaskarzinom außerdem bei tumorumgebenden Zellen, die nicht entartet waren.

Bei den meisten der genannten Tumorentitäten wurde ein malignitätsfördernder Effekt von NRP2 auf den Grad der Tumorzellendifferenzierung, das Metastasierungsausmaß, die Prognose oder das Tumorwachstum nachgewiesen; teilweise bestanden auch mehrere Assoziationen gleichzeitig (Tab. 3).

Tab. 3: NRP2-Expression bei malignen Tumoren

Bei den aufgeführten Krebsarten bestehen einer oder mehrere Zusammenhänge zwischen der NRP2-Expression und dem Grad der Tumorzellendifferenzierung, dem Metastasierungsmaß, der Prognose oder dem Tumorwachstum. Das Zutreffen eines Zusammenhangs ist mit einem "x" gekennzeichnet.

	Entdifferenzierung von Tumorzellen	Größeres Metastasierungsmaß	Verschlechterung der Prognose	Verbessertes Tumorwachstum
Hepatozelluläres Karzinom	x			
Karzinoid (Zelllinien)				x
Kolorektalkarzinom		x		x
Malignes Melanom			x	
Mammakarziom		x	x	
Nierenzellkarzinom	x			
Prostatakarzinom			x	
Pankreaskarzinom		x	x	
Papilläres Schilddrüsenkarzinom		x		

1.2.7 Expression von NRPs bei epithelialen Ovarialkarzinomen

Die Expression von NRP1 bei epithelialen Ovarialkarzinomen wurde von Jiang et al. (2015) an 125 Präparaten unterschiedlicher histologischer Subtypen untersucht: Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der NRP1-Konzentration bei Präparaten von Patientinnen in höherem FIGO-Stadium, sowie in Fällen mit zusätzlichem Lymphknotenbefall oder bereits fortgeschrittener Metastasierung.

Ergänzend zu diesen Erkenntnissen konnten Baba et al. (2007) allerdings keinen signifikanten Unterschied der NRP1-Expression zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen feststellen. Weitere Experimente des Teams haben gezeigt, dass die Unterdrückung des NRP1-Signals in vitro zu einem herabgesetzten

Zellwachstum und Invasionspotential führte, und unterdessen die Zellproliferation hemmte.

In Anbetracht dieser Ergebnisse könnte NRP1 zukünftig als Marker für die Prognose epithelialer Ovarialkarzinome an Bedeutung gewinnen und überdies einen therapeutischen Angriffspunkt auf molekularer Ebene darstellen.

Die Expression von NRP2 bei Ovarialkarzinomen ist noch nicht gut erforscht, es existieren nach aktuellem Wissensstand nur wenige eindeutige Erkenntnisse auf diesem Gebiet. Insbesondere das Vorkommen beim high-grade serösen Subtyp wurde bis jetzt kaum genauer untersucht.

Die Interaktionen von NRP2 mit Vertretern der VEGF-Familie und den SEMAs wurden in vorherigen Kapiteln schon gründlich erläutert. Wang et al. (2009) konnten eine Korrelation zwischen der Expression der drei NRP2-Bindungspartner VEGF-121, VEGF-165 und VEGFR-2 und dem Invasionspotential bzw. einer zunehmenden Entdifferenzierung ovarieller TZs feststellen. Im Gegensatz dazu wurde nachgewiesen, dass verminderte Konzentrationen von SEMA3F mit einem Tumorprogress assoziiert sind (Drenberg et al., 2009; Joseph et al., 2010). Beide Erkenntnisse decken sich den Forschungsergebnissen von Osada et al. (2006), die bei ansteigendem VEGF/SEMA-Verhältnis eine schlechtere Prognose der Ovarialkarzinompatientinnen beschrieben. Nun stellt sich die Frage, welche Rolle NRP2 in diesem Kontext spielt, und ob sich die Expression des Glykoproteins kongruent zu der seiner Liganden verhält.

NRP2 wurde sowohl in Epithelien gesunder als auch maligne entarteter Ovarien nachgewiesen. Nach dem Gegenstand aktueller Forschung ist man sich jedoch nicht einig, ob NRP2 in TZs epithelialer Ovarialkarzinome im Vergleich zu nicht/weniger entartetem Gewebe bzw. im Vergleich zu Tumoren im weniger fortgeschrittenen Stadium allgemein stärker, schwächer oder gleich stark exprimiert wird. Bislang wurden in mehreren unterschiedlichen Studien voneinander abweichende Möglichkeiten beobachtet (Bednarek et al., 2011; Drenberg et al., 2009; Joseph et al., 2010; Osada et al., 2006; Wang et al. 2009).

Bednarek et al. (2011) und Osada et al. (2006) untersuchten das mögliche Vorliegen eines Zusammenhangs zwischen dem Vorkommen von NRP2 und dem FIGO-Stadium, dem histologischen Subtyp und dem Grad der Entdifferenzierung der TZs: Signifikante

Korrelationen zwischen der NRP2-Expression und einem der genannten Parameter konnten von keinem der Autoren nachgewiesen werden. Im Vergleich zu gutartigen Raumforderungen haben Osada et al. (2006) bei Ovarialkarzinomen sämtlicher histologischer Subtypen (muzinös, serös, endometroid etc.) allerdings signifikant höhere NRP2-Konzentrationen gemessen.

Es existieren zudem Hinweise darauf, dass erhöhte NRP2-Konzentrationen vor allem bei Karzinomen im frühen FIGO-Stadium und solchen mit einem low-grade Differenzierungsstatus zu finden sind (Bednarek et al., 2011; Drenberg et al., 2009). Darüber hinaus vertreten Drenberg et al. (2009) die These, dass eine Tumorprogression mit einer rückläufigen Proteinexpression einhergeht.

Übereinstimmend mit den meisten Beobachtungen zu NRP2 bei anderen Krebsentitäten hat man das Protein auch beim Ovarialkarzinom immunhistochemisch im Zytoplasma und an der Zellmembran nachgewiesen; Drenberg et al. (2009) haben das Vorkommen zudem in den Stromazellen des tumorumgebenen Gewebes einiger Präparate beschrieben (Osada et al., 2006).

Bisweilen wurde nur von einem der Autoren die Fragestellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der NRP2-Expression und der Prognose von erkrankten Patientinnen untersucht: Osada et al. (2006) konnten dies bzgl. keine Korrelation feststellen.

Es ist insbesondere darauf hinzuweisen, dass die Autoren der erwähnten Studien allesamt kleinere Kohorten untersuchten. So beziehen sich die Beobachtungen von Drenberg et al. (2009) auf ein Kollektiv bestehend aus insgesamt 44 Patientinnen, von denen nur zehn mit malignen Raumforderungen des Ovars diagnostiziert wurden, darunter vier mit einem schlecht differenzierten Karzinom. Etwas größer waren die Kohorten der Teams um Bednarek et al. (2011) und Osada et al. (2006), die jeweils um die 60 Patientinnen mit malignen Raumforderungen beinhalteten, darunter hatten je 30 bzw. 24 Patientinnen ein seröses Ovarialkarzinom. Allerdings wurden die Kollektive in beiden Studien zu einem überwiegenden Anteil von über 70 % von gut differenzierten Tumoren (G1) dominiert, sodass sich die Gruppe der untersuchten HGSCs auf eine sehr geringe Anzahl von Präparaten beschränkte.

Angesichts dieser Tatsachen und der allgemeinen Unstimmigkeiten zur Expression von NRP2 bei epithelialen Ovariakarzinomen gilt das Thema als unzureichend erforscht und

lässt mehrere Fragen offen. Insbesondere das Vorkommen bei high-grade serösen Subtypen - die einen erheblichen Anteil aller Ovarialkarzinome ausmachen und durch eine besonders schlechte Prognose gekennzeichnet sind - wurde noch nicht ausreichend untersucht.

1.3 Fragestellung

HGSCs sind durch eine besonders schlechte Prognose gekennzeichnet. Als prognostisch positiv gilt die Diagnosestellung im frühzeitigen Stadium, weil diese die Chancen einer kompletten Tumorresektion maßgeblich erhöht. Das operative Erlangen makroskopischer Tumorfreiheit, sofern möglich, beschreibt das übergeordnete Ziel der Therapie der Erkrankung, da es den Patientinnen einen signifikanten Überlebensvorteil gewährleistet. NRP2 kann durch unterschiedliche Interaktionen auf molekularer Ebene Mechanismen der Karzinogenese beeinflussen und gilt für einige Krebsentitäten als malignitätsfördernder und somit prognoseverschlechternder Faktor.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob dies auch für die Gruppe der HGSCs gilt. Obgleich schon wenige Untersuchungen zum Vorkommen von NRP2 bei Ovarialkarzinomen durchgeführt wurden, beschränken sich die Erkenntnisse innerhalb der Gruppe der HGSCs auf einen sehr geringen und nicht repräsentativen Anteil. Die aktuelle Datenlage ist teils widersprüchlich und beantwortet einige Fragen nur unzureichend. Insbesondere der Einfluss von NRP2 auf das krankheitsfreie sowie das Gesamtüberleben von Patientinnen mit HGSC wurde bisher kaum erforscht.

Die folgenden Parameter erlauben unter Berücksichtigung weiterer individueller Faktoren eine grobe Einschätzung der Prognose, da sie indirekte Aufschlüsse über die Operabilität und die damit verbundene Möglichkeit des Erreichens von Tumorfreiheit geben: Das FIGO-Stadium, die Tumorverteilung, der Peritoneal Cancer Index (PCI) und das Ausmaß an postoperativen Tumorresiduen.

Es wurde das Bestehen möglicher Korrelationen zwischen diesen Parametern und der Expression von NRP2 bei HGSCs untersucht; darüber hinaus stand die Analyse eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Proteinexpression und dem krankheitsfreien sowie das Gesamtüberleben im Fokus.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden Präparate von Patientinnen, die an einem HGSC erkrankt waren, nach immunhistochemischen Methoden gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Im Vorfeld wurden einige klinische Daten der Kohorte erhoben. Um ein möglichst repräsentatives Ergebnis zu erzielen, wurde ein Patientenkollektiv gewählt, das den Umfang der bisherigen Studien zur beschriebenen Fragestellung um ein Vielfaches übersteigt.

Die aktuelle Literatur beschreibt außerdem die Rolle von NRP2 in tumorimmunologischen Prozessen, weshalb außerdem untersucht wurde, ob das Glykoprotein von tumorumgebenden Immunzellen exprimiert wird.

Bislang wurde das Vorkommen von NRP2 ausschließlich an der Membran sowie dem Zytoplasma von TZs bei HGSCs beschrieben; auch dieser Aspekt war Gegenstand der Fragestellung dieser Arbeit.

2. Material und Methoden

2.1 Kohorte

Die zu untersuchende Kohorte umfasste 176 Patientinnen, die im Zeitraum vom 13.01.2010 bis zum 15.12.2020 in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Bonn (UKB) wegen des Vorliegens eines HGSC operiert wurden. Hierbei wurde nicht unterschieden, ob es sich bei der Operation um die Behandlung einer Primärdiagnose oder eines Rezidivs handelte. Die Erstdiagnose wurde jeweils im Zeitraum vom 01.12.1986 bis zum 15.12.2020 gestellt.

Im Rahmen der Biobank-Initiative der Klinik wurde nach Patientenaufklärung Tumorgewebe operativ gewonnen und im Institut für Pathologie des UKB konserviert und gelagert.

Die ethischen Voraussetzungen für die rein retrospektive Datenerhebung dieses Projektes wurden unter dem Aktenzeichen 334/21 von der hiesigen Ethikkommission geprüft und akzeptiert.

2.2 Klinische Datenerhebung

Der erste Schritt des Projekts beschäftigte sich mit dem Teil der Datenerhebung.

Quelle für die Datenermittlung war das elektronische Patientensystem Orbis der Universitätsklinik. Hier erfolgte anhand von Arztbriefen, Berichten von Tumorboards, Operationsberichten, Pflegeberichten, Pathologie- und Untersuchungsbefunden die Erhebung aller klinisch relevanten Parameter.

Dokumentiert wurden das Datum der Erstdiagnose und ob es sich bei der Hauptoperation am UKB um eine primäre Operation oder die Behandlung eines ersten oder ggf. zweiten Rezidivs handelte, ob die Diagnose mittels vorangegangener Laparoskopie bestätigt wurde, und um welches FIGO-Stadium es sich im individuellen Fall handelte.

Es wurden anhand der Operationsberichte Daten zur Ausbreitung des Tumors im Unterbauch und Situs erhoben, weiter wurde der PCI nach Jacquet und Sugarbaker (1996) durch eine retrospektive Erhebung ermittelt. Der PCI quantifiziert das Ausmaß an peritonealer Karzinose: Abdomen und Pelvis werden dafür in insgesamt 13 Bereiche

unterteilt, die je nach Menge der vorhandenen peritonealen Metastasierung mit null bis drei Punkten gewichtet werden. Aus der Summe dieser Punktwerte ergibt sich der PCI, deren maximaler Wert 39 beträgt. Auch erlaubt dieser Index unter Berücksichtigung weiterer Parameter eine grobe Einschätzung der Wahrscheinlichkeit, mit der operative Tumorfreiheit erlangt werden kann (Lampe et al., 2015).

Des Weiteren wurde auch unterschieden, ob bei der Operation eine günstige oder ungünstige Tumorverteilung vorlag - als ungünstig wurde mitunter ein Befall des Dünndarms gewertet. Darüber hinaus wurde festgehalten, wo etwaige postoperative Tumorresiduen im zutreffenden Fall lokalisiert waren (inkl. deren Ausmaße, falls vorhanden), ob die Operation die Herstellung einer Darmanastomose erforderte, und ob die Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation Lymphknotenmetastasen hatten und eine Lymphonodektomie durchgeführt wurde.

Sowohl der präoperative Score nach Klassifikation der American Society of Anesthesiologists (ASA-Score) als auch der Body Mass Index (BMI) wurden ermittelt (Sakland, 1941).

Von weiterem Interesse war die postoperative Nachbehandlung. Einerseits wurde zwischen Patientinnen differenziert, die entweder keine oder eine platinhaltige Kombinationschemotherapie erhalten hatten; darüber hinaus wurde festgehalten, ob zusätzlich eine Erhaltungstherapie mit dem Angiogenesehemmer Bevacizumab durchgeführt wurde.

Es wurde sowohl das rezidivfreie als auch das Gesamtüberleben in Monaten ermittelt. Dafür wurde der Zeitraum vom Tag der Erstdiagnosestellung bis zum Auftreten des jeweiligen Ereignisses berechnet. Das Ende der Datenerhebung markiert der Stichmonat März 2022, sodass auch die Daten der Patientinnen, die bis zu einem späteren Zeitpunkt überleben, hinsichtlich des Datums des letzten Follow-Ups zensiert sind. Patientinnen, bei denen bis zu diesem Zeitpunkt keines der beiden Ereignisse eingetreten war, wurden als lebend und rezidivfrei dokumentiert.

Rezidive wurden mittels bildgebender Verfahren wie CT, PET/CT oder MRT, oder klinisch festgestellt.

Zur Weiterverfolgung der Patientinnen dienten dokumentierte Telefonate, Wiedereinbestellungen vor Ort, erneute Vorstellungen in der Klinik aus anderem Grund, oder Follow-Up-Formulare des nachbehandelnden niedergelassenen Gynäkologen.

Anhand der Pathologieberichte und -nummern wurden die entsprechenden Schnitte in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) der einzelnen Patientinnen nach der unten beschriebenen Vorgehensweise herausgesucht.

2.3 Immunhistochemische Färbung

2.3.1 Auswahl und Vorbereitung der Gewebeschnitte

Die Gewebelöcke wurden zum Zeitpunkt der Gewinnung zunächst mit 4 %-iger Formaldehydlösung fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet.

Die HE-Beispielschnitte der initial gewonnenen Gewebelöcke aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Material (FFPE) wurden aus dem Archiv des Pathologieinstituts des UKB herausgesucht – in den meisten Fällen waren es mehrere Präparate pro Patientin, unter denen nachfolgend mikroskopisch dasjenige Präparat bestimmt wurde, das den höchsten Anteil an TZs beinhaltete. Im Anschluss erfolgte mithilfe eines Mikrotoms aus dem jeweils korrelierenden Gewebelöcke die Anfertigung von vier bis sechs Leerschnitten pro Patientin in einer Dicke von 4 µm. Diese wurden im Anschluss auf Objektträger der Firma Menzel aufgezogen.

Zur Identifikation von falsch positiven bzw. falsch negativen Färbungen wurden FFPE-Schnitte mit einer Mischung der menschlichen Glioblastom- (U251MG) und Prostatakarzinomzelllinien (PC-3) verwendet. Während U251MG-Zellen NRP2 exprimieren, sind PC-3-Zellen negativ für selbiges Protein.

Vor Versuchsbeginn wurden alle Schnitte mit Bleistift mit dem entsprechenden Datum und dem zu verwendenden Antikörper beschriftet.

2.3.2 Entparaffinierung, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) und endogene Peroxidaseblockierung

Zur Entparaffinierung inkubierten die Schnitte für zehn Minuten in einer ersten Xylol-Lösung und für weitere zwei Minuten in einer zweiten Xylol-Lösung. Anschließend wurden sie für je zwei Minuten zur Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe in je 100 %-igem (zweimal), 96 %-igem, 70 %-igem und 50 %-igem Ethanol gewaschen. Es folgte die Spülung mit doppelt destilliertem Wasser.

Während der Formalinfixierung können quervernetzende Proteinstrukturen entstehen, die eine spätere Bindung des primären Antikörpers an die zu untersuchenden Epitope unterbinden können. Um eine Demaskierung dieser Epitope und dadurch verbesserte Bindung des primären Antikörpers zu erzielen, wurden die Schnitte nach HIER-Methode für 30 Minuten bei 90 °C in einem Dampfgerät mit Citratpuffer vorbehandelt.

Abschließend kühlten die Präparate für 30 Minuten bei Raumtemperatur aus und wurden danach erneut mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen.

Danach wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit einem Wachsstift umrandet, was im weiteren Versuchsverlauf der gleichmäßigen Bedeckung mit Reagenzien und Lösungen dienen soll und außerdem vor Austrocknung schützt.

2.3.3 Spezifische Färbung mit Primär- und Sekundärantikörper

Um das Chromogen in einem späteren Schritt durch eine an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP-POD) umzusetzen, wurde die endogene POD-Aktivität des zu färbenden Gewebes blockiert, sodass im weiteren Färbeprozess unspezifische Hintergrundfärbungen reduziert werden konnten. Dafür wurden pro Schnitt 200 µl einer POD-Blockierungslösung pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen.

Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte für 25 Minuten bei Raumtemperatur mit je 200 µl einer Lösung aus bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS geblockt.

Die immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von NRP2 bei HGSCs wurden allesamt mit dem ImmPRESS Horse Anti-Mouse IgG PLUS Polymer Kit durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine indirekte Nachweismethode, bei der zwei Antikörper verwendet werden: Nach Bindung eines spezifischen Primärantikörpers bindet ein Sekundärkörper, der über ein Polymer an viele PODs gekoppelt ist, an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. In einem dritten Schritt reagieren die PODs des Sekundärantikörpers unter Mitwirkung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) mit dem Chromogen ImmPact Nova Red und sorgen so für einen roten Farbumschlag (Abbildung (Abb.) 1).

Zur spezifischen Detektion von NRP2 wurde der Antikörper aNRP2-36v2 genutzt, der von aTyr Pharma in Kollaboration mit der Arbeitsgemeinschaft von Herrn PD Dr. med. Michael Muders, bis Juni 2022 am UKB beschäftigt, hergestellt wurde. Dieser bindet ausschließlich humanes NRP2, wie das Team mittels ELISA, Western Blotting und Biolayer Interferometrie nachwies, und stellt somit einen Vorteil gegenüber anderen kommerziellen Antikörpern für NRP2 dar, die das Glykoprotein mit geringerer Spezifität immunhistochemisch nachweisen (Abb. 1) (Förster et al., 2023).

aNRP2-36v2 wurde bei -20 °C gelagert und vor Verwendung auf Eis binnen 2-3 Stunden aufgetaut. Der Antikörper wurde in BSA/PBS-Lösung verdünnt; die finale Konzentration dieses Antikörpers für die Färbung betrug 5 µg/ml. Pro Schnitt wurden 175 µl der Mischung aus aNRP2-36v2 in BSA/PBS im genannten Verhältnis aufgetragen, schließlich wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 60 Minuten in einem Feuchtigkeitsbehälter inkubiert, um sie vor Austrocknung zu schützen.

Die Proben wurden erneut mit PBS gewaschen, um die Reste der Antikörperlösung zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper über 30 Minuten mit dem ImmPRESS Horse Anti-Mouse IgG PLUS Polymer Reagent mit 175 µl pro Slide bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper dieses Kits ist an ein Polymer gekoppelt, das seinerseits mit vielen PODs beladen ist. Diese reagieren im anschließenden Schritt mit dem Chromogen und produzieren so ein Farbsignal. Die indirekte Kopplung des Sekundärantikörpers an mehrere PODs führt dazu, dass im

Endeffekt ein Farbsignal mit höherer Intensität erzeugt wird, als es bei Kopplung mit nur einer POD der Fall wäre.

Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte erneut mit PBS gespült.

2.3.4 Entwicklung mit Chromogen, Gegenfärbung und Dehydrierung

Zunächst wurden die vier unterschiedlichen Reagenzien des Chromogens Impact Nova Red-Kits nach Angaben des Herstellers in der mitgelieferten Verdünnungslösung gemischt.

Anschließend wurden je nach Schnittgröße zwei bis drei Tropfen des Chromogens auf den Objektträger aufgetragen und für sieben Minuten inkubiert, bevor der Färbevorgang mit Leitungswasser abgestoppt wurde (Abb. 1).

Nachdem die Präparate in destilliertem Wasser gewaschen wurden, erfolgte die Gegenfärbung für 10 Sekunden mit Hämalaunlösung nach Mayer.

Für weitere zehn Minuten wurden die Slides mit lauwarmem Leitungswasser gespült und nachfolgend in einen Behälter befüllt mit destilliertem Wasser gestellt.

Abschließend wurden die gefärbten Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und am Schluss nochmals für zehn Minuten in Xylol inkubiert, bevor sie mithilfe eines Eindeckelmediums fertiggestellt wurden.

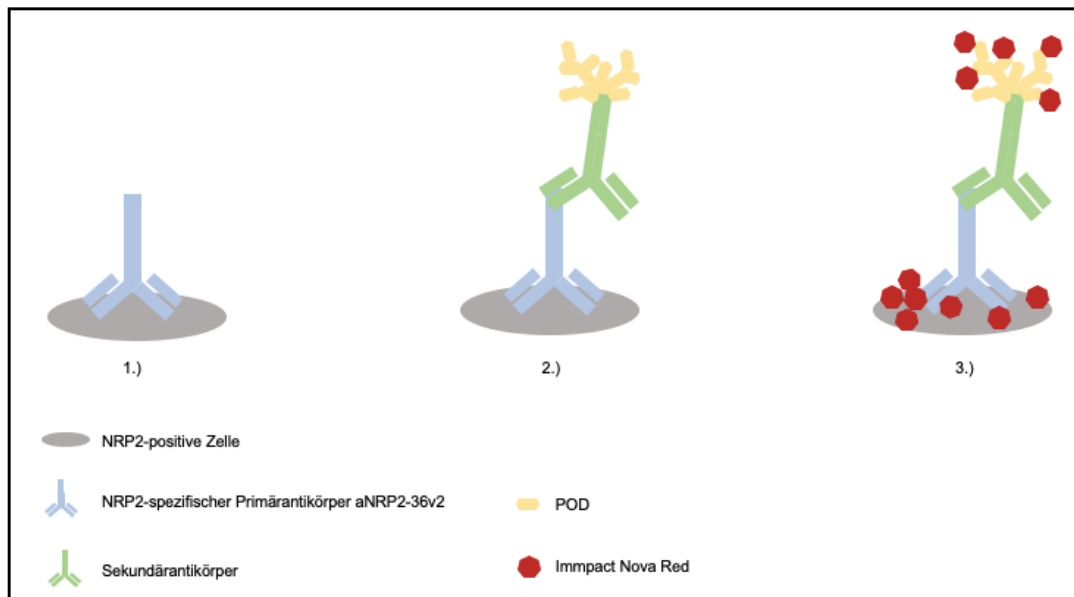


Abb. 1: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung

Der Sekundärantikörper ist an viele PODs gekoppelt und bindet an den NRP2-spezifischen Primärantikörper aNRP2-36v2. Die PODs bewirken unter Reaktion mit dem Chromogen Impact Nova Red den roten Farbumschlag der Zelle. Abb. nach Vector Laboratories (2024). POD: Peroxidase. NRP2: Neuropilin 2.

2.3.5 Qualitätskontrolle: Positiv- und Negativkontrollen

Als Positivkontrolle dienten NRP2-positive Präparate der Zellreihe U251MG. Sie durchliefen den immunhistochemischen Färbeprozess wie vorher beschrieben parallel mit den Ovarialkarzinomschnitten und wurden ebenfalls mit dem Primärantikörper aNRP2-36v2 angefärbt.

Als Negativkontrollen dienten die jeweils entsprechenden Schnittpräparate, die anstelle von aNRP2-36v2 mit der von aTyrPharma bereitgestellten Isotypkontrolle NBIC inkubiert wurden. Zusätzlich wurde ein Mischpräparat aus den beiden Zellreihen U251MG und PC3 mit NBIC zum Negativnachweis angefärbt. Für die Negativkontrollen wurde NBIC auf 15 µg/ml in der BSA/PBS-Lösung verdünnt. Anschließend inkubierten die Schnitte ebenfalls für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Proben der Negativkontrolle folgten in allen übrigen Schritten dem bereits erläuterten Färbeprotokoll und unterschieden sich lediglich durch den Primärantikörper.

2.3.6 Reagenzien, Detektionssysteme, Materialien und Geräte

Die Tab. 4 bis 9 führen sämtliche Materialien, Substanzen und Reagenzien auf, die zur Durchführung der immunhistochemischen Färbungen genutzt wurden.

Tab. 4: Verwendete Reagenzien und Substanzen

Reagenz	Herstellerinformation
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 (Dako REAL, 202386-2)
Xylol	-

Tab. 5: Verwendete Kits

Kit	Herstellerinformation
Impact Nova Red	ImmPACT NovaRED Substrate Kit, HRP (Vector Laboratories, SK-4805)
Impress HRP Horse Anti-Mouse IgG Polymer Reagent	ImmPRESS HRP Horse Anti-Mouse IgG PLUS Polymer Kit (Vector Laboratories, MP-7802)

Tab. 6: Verwendete Puffersysteme und Lösungen

Puffer	Verdünnung	Herstellerinformation
BSA/PBS	0,05 g BSA auf 1 ml PBS	Albumin Fraktion V, Blotting grade für die Immunelektrophorese, pH 7,0 (Neofroxx, 9048-46-8)
		Phosphate Buffered Saline, pH 7.4 (Gibco, 10010-015)
Citratpuffer	1:10 Verdünnung der Target Retrieval Solution	Target Retrieval Solution, Citrate pH 6, x10 (Agilent/Dako, S236984-2)
		Doppelt destilliertes Wasser

Tab. 7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herstellerinformation
aNRP2-36v2	5 µg/ml in BSA/PBS	aNRP2-36v2 (aTyr Pharma)
NBIC	15 µg/ml in BSA/PBS	NBIC (aTyr Pharma)

Tab. 8: Verwendete Materialien

Material	Herstellerinformation
Objektträger Superfrost Plus	Gerhard Menzel, Braunschweig, DE
Pasteurpipetten	Labomedic, Bonn
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen ohne Filter	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AT)
Präparatekleber	Eukitt Quick-hardening mounting medium (Sigma-Aldrich Merck, 03989)
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Wachsstift	Dako Pen (Agilent Dako, 237-S200230)

Tab. 9: Verwendete Geräte

Gerät	Herstellerinformation
Autoklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloß, DE
Dampfgarer	Russel-Hobbs, Failsworth, GB
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Bulle, CH
Kühlschrank	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

2.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde ein Lichtmikroskop von Olympus des Typs BX45 mit 40- bis 400-facher Gesamtvergrößerung genutzt. Präparatausschnitte wurden mithilfe verschiedener Geräte fotografiert: Verwendet wurden die Digitalkamera des Mikroskops, ein Präparatscanner und eine externe Kamera. Die Software Patho Zoom ermöglichte den Computerzugriff auf die eingescannten Präparate.

Zunächst wurde evaluiert, ob das Präparat NRP2-positiv gefärbte TZs aufwies (Tab. 11A). Es wurde unterschieden zwischen der Anfärbung gar keiner bzw. weniger TZs (<10 positive TZs pro Präparat) und der Anfärbung vieler TZs (≥ 10 positive TZs pro Präparat). Genauer wurde dann geschätzt, wie groß in etwa der prozentuale Anteil positiv gefärbter TZs unter allen TZs des Präparates war (Tab. 11C und 11H). Es wurde 1 (<10 positive TZs) von 2 (<5 % positive TZs) von 3 (5-10 % positive TZs) abgegrenzt. Oberhalb der 10 %-Grenze wurde in Zehnerschritten vorgegangen (z.B.: 4 = 20 % positive TZs, 5 = 30 % positive TZs etc.). In der statistischen Auswertung wurden dann folgende Gruppen einander gegenübergestellt: keine Anfärbung, <10 % / ≤ 40 % / ≤ 70 % / >70 % der TZ positiv (Tab. 11H). Weiter wurde ein relativer Anteil von ≤ 50 % mit einem Anteil von >50 % positiver TZs verglichen (Tab. 11C).

Darüber hinaus wurde in Anlehnung an die „Hot Spot Methode“ bei 400-facher Objektivvergrößerung das Gesichtsfeld pro Präparat bestimmt, das den höchsten prozentualen Anteil positiv gefärbter TZs besaß (Jang et al., 2017). Innerhalb dieses Gesichtsfelds wurde dann nochmal der prozentuale Anteil NRP2-positiver TZs unter allen TZs des Gesichtsfelds bestimmt. Dieser Anteil wurde bis auf Fünferschritte genau geschätzt. Statistisch wurde ein relativer Anteil von ≤ 50 % mit einem solchen von >50 % verglichen (Tab. 11G).

Zur Erfassung des immunreaktiven Scores nach Remmele (IRS), der ursprünglich der Rezeptorklassifikation von Mammatumoren diente, wurde das Produkt aus dem Farbtintensitätsscore und dem Punktescore des prozentualen Anteils positiv gefärbter TZs je Gewebeschnitt berechnet (Tab. 10) (Remmele et al., 1986). Die Farbtintensität (SI = staining intensity) wurde in nicht vorhanden (wenn gar keine Färbung), schwach, mäßig und stark unterteilt. Ausschlaggebend war nicht die durchschnittliche SI des Präparats, sondern die maximal zu messende SI innerhalb eines solchen. Statistisch wurden alle vier Abstufungen einander gegenüber gestellt (Tab. 11B). Zudem erfolgte der Vergleich zwischen einem IRS von 0-1 und einem IRS von 2-3 (Tab. 11D).

Tab. 10: Immunreaktiver Score nach Remmele (IRS)

Der IRS setzt sich aus dem Prozentanteil positiv gefärbter TZs und ihrer SI zusammen. Pro Kategorie kann ein Punktescore zwischen 0 und 3, bzw. 0 und 4 erreicht werden. Der IRS berechnet sich aus dem Produkt beider Scores (Remmele et al., 1986).

Relativer Anteil positiv gefärbter TZs	Punktescore
0 %	0
<10 %	1
10-50 %	2
51-80 %	3
>80 %	4
SI	Punktescore
Keine Färbung	0
Schwach	1
Mäßig	2
Stark	3
SI x Relativer Anteil positiv gefärbter TZs	IRS
0-1	0
2-3	1
4-8	2
9-12	3

Außerdem wurde beschrieben, wenn aNRP2-36v2 abgesehen von TZs noch andere Zellen anfärbte. Lymphozyten lassen sich mikroskopisch gut von TZs abgrenzen und wurden gesondert aufgeführt (Tab. 11F). Alle weiteren NRP2-positiven Zellen, die weder mit Sicherheit der Gruppe der TZs noch der Gruppe der Lymphozyten zugeordnet werden konnten, wurden als „unbekannte Zellen“ aufgeführt.

Die Auswertungskriterien der NRP-2 Färbung sind Tab. 11 zu entnehmen.

Tab. 11: Auswertungskriterien der NRP2-Färbung

Dargestellt sind die verschiedenen Auswertungskriterien zur Analyse der NRP2-Färbung.

Auswertungskriterium	Subkategorie				
A) NRP2-Positivität von TZs allgemein	Keine / wenige TZ (<10) positiv	Viele TZ (≥10) positiv			
B) SI der NRP2-Färbung	Keine Färbung = 0	Schwach = 1	Mittelstark = 2	Stark = 3	
C) Relativer Anteil NRP2-positiver TZs	≤50 %	>50 %			
D) IRS (SI x relativer NRP2-positiver TZ-Anteil)	0-1	2-3			
E) NRP2-Positivität von TZ-Kernen	TZ-Kerne positiv	TZ-Kerne negativ	Keine Färbung		
F) NRP2-Positivität von Lymphozyten	Ja	Nein			
G) Relativer Anteil NRP2-positiver TZs pro Gesichtsfeld (40x)	≤50 %	>50 %			
H) Relativer Anteil NRP2-positiver TZs, kleinschrittig	Keine	<10 %	≤40 %	≤70 %	>70 %

2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Minitab, Version 18 (Minitab LLC., State College Pennsylvania USA) genutzt. Mithilfe der Spearman-Korrelation wurde geprüft, ob ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der NRP2-Expression in Ovarialkarzinomzellen und dem PCI, dem FIGO-Stadium, der Tumorverteilung oder der postoperativen Tumorlast besteht. Um zu untersuchen, ob die NRP2-Expression bei

HGSCs einen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben bzw. das Gesamtüberleben der Patientinnen hat, wurde der Logrank-Test durchgeführt. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Initiale Kohorte

Abb. 2 führt alle Patientengruppen des initialen Kollektivs auf, deren Daten im Zuge dieser Arbeit zwar ermittelt wurden, die jedoch aus den aufgeführten Gründen keinen Bestandteil des zu untersuchenden, endgültigen Kollektivs bilden würden.

Die Einschlusskriterien des endgültigen Kollektivs beinhalteten u.a. das Vorliegen eines HGSC, weshalb solche Gruppen, die Differentialdiagnosen dieser Tumorentität darstellten, aus der Kohorte ausgeschlossen wurden (135 Patientinnen).

Darüber hinaus stand bei 89 der 400 Patientinnen kein verwertbares Tumorgewebe zur Verfügung. Es ließ sich bspw. in einigen Fällen in den Gewebeproben kein Tumor nachweisen. Mögliche Gründe hierfür waren, dass die Biopsien der diagnostischen Laparoskopie nicht verwertbar waren, oder dass das Gewebe mittels neoadjuvanter Chemotherapie vorbehandelt worden war.

Insgesamt erfüllten 176 der anfänglich 400 Patientinnen die Einschlusskriterien für dieses Projekt: Bei allen lag ein HGSC mit verwertbarem Tumorgewebe zur immunhistochemischen Analyse vor. Sie bildeten die zu untersuchende, endgültige Kohorte dieser Arbeit. Abb. 2 veranschaulicht den Auswahlprozess bis zur finalen Kohorte.

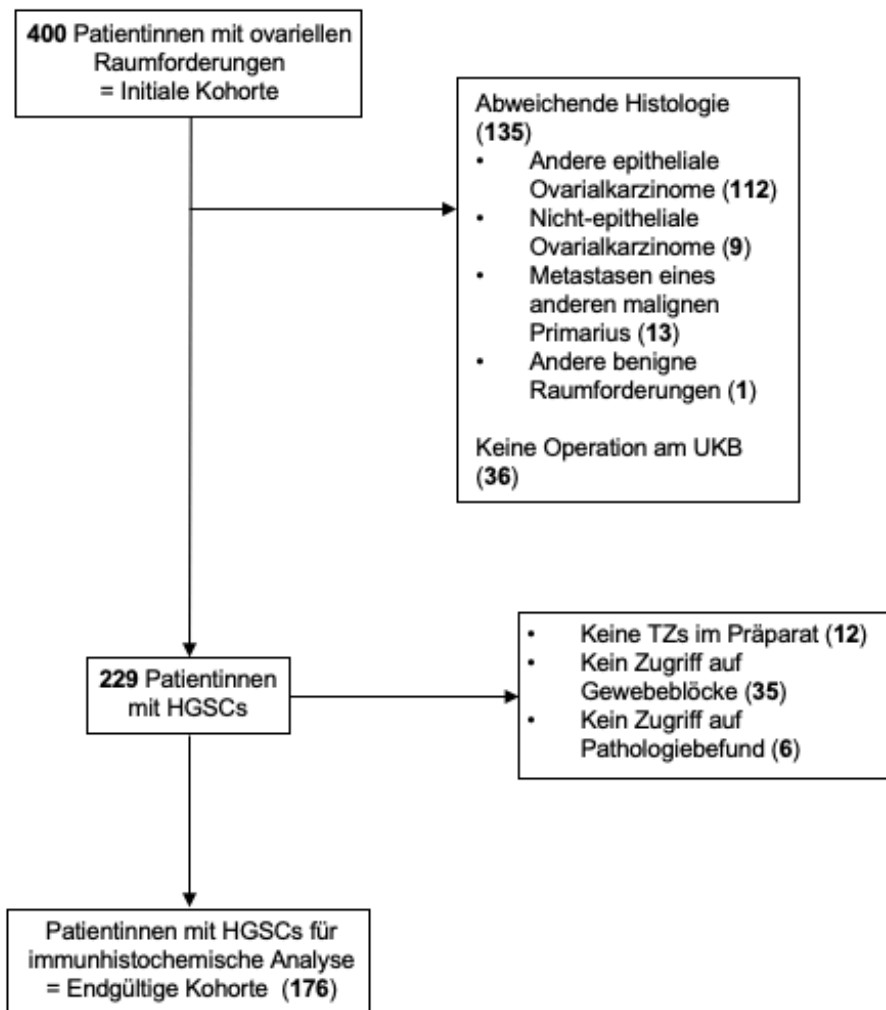


Abb. 2: Bildung der endgültigen Kohorte

HGSC: High-grade seröses Ovarialkarzinom. TZ: Tumorzelle. UKB: Universitätsklinikum Bonn.

3.2 Beschreibung der endgültigen Kohorte

3.2.1 Epidemiologische Daten

Die Kohorte umfasste 176 Patientinnen im Alter von 16 bis 83 Jahren. Im Mittel betrug das Alter bei Erstdiagnose 61,8 Jahre (Abb. 3).

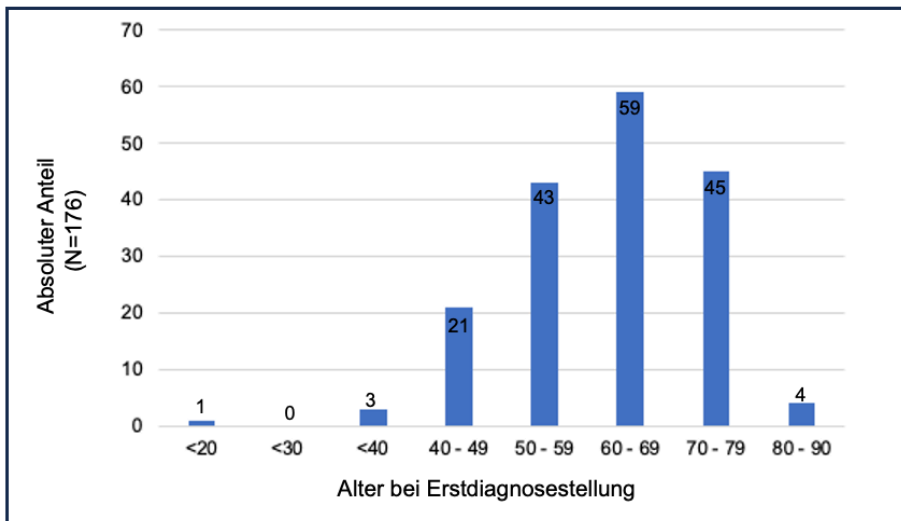


Abb. 3: Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnosestellung

Weiter erfolgte die Erhebung des präoperativen BMIs und ASA-Scores. Demnach waren 42 % der Patientinnen im Bereich des Normalgewichts und insgesamt 53,5 % übergewichtig bzw. adipös. Die meisten Patientinnen hatten einen ASA-Score von 2 (Abb. 4).

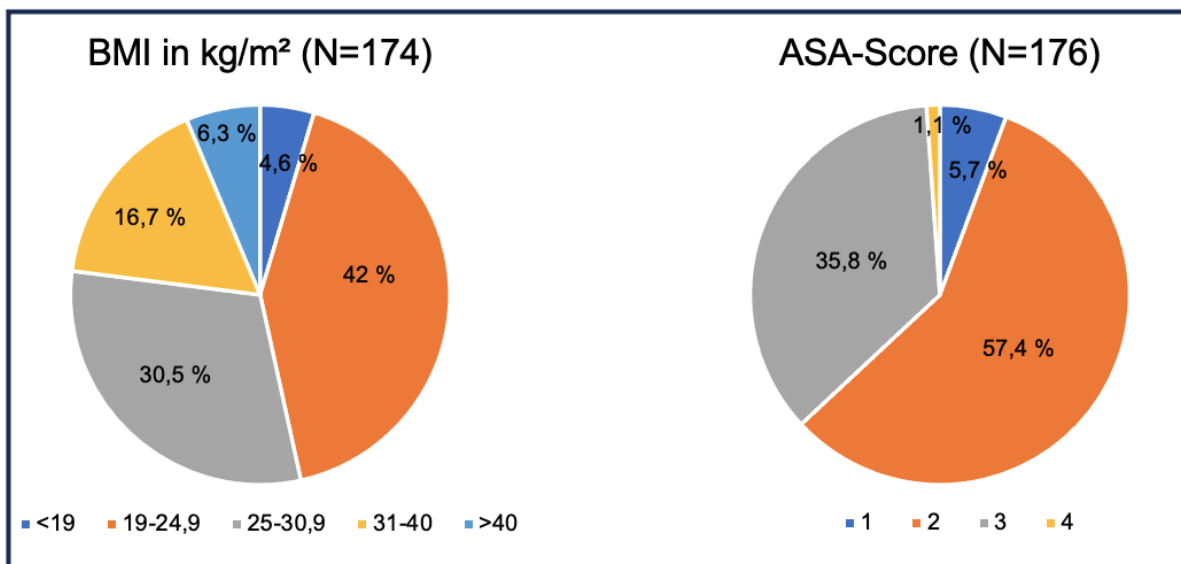


Abb. 4: BMI und ASA-Score zum Zeitpunkt der Hauptoperation

BMI: Body Mass Index. ASA-Score: Klassifikation der American Society of Anesthesiologists.

3.2.2 Unterteilung der Kohorte nach FIGO-Stadien

Anfang des Jahres 2014 wurde eine überarbeitete Version der FIGO-Klassifikation publiziert, in der die einzelnen Stadien zum Teil noch detaillierter aufgeschlüsselt bzw. anders kategorisiert wurden als in der älteren Fassung von 1989 (Shepherd, 1989; Prat, 2014). Da insgesamt 110 Patientinnen, also über die Hälfte der aus 176 Patientinnen bestehenden Kohorte, ihre Erstdiagnose nach Anfang des Jahres 2014 erhielten, orientiert sich die in dieser Arbeit verwendete FIGO-Klassifikation an der überarbeiteten Version des Klassifikationssystems von 2014. Die FIGO-Stadien der Patientinnen, deren Diagnose vor 2014 nach der älteren Klassifikation gestellt wurden, wurden entsprechend der aktuellen Version angepasst. Tab. 12 ordnet die Patientinnen der untersuchten Kohorte nach den im Jahr 2014 definierten FIGO-Stadien. Bei der Berechnung der relativen Anteile wurde in allen nachfolgenden Tabellen auf die erste Nachkommastelle gerundet.

Tab. 12: Unterteilung der Kohorte nach FIGO-Stadien

Die Einteilung richtet sich nach der aktuellen Klassifikation von Prat (2014).

FIGO-Stadium (N=176)	Anzahl (%)
IA	4 (2,3)
IB	2 (1,1)
IC	4 (2,3)
IIA	4 (2,3)
IIB	6 (3,4)
IIIA	14 (8)
IIIB	10 (5,7)
IIIC	111 (63,1)
IVA	17 (9,7)
IVB	4 (2,3)

3.2.3 Operation

Es wurde unterschieden, ob es sich um die Operation eines erstmalig diagnostizierten Karzinoms, oder diejenige eines Erst- bzw. Zweitrezidivs handelte (Abb. 5).

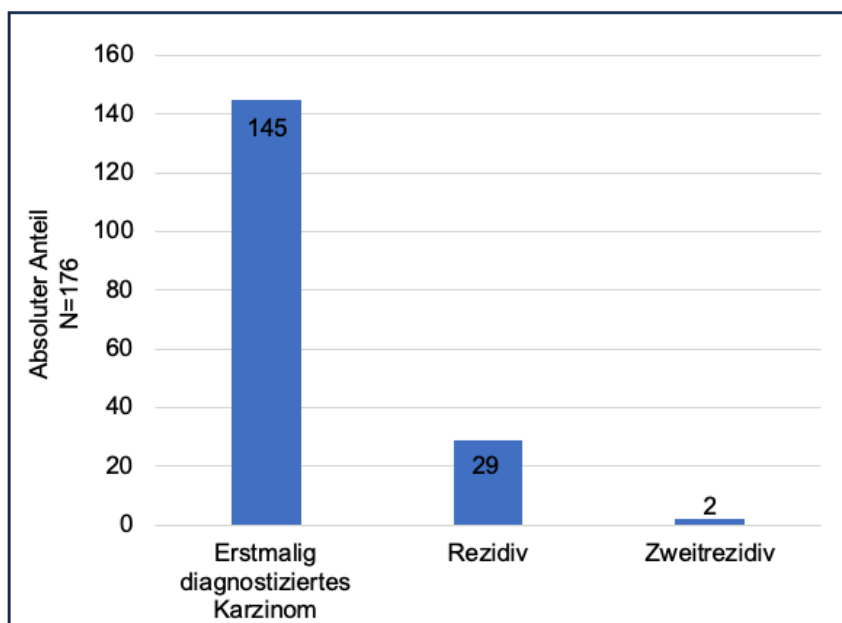


Abb. 5: Entität der zu operierenden Raumforderung

In den meisten Fällen handelte es sich bei der Hauptoperation um die Operation eines erstmalig diagnostizierten HGSC. Teilweise handelte es sich aber auch um Erst- bzw. Zweitrezidive.

Weiter wurden sämtliche Daten der Längsschnittlaparotomie erhoben, die sowohl dem definitiven Staging als auch der Therapie des Ovarialkarzinoms dient (Tab. 13). Das operative Vorgehen wurde in der Einleitung bereits detailliert erläutert.

Einzelfälle rechtfertigen ein vom Leitlinienprogramm (2022) abweichendes Vorgehen im Sinne einer diagnostischen Laparoskopie bzw. einer neoadjuvanten Chemotherapie. In wenigen Fällen war die genaue Größe des verbleibenden Resttumors nicht im Operationsbericht vermerkt und wurde somit als “unbekannt” aufgeführt.

Bei der Operation des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms wurden bis 2019 basierend auf den Empfehlungen des Leitlinienprogramms Onkologie (2022) auch makroskopisch unauffällige Lymphknoten der pelvinen und paraaortalen Regionen standartmäßig entfernt. Nach Publikation der randomisierten LION-Studie von Harter et al. im Februar 2019 wurde am UKB auf genanntes Vorgehen weitestgehend verzichtet, da sich weder ein Vorteil des krankheitsfreien bzw. des Gesamtüberlebens in der Interventionsgruppe beobachten ließ. Ferner war die Lymphonodektomie bei unauffälligem Befund mit einem erhöhten Risiko für postoperative Komplikationen assoziiert, und es konnte sogar ein

Überlebensvorteil von vier Monaten in der Kontrollgruppe verzeichnet werden (Harter et al., 2019).

Tab. 13: Im Rahmen der Hauptoperation erhobene Parameter
Übersicht der klinischen Parameter, die peri- bzw. intraoperativ erhoben wurden. „Nx“ bedeutet, dass der Lymphknotenstatus nicht bekannt ist. Der ASA-Score quantifiziert das perioperative Operationsrisiko.

	Anzahl (%)
Laparoskopische Diagnosesicherung (N=176)	
Ja	104 (59,1)
Nein	72 (40,9)
Darmanastomose (N=176)	
Keine	83 (47,2)
Rektosigmoid	43 (24,4)
Mehrere Anastomosen	30 (17)
Kolon	14 (8)
Dünndarm	5 (2,8)
Ileozökalpol	1 (0,6)
Lymphknotenmetastasen (N=176)	
Pelvin	72 (40,9)
Keine	51 (29)
Nx	34 (19,3)
Paraaortal	12 (6,8)
Pelvin und paraaortal	4 (2,3)
Axillär und supraclavikulär	3 (1,7)
Lymphonodektomie (N=176)	
Pelvin und paraaortal	103 (58,5)
Keine	73 (41,5)
Tumorverteilung (N=176)	
Unterbauch, beide Zwerchfellseiten und Dünndarmmesenterium	90 (51,1)
Unterbauch	49 (27,8)
Unterbauch und rechte Zwerchfellseite	22 (12,5)
Unterbauch und beide Zwerchfellseiten	15 (8,5)
Größe Resttumor (N=176)	
Kein Resttumor	115 (65,3)
<5mm	21 (11,9)
<1 cm	16 (9,1)
≥1 cm	12 (6,8)
Unbekannt	7 (4)
1mm	5 (2,8)
Lokalisation Resttumor (N=176)	
Kein Resttumor	115 (65,3)
Dünndarmmesenterium	22 (12,5)
Dünn- oder Dickdarm	17 (9,7)
Diffuse Ausbreitung im Situs	9 (5,1)
Leber und Leberpforte	4 (2,3)
Zwerchfell	4 (2,3)

	Anzahl (%)
Mesokolon	2 (1,1)
Retroperitoneum	2 (1,1)
Arteria mesenterica und Pankreas	1 (0,6)

Darüber hinaus wurde der PCI erhoben. In Abb. 6 wurden Gruppen von Fünferschritten gebildet und deren Häufigkeit innerhalb der Kohorte visualisiert. Die Indices der meisten Patientinnen befinden sich in der Gruppe mit einem PCI von 11-15.

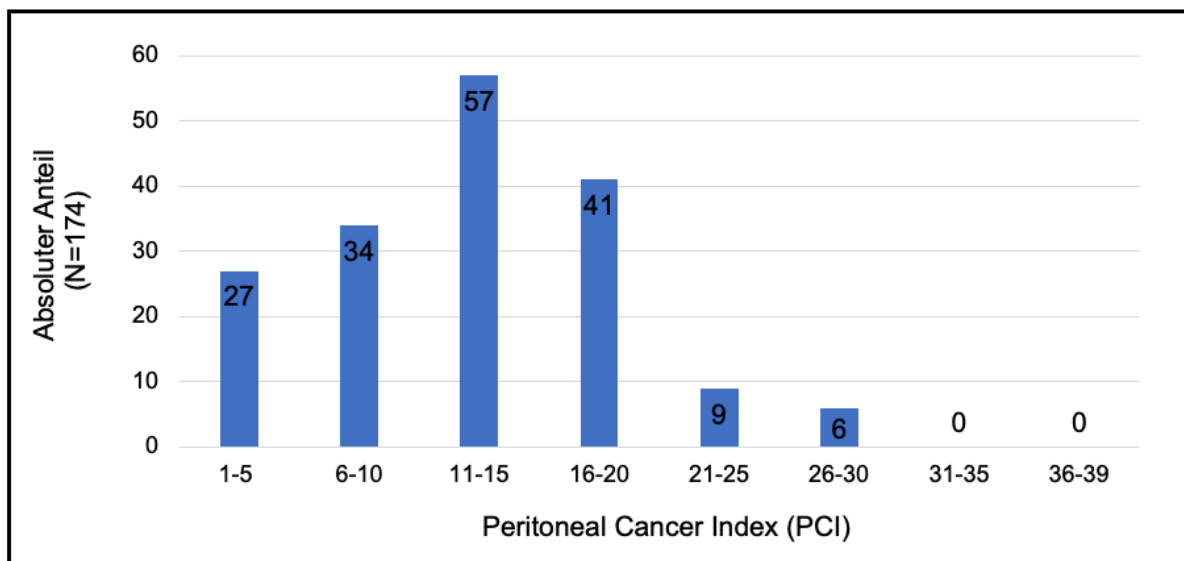


Abb. 6: Peritoneal Cancer Index (PCI)

Der PCI beträgt maximal 39 und quantifiziert das Ausmaß peritonealer Karzinose. Im Diagramm wurden Gruppen von Fünferschritten gebildet und die PCIs der Patientinnen entsprechend zugeordnet.

3.2.4 Überlebenszeitanalyse

Im Rahmen der klinischen Datenerhebung wurden die beiden Ereignisse „Rezidiv“ und „Tod“ während des Beobachtungszeitraums, der im März 2022 ende, erfasst. Es wurde das Auftreten in Monaten seit der Erstdiagnosestellung bis zum Auftreten des jeweiligen Ereignisses berechnet.

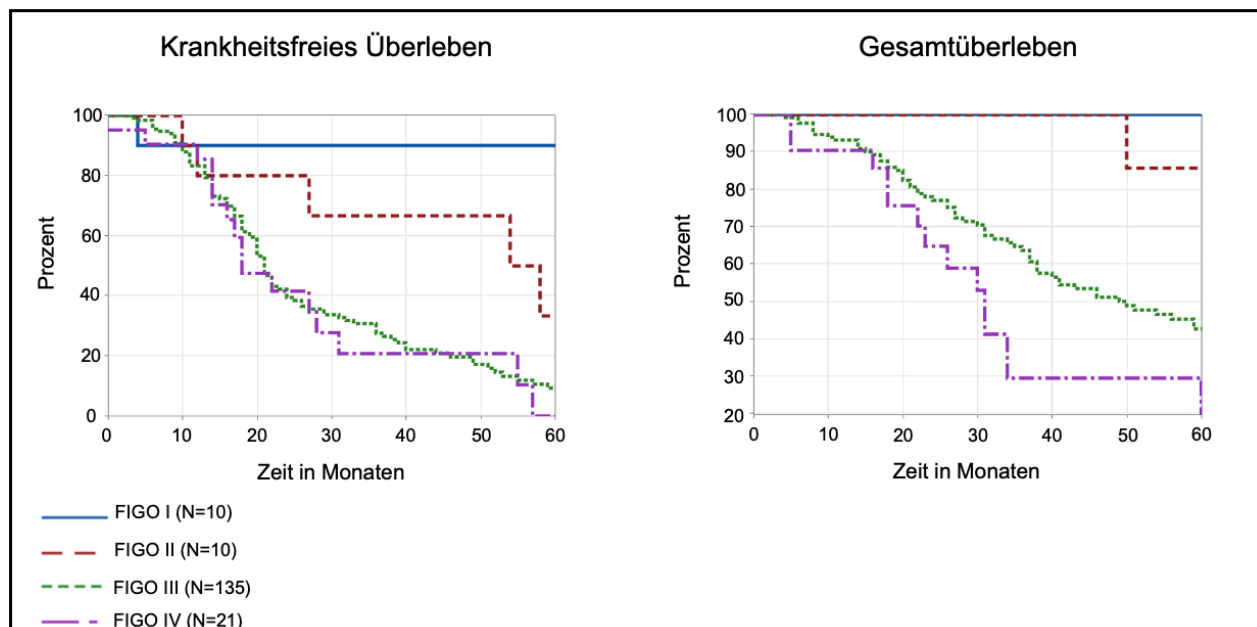
71 % der Patientinnen erlitten nach durchschnittlich 23,8 Monaten ein Rezidiv. Genau die Hälfte aller Patientinnen verstarb während des Beobachtungszeitraums nach durchschnittlich 35,4 Monaten (Tab. 14).

Tab. 14: Rezidiv und Tod im Beobachtungszeitraum

Berechnet wurde der Zeitraum in Monaten von der Erstdiagnosestellung bis zum Eintreten des jeweiligen Ereignisses (Rezidiv, Tod).

Ereignis (Beobachtungszeitraum: 01/2010 – 03/2022)	Ereignis eingetreten (ja vs. nein)	Anzahl (%)	Mittlere Dauer bis zum Aufreten des Ereignisses (Monate)
Rezidiv (N=176)	ja	125 (71)	23,8
	nein	51 (29)	-
Tod (N=176)	ja	88 (50)	35,4
	nein	88 (50)	-

Es wurden Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie und das Gesamtüberleben erstellt, die die Zeit bis zum Auftreten des jeweiligen Ereignisses in Monaten visualisieren. Die Kohorte wurde dafür in FIGO-Stadien aufgeschlüsselt. Aus den Kurven lassen sich die absoluten 5-Jahres-Überlebensraten ablesen. Sowohl das krankheitsfreie als auch das Gesamtüberleben nehmen mit zunehmendem FIGO-Stadium ab (Abb. 7).

**Abb. 7:** Kaplan-Meier-Kurven

Das krankheitsfreie und das Gesamtüberleben wurden nach den FIGO-Stadien I bis IV aufgeschlüsselt. Es lässt sich jeweils die absolute 5-Jahres-Überlebensrate aus den Kurven ablesen. Mit ansteigendem FIGO-Stadium nehmen sowohl das krankheitsfreie als auch das Gesamtüberleben ab.

3.2.5 Systemtherapie

Die Systemtherapie der 176 Patientinnen ist in Tab. 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Systemtherapie

	Anzahl (%)
Neoadjuvante Chemotherapie (N=176)	
Ja	77 (43,8)
Nein	99 (56,3)
Adjuvante Chemotherapie (N=176)	
Ja	165 (93,8)
Nein	11 (6,3)
Bevacizumab (N=176)	
Ja	81 (46)
Nein	95 (54)

3.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung

3.3.1 Überblick

Es wurden verschiedene Auswertungsschemata zur Bestimmung des NRP2-positiven TZ-Anteils pro Präparat genutzt. 44,3% der Präparate wiesen einen erhöhten NRP2-positiven TZ-Anteil (≥ 10 positive TZs) auf. 27,8 % der Präparate hatten einen IRS von 1, 22,2 % hatten einen IRS von 2, und 11,9 % hatten einen IRS von 3. Bei 13,6 % der Präparate ließ sich NRP2 immunhistochemisch im Zellkern nachweisen. Tumorumgebende Lymphozyten zeigten bei 27,3 % der Präparate ein NRP2-Signal (Tab. 16).

Tab. 16: Expression von NRP2 bei HGSCs

Das Vorkommen von TZs innerhalb eines Präparats wurde zunächst anhand der jeweiligen HE-Schnitte validiert. Nach immunhistochemischer Anfärbung erfolgte die Auswertung mithilfe verschiedener Schemata.

	Kategorien	Anzahl (%)	Kommentar zur statistischen Auswertung
A) NRP2-Positivität von TZs allgemein (N=176)			
	Keine TZs pos.	59 (33,5)	Keine/wenige (<10) TZs positiv vs. viele (≥10) TZs positiv
	Wenige TZs (<10) pos.	39 (22,2)	
	Viele TZs (≥10) pos.	78 (44,3)	
B) SI der NRP2-Färbung (N=176)			
	Keine Färbung = 0	59 (33,5)	Alle Gruppen wurden miteinander verglichen
	Schwach = 1	29 (16,5)	
	Mäßig = 2	38 (21,6)	
	Stark = 3	50 (28,4)	
C) Relativer Anteil NRP2-positiver TZs (N=176)			
	≤50 %	134 (76,1)	Präparate mit ≤50 % positiven TZs vs. Präparate mit >50 % positiven TZs
	>50 %	42 (23,9)	
D) IRS (SI x relativer NRP2-positiver TZ-Anteil) (N=176)			
Interpretation IRS: 0-1 Punkte = 0 2-3 Punkte = 1 4-8 Punkte = 2 9-12 Punkte = 3	0	67 (38,1)	IRS = 0-1 vs. IRS = 2-3
	1	49 (27,8)	
	2	39 (22,2)	
	3	21 (11,9)	
E) NRP2-Positivität von TZ-Kernen (N=176)			
	TZ-Kerne positiv	24 (13,6)	Keine NRP2-Färbung vs. Zellkerne negativ vs. Zellkerne positiv
	Keine NRP2-Färbung	59 (33,5)	
	TZ-Kerne negativ	93 (52,8)	

	Kategorien	Anzahl (%)	Kommentar zur statistischen Auswertung
F) NRP2-Positivität von Lymphozyten (N=176)			
	Ja	48 (27,3)	
	Nein	128 (72,7)	
G) Relativer Anteil NRP2-positiver TZ pro Gesichtsfeld (40x) (N=176)			
	≤50 %	90 (51,1)	Anteil positiver TZs pro Gesichtsfeld bei 40x. Hierfür wurde das Gesichtsfeld im Präparat gewählt, das die höchste Dichte NRP2-positiver TZs aufwies.
	>50 %	86 (48,9)	
H) Relativer Anteil NRP2-positiver TZs, kleinschrittig (N=176)			
	Keine	59 (33,5)	Alle Gruppen wurden miteinander verglichen
	≤10 %	39 (22,2)	
	≤40 %	28 (15,9)	
	≤70 %	26 (14,8)	
	>70 %	24 (13,6)	

In Tab. 17 wurden die NRP2-positiven Präparate nach FIGO-Stadien aufgeschlüsselt, wobei nur Präparate mit einer Anzahl von ≥ 10 NRP2-positiven TZs berücksichtigt wurden. Unterteilt man die Stadien in die beiden Gruppen „FIGO I – IIIB“ und „FIGO IIIC - IV“, so lässt sich für die früheren Stadien ein leicht erhöhter Mittelwert für den relativen Anteil NRP2-positiver Präparate berechnen (51,4 % vs. 46,5 %).

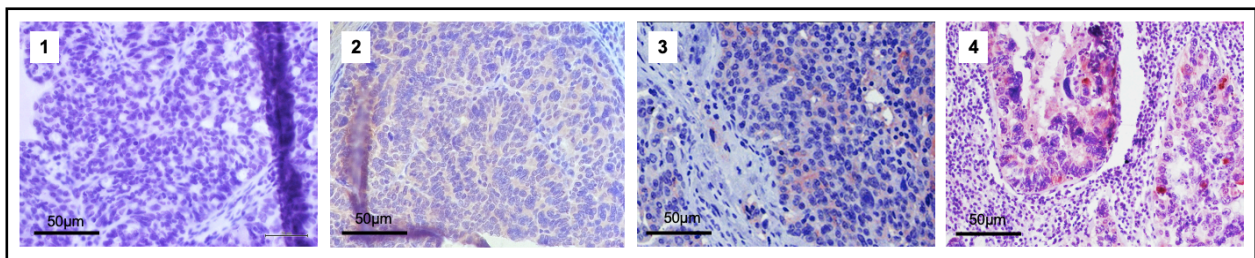
Tab. 17: NRP2-positive Präparate nach FIGO-Stadien

Nur Präparate mit ≥ 10 NRP2-positiven TZs wurden berücksichtigt. Das FIGO-Stadium II weist den höchsten prozentualen Anteil NRP2-positiver TZs auf.

NRP2-Positivität (≥ 10 TZs) nach FIGO-Stadien		Anzahl (%)
FIGO I (N=10)		5 (50)
FIGO II (N=10)		7 (70)
FIGO III (N=135)	A (N=14)	4 (28,6)
	B (N=10)	6 (60)
	C (N=111)	45 (40,5)
FIGO IV (N=21)		11 (52,4)

3.3.2 Fotos NRP2-positiver Präparate

Abb. 8 zeigt Beispiele der vier verschiedenen SIs von 0 bis 3. Die SI bildet gemeinsam mit dem Anteil NRP2-positiver TZs den IRS. Da verschiedene Kameras für die Aufnahmen genutzt wurden, weisen die Fotos der Präparate teilweise unterschiedliche Kontraste und Weißabgleiche auf.

**Abb. 8:** Beispiele verschiedener SIs

Die Bilder 1 bis 4 zeigen beispielhaft die verschiedenen SIs von 0 bis 3.

1: SI = 0. 2: SI = 1. 3: SI = 2. 4: SI = 3.

In Abb. 9 sind Bildausschnitte der immunhistochemischen Färbung dreier Präparate in unterschiedlichen Vergrößerungen dargestellt.

Für Abb. 9(1A) ergibt sich auf das gesamte Präparat bezogen bei einer SI von 3 und einem NRP2-positiven TZ-Anteil von mehr als 80 % ein IRS von 3. Zu erkennen ist u.a. eine NRP2-positive apoptotische TZ.

Für Abb. 9(2A) ergibt sich bei einer SI von 2 und einem NRP2-positiven TZ-Anteil von 50 % ein IRS von 2.

Bei dem in Abb. 9(3A) dargestellten Präparat zeigten mehr als 80 % aller TZs ein positives NRP2-Signal, die SI liegt bei 3, sodass der IRS 3 beträgt.

In allen in Abb. 9 dargestellten Präparaten war aNRP2-36v2 sowohl an der Zellmembran als auch im Zytoplasma und den Zellkernen zahlreicher TZs nachweisbar.

Der hier benannte prozentuale Anteil NRP2-positiver TZs bezieht sich jeweils auf das gesamte Präparat und nicht nur auf den in dieser Arbeit abgebildeten Bildausschnitt, welcher nur einen kleinen Teil des kompletten Präparats repräsentiert.

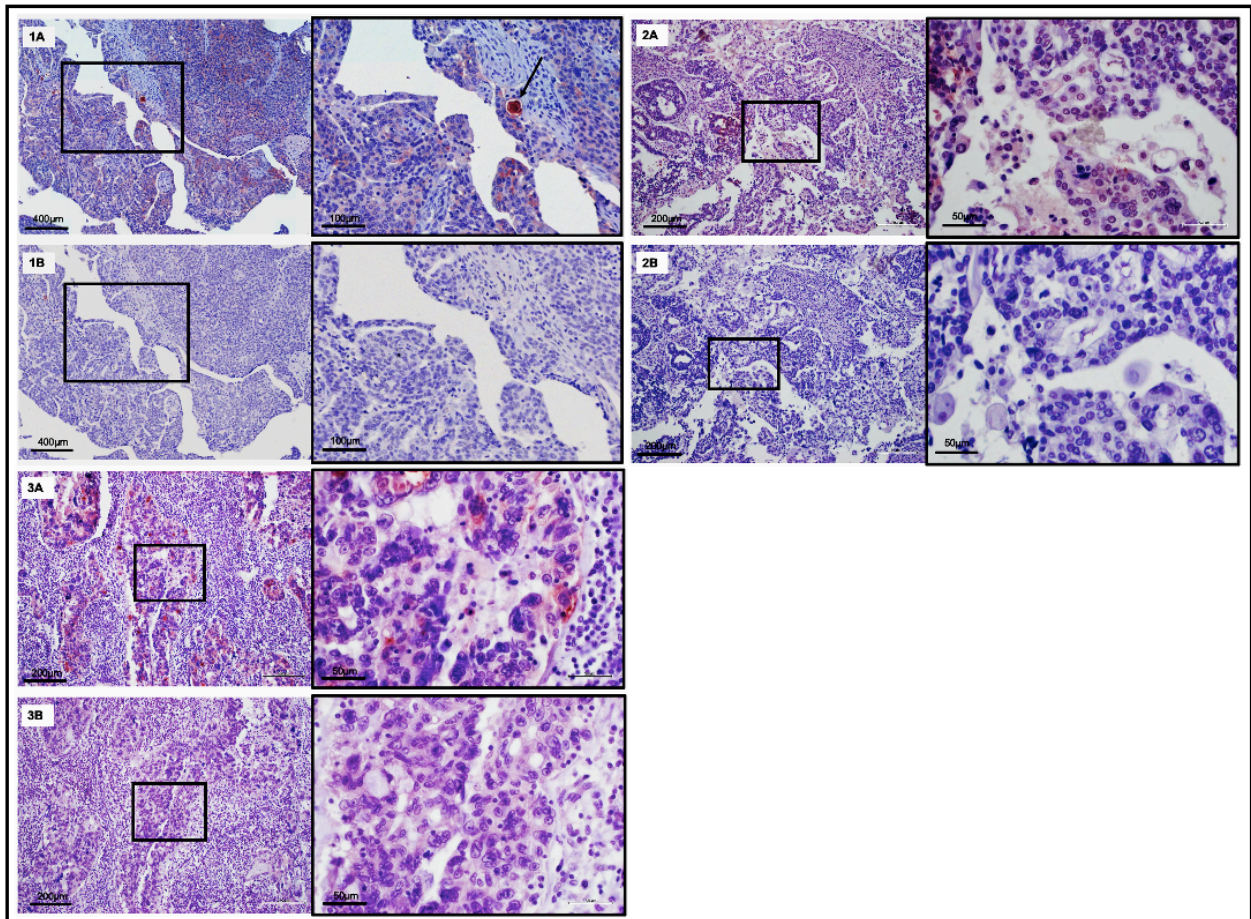


Abb. 9: Beispiele NRP2-positiver Präparate

1, 2 und 3 zeigen Bildausschnitte dreier verschiedener Präparate, in A erfolgte jeweils die immunhistochemische Färbung mit dem für NRP2 spezifischen Antikörper aNRP2-36v2, in B erfolgte jeweils die Färbung mit dem für NRP2 negativen Antikörper NBIC (Negativkontrolle). Der IRS wird aus der maximal zu messenden SI sowie dem relativen Anteil NRP2-positiver TZs gebildet (Remmele et al., 1986). Der hier beschriebene relative Anteil NRP2-positiver TZs bezieht sich jeweils auf das gesamte Präparat und nicht nur auf den abgebildeten Bildausschnitt.

- (1A): aNRP2-36v2. SI = 3. >80 % positive TZs. IRS = 3. Membranen und Zytoplasmen von TZs sind NRP2-positiv. Pfeil: stark NRP2-positive apoptotische TZ.
- (1B): NBIC. Negativkontrolle zu 1A. Kein NRP2-Signal.

- (2A): aNRP2-36v2. SI = 2. 50 % positive TZs. IRS = 2. Kerne, Membranen und Zytoplasmen von TZs sind NRP2-positiv.
- (2B): NBIC. Negativkontrolle zu 2A. Kein NRP2-Signal.
- (3A): aNRP2-36v2. SI = 3. >80 % positive TZs. IRS = 3. Kerne, Membranen und Zytoplasmen von TZs sind NRP2-positiv.
- (3B): NBIC. Negativkontrolle zu 3A. Kein NRP2-Signal.

Bei vielen Gewebeschnitten ist das NRP2-Signal in mehreren unterschiedlichen TZ-Strukturen gleichzeitig messbar (bspw. Zytoplasma und Zellmembran), wie anhand der Beispiele aus Abb. 9 erkennbar wird.

Bei manchen Präparaten dominierte die Anfärbung mit aNRP2-36v2 einer spezifischen TZ-Struktur einen Großteil aller NRP2-positiven Zellen: Bei bestimmten Gewebeschnitten zeigten sich bspw. überwiegend positive NRP2-Signale an den TZ-Membranen, andere Schnitte wiederum zeigten vordergründig Kern- oder Zytoplasmasignale (Abb. 10).

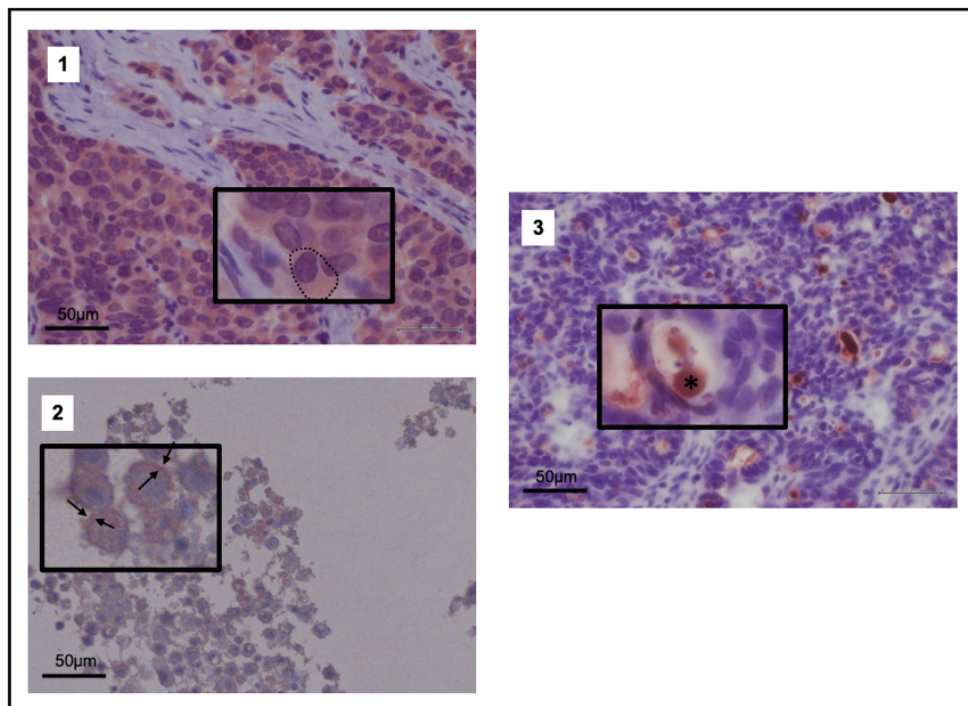


Abb. 10: NRP2-Positivität spezifischer TZ-Strukturen

Immunhistochemische Färbung mit aNRP2-36v2 zum NRP2-Nachweis in drei verschiedenen Präparaten. aNRP2-36v2 färbte bei manchen Präparaten vordergründig eine spezifische Tumorzellstruktur an.

- (1): NRP2-Signal im Zytoplasma von TZs. Gestrichelte Linie = Schematische Andeutung der TZ-Begrenzung.
- (2): NRP2-Signal überwiegend im Membranbereich und selten im Zytoplasma von TZs. Pfeile = TZ-Membranen.

- (3): NRP2-Signal vordergründig in den TZ-Kernen. Stern= TZ-Kern.

3.3.3 NRP2-Expression in tumorumgebenden Lymphozyten

TZs lassen sich dank ihrer erhöhten Kern-Plasma-Relation mikroskopisch gut von Lymphozyten abgrenzen.

In den in Abb. 11 abfotografierten Präparaten lassen sich die Lymphozyten des tumorumgebenden Stromas eindeutig von malignen Zellen unterscheiden. Bei 27,3 % aller Präparate zeigte sich ein deutliches NRP2-Signal im Zytoplasma der tumorumgebenden Lymphozyten; teilweise war das Signal auch an der Zellmembran messbar. In den meisten Fällen zeigte sich parallel eine aNRP2-36v2-Färbung der umliegenden TZs; bei 2,8 % der Gewebeschnitte waren nur Lymphozyten NRP2-positiv und der Rest des Präparats NRP2-negativ.

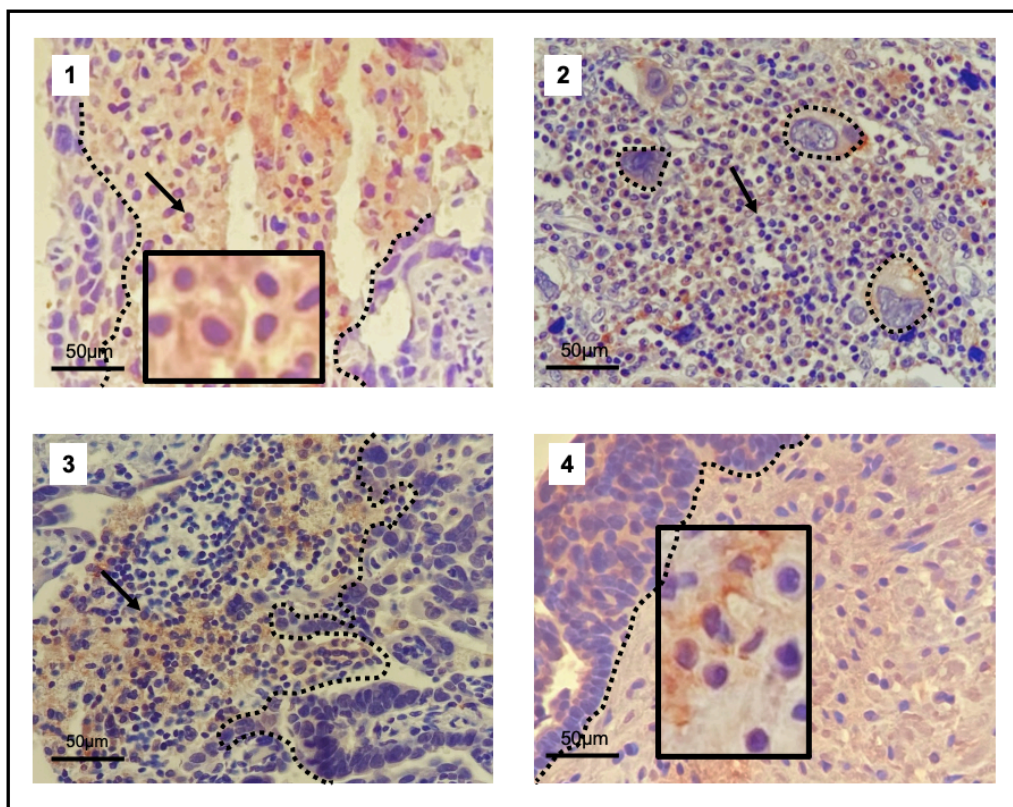


Abb. 11: NRP2-Positivität von Lymphozyten und TZs

Immunhistochemische Färbung mit aNRP2-36v2 zum NRP2-Nachweis in drei verschiedenen Präparaten. Im Gegensatz zu Lymphozyten zeigen TZs eine stark verschobene Kern-Plasma-Relation. Gestrichelte Linie = TZ/TZ-Verbände. Pfeil = Lymphozyt.

- (1): Lymphozytäres Stroma in der Umgebung zweier TZ-Verbände (rechter und linker Bildrand), beispielhaft vergrößert. Deutliches NRP2-Signal im Zytoplasma und an einigen Zellmembranen aller Lymphozyten.
- (2): Inmitten der Lymphozytenansammlung sind mehrere solitäre, teils schwach NRP2-positive TZs erkennbar. Das Zytoplasma einiger Lymphozyten zeigt ein NRP2-Signal.
- (3): NRP2-negative TZ-Verbände finden sich in direkter Nähe zu NRP2-positiven Lymphozyten.
- (4): Prominentes NRP2-Signal der tumorumgebenden Lymphozyten, beispielhaft vergrößert. Das angrenzende TZ-Nest weist ebenfalls ein positives NRP2-Signal auf.

3.4 Assoziation der NRP2-Expression mit klinischen Parametern und dem Überleben

3.4.1 Klinische Parameter

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den klinischen Faktoren (PCI, FIGO-Stadium, Tumorverteilung, postoperative Tumorlast) und der NRP2-Expression von Ovarialkarzinomzellen festgestellt werden, wie in Tab. 19 dargestellt.

Tab. 19: Assoziation klinischer Parameter mit der NRP2-Expression

Klinische Parameter	Immunhistochemische Auswertungskriterien	p-Wert
PCI (≤ 9 vs. > 9)		
	A) NRP2-Positivität von TZs allgemein	0,84
	B) SI der NRP2-Färbung	0,362
	C) Relativer Anteil NRP2-positiver TZs (≤ 50 % vs. > 50 %)	0,847
	D) IRS (SI x relativer NRP2-positiver TZ-Anteil)	0,592
	E) NRP2-Positivität von TZ-Kernen	0,526
	F) NRP2-Positivität von Lymphozyten	0,316
	G) Relativer Anteil NRP2-positiver TZs pro Gesichtsfeld (40x)	0,862
FIGO-Stadium (I-IIIB vs. IIIC-IVB)		
	A) NRP2-Positivität von TZs allgemein	0,844
	B) SI der NRP2-Färbung	0,161
	C) Relativer Anteil NRP2-positiver TZs (≤ 50 % vs. > 50 %)	0,942
	D) IRS (SI x relativer NRP2-positiver TZ-Anteil)	0,277
	E) NRP2-Positivität von TZ-Kernen	0,211
	F) NRP2-Positivität von Lymphozyten	0,343
	G) Relativer Anteil NRP2-positiver TZs pro Gesichtsfeld (40x)	0,992

Klinische Parameter	Immunhistochemische Auswertungskriterien	p-Wert
Tumorverteilung (Unterbauch/rechtes Zwerchfell/beide Zwerchfelle vs. Dünndarmmesenterium)		
	A) NRP2-Positivität von TZs allgemein	0,586
	B) SI der NRP2-Färbung	0,983
	C) Relativer Anteil NRP2- positiver TZs ($\leq 50\%$ vs. $> 50\%$)	0,565
	D) IRS (SI x relativer NRP2-positiver TZ- Anteil)	0,761
	E) NRP2-Positivität von TZ-Kernen	0,34
	F) NRP2-Positivität von Lymphozyten	0,456
	G) Relativer Anteil NRP2- positiver TZs pro Gesichtsfeld (40x)	0,538
Postoperative Tumorlast (Tumorfreiheit vs. Resttumor)		
	A) NRP2-Positivität von TZs allgemein	0,58
	B) SI der NRP2-Färbung	0,432
	C) Relativer Anteil NRP2- positiver TZs ($\leq 50\%$ vs. $> 50\%$)	0,383
	D) IRS (SI x relativer NRP2-positiver TZ- Anteil)	0,987
	E) NRP2-Positivität von TZ-Kernen	0,697
	F) NRP2-Positivität von Lymphozyten	0,573
	G) Relativer Anteil NRP2- positiver TZs pro Gesichtsfeld (40x)	0,713

3.4.2 Überleben

Die NRP2-Expression von Tumor- und Immunzellen war nicht signifikant mit dem Gesamt- oder dem krankheitsfreien Überleben assoziiert. Diese Ergebnisse sind in Tab. 20 aufgeführt.

Tab. 20: Assoziation der NRP2-Expression mit dem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben

OS = Gesamtüberleben, DFS = Krankheitsfreies Überleben

Immunhistochemische Auswertungskriterien	Subkategorien					p-Wert
A) NRP2-Positivität von TZs allgemein	Wenige/ keine TZs positiv	Viele TZs positiv				
OS	47,04 %	39,86 %				0,303
DFS	13,83 %	9,62 %				0,58
B) SI der NRP2-Färbung	Keine Färbung = 0	Schwach = 1	Mittelstark = 2	Stark = 3		
OS	49,64 %	30,93 %	53,43 %	37,78 %		0,359
DFS	17,19 %	16,07 %	8,36 %	7,16 %		0,783
C) Relativer Anteil NRP2-positiver TZs	≤50 %	>50 %				
OS	46,10 %	37,79 %				0,869
DFS	12,53 %	10,06 %				0,751
D) IRS (SI x relativer NRP2-positiver TZ-Anteil)	0-1	2-3				
OS	44,91 %	40,11 %				0,676
DFS	14,85 %	7,74 %				0,745
E) NRP2-Positivität von TZ-Kernen	Keine Färbung	TZ-Kerne negativ	TZ-Kerne positiv			
OS	50,53 %	41,10 %	36,99			0,734
DFS	17,02 %	12,31 %	0,00 %			0,868
F) NRP2-Positivität von Lymphozyten	Ja	Nein				
OS	40,47 %	44,65 %				0,65
DFS	11,88 %	11,70 %				0,368
G) Relativer Anteil NRP2-pos. TZs pro Gesichtsfeld (40x)	≤50 %	>50 %				
OS	46,40 %	40,83 %				0,405
DFS	16,12 %	8,62 %				0,653
H) Relativer Anteil NRP2-pos. TZs, kleinschrittig	0 %	≤10 %	≤40 %	≤70 %	>70 %	
OS	49,64 %	46,15 %	51,10 %	38,79 %	26,42 %	0,816
DFS	17,19 %	11,67 %	10,46 %	19,72 %	0,00 %	0,428

4. Diskussion

4.1 Einordnung der Ergebnisse der statistischen Auswertung in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext

Ziel dieser Arbeit war es, die bislang nur unzureichend erforschte Gruppe von HGSCs anhand einer ausreichend großen Kohorte bestehend aus 176 Probandinnen in Bezug auf ihr NRP2-Expressionsverhalten zu untersuchen.

Bisherige Studien befassten sich vordergründig mit der Einordnung der Fragestellung in den Kontext von Ovarialkarzinomen in ihrer Gesamtheit, wobei die Anzahl untersuchter Proben des high-grade serösen Subtyps keine repräsentative Kohortengröße erreichte, um verlässliche Aussagen über diese spezielle Untergruppe machen zu können.

Die Ergebnisse dieses Projekts decken sich weitestgehend mit der aktuellen Datenlage: Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem FIGO-Stadium und der Proteinexpression. Auch ließ sich die These von Bednarek et al. (2011) und Drenberg et al. (2009) hinsichtlich einer vermehrten NRP2-Expression in den frühen FIGO-Stadien nur bedingt bestätigen: Ein geringfügig höherer prozentualer Anteil NRP2-positiver Präparate der frühen Stadien ließ sich ebenso bei unseren Untersuchungen messen (51,4 % in FIGO I – IIIB vs. 46,5 % in FIGO IIIC – IV), jedoch handelte es sich auch hierbei nicht um statistisch signifikante Unterschiede. Da diese Besonderheit nun allerdings schon zum wiederholten Mal Beachtung findet, erscheinen anschließende Untersuchungen bzgl. dieser Fragestellung sinnvoll.

Abweichend von den aktuellen Erkenntnissen wurde NRP2 im Rahmen dieses Projekts erstmalig innerhalb von TZ-Kernen und tumorumgebenden Lymphozyten nachgewiesen. Auf diese Aspekte wird in weiteren Kapiteln genauer eingegangen.

Die Resultate dieser Arbeit deuten darauf hin, dass NRP2 keine positiven Effekte auf die Karzinogenese der HGSCs ausübt, und somit auch nicht mit einer ungünstigeren Prognose der Erkrankten einhergeht. Nach dem gegenwärtigen Stand der Wissenschaft bilden Ovarialkarzinome in dieser Hinsicht eine Ausnahme unter einigen untersuchten Krebsarten, bei denen NRP2 wiederum malignitätsfördernde Prozesse vorantreibt und

folglich oft zu einer verschlechterten Prognose beiträgt (Borkowetz et al., 2020; Cao et al., 2013; Gray et al., 2008; Kawakami et al., 2002; Rushing et al., 2012; Samuel et al., 2011; Wittmann et al., 2015; Yasuoka et al. 2009, 2011).

Um die zugrundeliegenden komplexen molekularen Funktionsweisen von NRP2 besser zu verstehen, haben einige der benannten Autoren in-vitro-Experimente durchgeführt; demnach konnte weiterführend genau bestimmt werden, welche Anteile der Karzinogenese von dem Protein beeinflusst werden.

Die Methoden unseres Projekts erlauben indirekte Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen, an denen NRP2 beteiligt ist. Basierend auf unseren Ergebnissen ist nicht davon auszugehen, dass die Metastasierungsprozesse der HGSCs signifikant durch NRP2 vorangetrieben werden. Als wesentlicher Indikator für das Ausmaß an Metastasierung gilt das FIGO-Stadium. Hinsichtlich der erhobenen klinischen Parameter (postoperativer Tumorrest, Tumorverteilung, FIGO-Stadium und PCI) ließ sich kein Zusammenhang mit der NRP2-Expression feststellen.

Sowohl der PCI als auch die Tumorverteilung im Bauchraum besitzen prognostische Aussagekraft bzgl. des Erlangens maximaler Zytoreduktion (Heitz et al., 2016; Lampe et al., 2015).

Bei der statistischen Auswertung wurden die beiden Gruppen „PCI < 9“ und „PCI > 9“ im Hinblick auf die Proteinexpression miteinander verglichen. Der Grenzwert wurde bei 9 gesetzt, weil zahlreiche Erfahrungen am UKB zeigten, dass ab diesem Wert gehäuft intra- und postoperative Komplikationen auftreten, die sich signifikant auf das Überleben der Patientinnen auswirken (Egger et al., 2022). Kann keine Tumorfreiheit erreicht werden, so sind die Tumorresiduen in knapp 80 % der Fälle am Dünndarmmesenterium lokalisiert (Heitz et al., 2016). Bei der Auswertung wurde deshalb zwischen der Lokalisation von Tumormetastasen im Unterbauch und/oder an den Zwerchfellen und der Lokalisation am Dünndarmmesenterium unterschieden. Weder die Intensität der NRP2-Färbung, noch der Anteil positiver TZs oder der IRS zeigten eine statistisch signifikante Korrelation mit dem PCI oder dem Tumorverteilungsmuster.

NRP2 wird in gesunden sowie maligne entarteten Epithelien der Ovarien exprimiert. Bei insgesamt 66,5 % aller von uns untersuchten Proben waren NRP2-Signale in TZs messbar (Drenberg et al., 2009). Um ein tieferes Verständnis für die Funktionen von NRP2 im Kontext von HGSCs zu erlangen, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Angemessen erscheinen Experimente auf molekularer Ebene, die an die Studien von Drenberg et al. (2009), Osada et al. (2006) und Wang et al. (2004) bzgl. der Expression der NRP2-Interaktionspartner SEMA3F und VEGF-A bei Ovarialkarzinomen anknüpfen, und sich vermehrt mit deren Vorkommen unter NRP2-Einfluss beschäftigen.

Die Breite an zusätzlich erhobenen klinischen Daten im Rahmen dieser Arbeit ermöglicht erstmalig ein besseres Verständnis für den Zusammenhang zwischen dem Langzeitüberleben von an HGSCs erkrankten Patientinnen und dem NRP2-Vorkommen: Es ließ sich keine Korrelation zwischen der NRP2-Expression und dem krankheitsfreien oder dem Gesamtüberleben nachweisen. Die Erkenntnisse von Osada et al. (2006) zeigten diesbezüglich schon eine erste Bilanz, wobei in dieser Studie nur das Gesamtüberleben untersucht wurde.

4.2 Einordnung der epidemiologischen Daten der Kohorte

Das mittlere Erkrankungsalter der untersuchten Kohorte betrug 61,8 Jahre im Vergleich zum bundesweiten Durchschnittsalter von 68 Jahren für die Gesamtheit der histologischen Subtypen von Ovarialkarzinomen. Eine mögliche Ursache liegt darin, dass der seröse Subtyp im Gegensatz zu anderen Untergruppen am häufigsten Mutationen der BRCA1/2-Gene aufweist, und Mutationsträger oftmals schon in jüngeren Jahren erkranken als die Normalbevölkerung (Harter et al., 2017; Kotsopoulos et al., 2018).

Knapp 54 % der Patientinnen wiesen zum Zeitpunkt der Hauptoperation einen BMI von über 24 auf und galten somit als übergewichtig. In einer groß angelegten Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass adipöse Frauen ein erhöhtes Risiko haben, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Olsen et al., 2007).

4.3 Expression von NRP2 in TZ-Kernen bei HGSCs

NRP2 interagiert sowohl als membranständiger Rezeptor, als auch in löslicher Form mit diversen Vertretern der VEGFs und der SEMAs. Dies erklärt sein breites Vorkommen innerhalb des Zytoplasmas und an der Membran von gesunden und entarteten Zellen.

Dutta et al. (2022) haben NRP2 mittels Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie erstmals auch innerhalb von TZ-Kernen nachgewiesen. Das Team konnte zeigen, dass NRP2 im Nukleus von Prostatakarzinomzellen mit Transkriptionsfaktoren sowie Promotorregionen bestimmter Genabschnitte interagiert. Darüber hinaus stabilisiert es einen Proteinkomplex, der die Transkription tumorfördernder Gene begünstigt. Dies bedingt die schlechtere Prognose von Patienten mit positivem nukleärem NRP2-Status im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Bei 24 der für diese Arbeit untersuchten 176 Präparate konnte NRP2 immunhistochemisch im Nukleus von Ovarialtumorzellen nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis lässt darauf schließen, dass die Effekte von NRP2 über die Interaktion mit VEGFs und SEMAs im Zytoplasma bzw. an der Zellmembran hinaus gehen. Drenberg et al. (2009) und Osada et al. (2006), deren Experimente sich ebenfalls mit der Expression von NRP2 bei Ovarialkarzinomen befassten, beschrieben ein Vorkommen des Proteins lediglich innerhalb des Zytoplasmas und an der Membran von TZs.

Für das HGSC ließ sich im Rahmen dieses Projekts, im Gegensatz zum Prostatakarzinom, kein signifikanter Prognoseunterschied zwischen positivem und negativem nukleärem NRP2-Status messen. Auch liegt keine Korrelation mit dem PCI, dem FIGO-Stadium, der Tumorverteilung oder der postoperativen Tumorlast vor.

Welche genauen Funktionen das Protein im TZ-Kern des untersuchten Subtyps übernimmt, bleibt somit ungewiss. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten allerdings darauf hin, dass es sich dabei nicht um rein tumorfördernde Mechanismen handelt.

Dennoch lassen sie vermuten, dass NRP2 auch beim HGSC initiale Schritte der Proteinbiosynthese - insbesondere den Schritt der im Zellkern ablaufenden Transkription - beeinflussen könnte.

Zu erwägen wären aufgrund der bisher erforschten Mechanismen bspw. Interaktionen mit den Genabschnitten, die für die VEGFs kodieren. Dies müsste in weiterführenden Experimenten noch genauer untersucht werden.

4.4 Expression von NRP2 in tumorumgebenden Lymphozyten bei HGSCs

Bei 27,3 % der untersuchten Präparate konnten in unmittelbarer Umgebung der Ovarialtumorzellen auch NRP2-positive Lymphozyten nachgewiesen werden. Diese lassen sich rein mikroskopisch ohne zusätzliche immunhistochemische Färbung nicht in B- und T-Zellen unterteilen. Das NRP2-Signal war meist im Zytoplasma der Immunzellen lokalisiert, teilweise war es auch an der Zellmembran messbar.

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass polysialyliertes NRP2 an der Oberfläche von dendritischen Zellen deren Potenzial der T-Lymphozyten-Aktivierung beeinflusste. Weiter führte die NRP2-Inhibition im Rahmen anderer Experimente zur vermehrten Mobilisierung von T-Zellen (Curreli et al., 2007; Wang et al., 2023).

Mendes-da-Cruz et al. (2014) belegten außerdem, dass NRP2 an Differenzierungsprozessen der T-Lymphozyten beteiligt ist: Doppelt CD4- und CD8-positive T-Zellen, die sich noch im Thymus zur Reifung befanden, zeigten nahezu ausnahmslos ein NRP2-Signal. Bei weiter gereiften T-Lymphozyten hingegen fand sich eine geringer ausgeprägte NRP2-Expression. Auch maligne T-Vorläuferzellen bei leukämischen und lymphatischen Neoplasien exprimierten NRP2 (Mendes-da-Cruz et al., 2014).

In unseren Experimenten konnten bei einigen Präparaten viele stark NRP2-positive Lymphozyten, bei denen es sich möglicherweise um T-Zellen handelt, in unmittelbarer Tumorumgebung nachgewiesen werden. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen deren Vorkommen und dem Überleben der Patientinnen bzw. den anderen untersuchten Parametern, ließ sich nicht nachweisen.

Um unsere Ergebnisse in Relation zu den Resultaten von Mendes-da-Cruz et al. (2014) bewerten zu können, müssten immunhistochemische Färbungen mit dem von uns verwendeten Antikörper aNRP2-36v2 zusätzlich an T-Vorläuferzellen durchgeführt werden. Zusätzlich könnten Untersuchungen der NRP2-Expression bei T-Lymphozyten

tumorfreier Gewebe derselben Probandin von Bedeutung sein. Dies würde es ermöglichen, die NRP2-Expression von T-Zellen aus Tumorgewebe und solchen aus gesundem Gewebe miteinander zu vergleichen.

Aufschlussreich könnten darüber hinaus zusätzliche immunhistochemische Färbungen mit Markern für dendritische Zellen sein, um unsere Ergebnisse unter den von Curreli et al. (2007) beschriebenen Aspekten zu beurteilen.

Bisweilen haben nur wenige Autoren die Rolle von NRP2 in Bezug auf B-Lymphozyten untersucht. Wang et al. (2022) konnten nachweisen, dass NRP2 bei allergischen Reaktionen zur Immuntoleranz beiträgt, indem es die Wirkung regulatorischer B-Zellen verstärkt. Studien, die den Zusammenhang im Kontext von Karzinomen analysieren, existieren bis dato nicht.

Zusammenfassend misst man NRP2 nach dem aktuellen Stand der Forschung also sowohl bzgl. der Interaktionen mit B- sowie mit T-Zellen immunomodulatorische Eigenschaften zu, wobei jüngste Erkenntnisse darüber hinaus von immunsupprimierenden Funktionen des Proteins ausgehen (M. Wang et al., 2023; Y. Wang et al., 2022).

Die Methoden dieses Projekts erlauben keine genaueren Aussagen darüber, ob und in welchem Maße NRP2 bei HGSCs immunomodulatorischen Funktionen nachkommt. Unseren Ergebnissen zufolge kann es sich jedoch nicht um rein immunsupprimierende bzw. rein immunstimulierende Funktionen handeln, da sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen deren NRP2-Expression und dem Überleben, dem Metastasierungsausmaß und der Wahrscheinlichkeit des Erlangens intraoperativer Tumorfreiheit darlegen ließ.

4.5 Auswertbarkeit und Limitationen

Zur Durchführung dieses Projekts wurden im Vorfeld zu den immunhistochemischen Färbungen von jeder Patientin mehrere Tumorpräparate gesichtet. Insgesamt ging es bei der Auswahl des später zu analysierenden Gewebeschnitts darum, jenen zu identifizieren, der den höchsten TZ-Gehalt aufwies.

Intraoperativ wurden pro Patientin Biopsien von mehreren Lokalisationen gewonnen, darunter von dem sich an der Adnexe und/oder den Tuben befindlichen Primarius, von verschiedenen Lymphknotenstationen, sowie von sämtlichen Metastasen, die dem gesamten Bauchraum entstammen konnten. Insbesondere Patientinnen mit Tumorrezidiv waren in den meisten Fällen voroperiert und hatten in der Vergangenheit schon eine Hysterektomie mit Adnektomie erhalten, sodass in diesen Fällen nur Biopsien von Metastasen für die Untersuchung zur Verfügung standen.

Meist entsprach der Gewebepblock mit dem höchsten TZ-Gehalt dem Adnektomiepräparat, mitunter handelte es sich allerdings bei den für die Immunhistochemie ausgewählten Präparaten um Gewebeproben anderer von Tumormetastasen befallener Lokalisationen.

Es bleibt ungewiss, ob dies Einfluss auf die Untersuchung genommen hat, da verschiedene Gewebe über zum Teil voneinander abweichende lokale Barrierefunktionen verfügen, die sich ggf. divergent auf das Wachstumsverhalten der TZs und somit die Expression von NRP2 ausgewirkt haben könnten.

Darüber hinaus wurde bei der Auswahl und der Auswertung der Präparate nicht zwischen nativem und chemotherapeutisch vorbehandeltem Gewebe unterschieden. Von einigen Patientinnen stand zu Beginn der Untersuchung nur Letzteres zur Verfügung, da es sich entweder bei der am UKB durchgeführten Hauptoperation schon um die Therapie eines Rezidivs handelte, oder da manche erstmalig diagnostizierte Patientinnen im Vorfeld eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten. In diesem Fall kam es einerseits präoperativ zu einer erheblichen Reduktion der ursprünglichen Tumorlast, andererseits wurde nicht untersucht, ob und inwiefern die verabreichten Chemotherapeutika die NRP2-Expression der noch verbleibenden TZs beeinflussten.

Sowohl die Gewebeherkunft als auch die chemotherapeutische Vorbehandlung der Präparate könnten sich auf das Vorkommen von NRP2 und somit die Ergebnisse dieser Arbeit ausgewirkt haben. Zur Bewertung dieser Aspekte wäre es angebracht, die Proben in weiterführenden Projekten unter eben diesen Gesichtspunkten genauer zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom steht an dritter Stelle der häufigsten gynäkologischen Tumoren weltweit, insbesondere der high-grade seröse Subtyp ist durch eine äußerst schlechte Prognose gekennzeichnet. Die Resektion der kompletten Tumorlast im Rahmen einer frühzeitigen Diagnostik beschreibt das übergeordnete Ziel der Therapie, da sie den Patientinnen einen signifikanten Überlebensvorteil gewährleistet.

Neuropilin 2 ist ein Glykoprotein aus der Gruppe der Non-Tyrosinkinaserzeptoren. Das Protein beeinflusst durch unterschiedliche Interaktionen auf molekularer Ebene - darunter u.a. durch Wechselwirkungen mit Vertretern der Vascular Endothelial Growth Factors, den Tumor-assoziierten Makrophagen oder dem Chemokinrezeptor 4 - Mechanismen der Karzinogenese, und gilt für einige Krebsentitäten als malignitätsfördernder und somit prognoseverschlechternder Faktor. Die aktuelle Datenlage zum Vorkommen von Neuropilin 2 bei high-grade serösen Ovarialkarzinomen weist nur wenige repräsentative und teils widersprüchliche Ergebnisse auf, weshalb seine Expression in dieser Arbeit bei dem genannten Subtyp in einer groß angelegten Studie untersucht wurde.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden die OP-Präparate von 176 Patientinnen, die wegen eines high-grade serösen Ovarialkarzinoms im Zeitraum vom 13.01.2010 – 15.12.2020 in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Bonn operiert wurden, nach immunhistochemischen Methoden gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

Die folgenden klinischen Parameter wurden im Vorfeld erhoben und erlauben eine grobe Einschätzung über die Prognose der Patientinnen, da sie indirekte Aufschlüsse über die Operabilität und die damit verbundene Möglichkeit des Erreichens von Tumorfreiheit geben:

- das Tumorstadium nach FIGO-Klassifikation
- die Tumorverteilung
- der Peritoneal Cancer Index
- das Ausmaß an postoperativen Tumorresiduen

Es wurde einerseits untersucht, ob diese Parameter mit der Neuropilin 2-Expression bei high-grade serösen Ovarialkarzinomen korrelieren, darüber hinaus stand die Analyse eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Proteinexpression und dem Langzeitüberleben im Fokus.

Ergebnisse:

- Bei 66,5 % der Präparate konnte Neuropilin 2 innerhalb der Ovarialkarzinomzellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen der Neuropilin 2-Expression und dem krankheitsfreien bzw. dem Gesamtüberleben war nicht messbar.
- Es gelang erstmals der Nachweis von Neuropilin 2 innerhalb von Ovarialtumorzellkernen. Bisher war das Protein in seinen löslichen und membranständigen Formen fast ausschließlich im Zytoplasma und an der Zellmembran beschrieben worden. Die neu gewonnene Erkenntnis deutet darauf hin, dass Neuropilin 2 initiale Schritte der im Zellkern ablaufenden Transkription nach noch unbekanntem Mechanismus beeinflussen könnte.
- Erhöhte Konzentrationen des Proteins wurden in tumorumgebenden Lymphozyten gemessen. Diese Beobachtung knüpft an die jüngsten Ergebnisse erst kürzlich publizierter Prostatakarzinomstudien, in denen die Rolle von Neuropilin 2 als Regulator des adaptiven Immunsystems diskutiert wird.

Vor dem Hintergrund der wachsenden Bedeutung zielgerichteter Immuntherapien zur Behandlung verschiedener onkologischer Krankheitsbilder bieten die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse einen wichtigen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen, um die komplexen Funktionsweisen von Neuropilin 2 auf molekularer Ebene noch besser verstehen und dann im Kontext neuer therapeutischer Konzepte möglicherweise einmal nutzen zu können.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung	35
Abb. 2: Bildung der endgültigen Kohorte	43
Abb. 3: Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnosestellung	44
Abb. 4: BMI und ASA-Score zum Zeitpunkt der Hauptoperation	44
Abb. 5: Entität der zu operierenden Raumforderung	46
Abb. 6: Peritoneal Cancer Index (PCI)	48
Abb. 7: Kaplan-Meier-Kurven	49
Abb. 8: Beispiele verschiedener SIs	53
Abb. 9: Beispiele NRP2-positiver Präparate	54
Abb. 10: NRP2-Positivität spezifischer TZ-Strukturen	55
Abb. 11: NRP2-Positivität von Lymphozyten und TZs	56

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Histopathologische Einteilung maligner Ovarialtumoren nach der Klassifikation der WHO von 2014	10
Tab. 2: Klassifikation maligner Tumore von Ovar, Tube und Peritoneum nach FIGO und TNM (2014)	11
Tab. 3: NRP2-Expression bei malignen Tumoren	24
Tab. 4: Verwendete Reagenzien und Substanzen	36
Tab. 5: Verwendete Kits	36
Tab. 6: Verwendete Puffersysteme und Lösungen	36
Tab. 7: Verwendete Antikörper	37
Tab. 8: Verwendete Materialien	37
Tab. 9: Verwendete Geräte	37
Tab. 10: Immunreaktiver Score nach Remmele (IRS)	39
Tab. 11: Auswertungskriterien der NRP2-Färbung	40
Tab. 12: Unterteilung der Kohorte nach FIGO-Stadien	45
Tab. 13: Im Rahmen der Hauptoperation erhobene Parameter	47
Tab. 14: Rezidiv und Tod im Beobachtungszeitraum	49
Tab. 15: Systemtherapie	50
Tab. 16: Expression von NRP2 bei HGSCs	51
Tab. 17: NRP2-positive Präparate nach FIGO-Stadien	53
Tab. 19: Assoziation klinischer Parameter mit der NRP2-Expression	58
Tab. 20: Assoziation der NRP2-Expression mit dem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben	61

8. Literaturverzeichnis

Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 548–553

Aghajanian C, Blank S V., Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, Sovak MA, Yi J, Nycum LR. OCEANS: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab in Patients With Platinum-Sensitive Recurrent Epithelial Ovarian, Primary Peritoneal, or Fallopian Tube Cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2039–2045

Axtell AE, Lee MH, Bristow RE, Dowdy SC, Cliby WA, Raman S, Weaver JP, Gabbay M, Ngo M, Lentz S, Cass I, Li AJ, Karlan BY, Holschneider CH. Multi-Institutional Reciprocal Validation Study of Computed Tomography Predictors of Suboptimal Primary Cytoreduction in Patients With Advanced Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 384–389

Baba T, Kariya M, Higuchi T, Mandai M, Matsumura N, Kondoh E, Miyanishi M, Fukuhara K, Takakura K, Fujii S. Neuropilin-1 promotes unlimited growth of ovarian cancer by evading contact inhibition. *Gynecol Oncol* 2007; 105: 703–711

Barbolina M V., Kim M, Liu Y, Shepard J, Belmadani A, Miller RJ, Shea LD, Stack MS. Microenvironmental Regulation of Chemokine (C-X-C-Motif) Receptor 4 in Ovarian Carcinoma. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 653–664

Bednarek W, Mazurek-Kociubowska M, Wertel Iwona. Expression of neuropilin-2 in ovarian cancer. *Oncologia i Radioterapia* 2011; 15: 27–38

Beral V, Bull D, Geen J, Reeves G. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2007; 369: 1703–1710

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

Borkowetz A, Froehner M, Rauner M, Conrad S, Erdmann K, Mayr T, Datta K, Hofbauer LC, Baretton GB, Wirth M, Fuessel S, Toma M, Muders MH. Neuropilin-2 is an independent prognostic factor for shorter cancer-specific survival in patients with acinar adenocarcinoma of the prostate. *Int J Cancer* 2020; 146: 2619–2627

van der Burg ME, Lammes FB, Verweij J. The role of CA 125 in the early diagnosis of progressive disease in ovarian cancer. *Ann of Oncol* 1990; 1: 301–302

Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, Reding DJ, Greenlee RT, Yokochi LA, Kessel B, Crawford ED, Church TR, Andriole GL, Weissfeld JL, Fouad MN, Chia D, O'Brien B, Ragard LR, Clapp JD, Rathmell JM, Riley TL, Hartge P, Pinsky PF, Zhu CS, Izmirlian G, Kramer BS, Miller AB, Xu JL, Prorok PC, Gohagan JK, Berg CD. Effect of Screening on Ovarian Cancer Mortality: The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2011; 305: 2295–2302

Cao Y, Hoeppner LH, Bach S, Guangqi E, Guo Y, Wang E, Wu J, Cowley MJ, Chang DK, Waddell N, Grimmond SM, Biankin AV., Daly RJ, Zhang X, Mukhopadhyay D. Neuropilin-2 promotes extravasation and metastasis by interacting with endothelial $\alpha 5$ integrin. *Cancer Res* 2013; 73: 4579–4590

Caunt M, Mak J, Liang WC, Stawicki S, Pan Q, Tong RK, Kowalski J, Ho C, Reslan HB, Ross J, Berry L, Kasman I, Zlot C, Cheng Z, Le Couter J, Filvaroff EH, Plowman G, Peale F, French D, Carano R, Koch AWW, Wu Y, Watts RJ, Tessier-Lavigne M, Bagri A. Blocking Neuropilin-2 Function Inhibits Tumor Cell Metastasis. *Cancer Cell* 2008; 13: 331–342

Chatterjee S, Azad BB, Nimmagadda S. Chapter Two - The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. *Adv Cancer Res* 2014; 124: 31–82

Chen H, Ché A, He Z. Neuropilin-2, a Novel Member of the Neuropilin Family, Is a High Affinity Receptor for the Semaphorins Sema E and Sema IV but Not Sema III. *Neuron* 1997; 19: 547–559

Chen H, He Z, Bagri A, Tessier-Lavigne M. Semaphorin–Neuropilin Interactions Underlying Sympathetic Axon Responses to Class III Semaphorins. *Neuron* 1998; 21: 1283–1290

Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23 257 women with ovarian cancer and 87 303 controls. *Lancet* 2008; 371: 303–3014

Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: Individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *The Lancet* 2015; 385: 1835–1842

Constanza Camargo M, Stayner LT, Straif K, Reina M, Al-Alem U, Demers PA, Landrigan PJ. Occupational Exposure to Asbestos and Ovarian Cancer: A Meta-analysis. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 1211–1217

Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, Mann D, Stamatou NM. 2007. Polysialylated Neuropilin-2 is Expressed on the Surface of Human Dendritic Cells and Modulates Dendritic Cell-T Lymphocyte Interactions. *J Biol Chem* 2007; 282: 30346–30356

Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) e.V., 2022: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. Version 5.1 - Mai 2022. AWMF-Registernummer 032/035OL. <https://www.leitlinienprogramm->

onkologie.de/fileadmin/user_upload/LL_Ovarialkarzinom_Langversion_5.1.pdf

(Zugriffsdatum: 13.07.2023)

Drenberg CD, Livingston S, Chen R, Kruk PA, Nicosia S V. 2009. Expression of Semaphorin 3F and Its Receptors in Epithelial Ovarian Cancer, Fallopian Tubes, and Secondary Müllerian Tissues. *Obst Gynecol Int* 2009; 2009: 730739

Dutta S, Polavaram NS, Islam R, Bhattacharya S, Bodas S, Mayr T, Roy S, Albala SAY, Toma MI, Darehshouri A, Borkowetz A, Conrad S, Fuessel S, Wirth M, Baretton GB, Hofbauer LC, Ghosh P, Pienta KJ, Klinkebiel DL, Batra SK, Muders MH, Datta K. Neuropilin-2 regulates androgen-receptor transcriptional activity in advanced prostate cancer. *Oncogene* 2022; 41: 3747–3760

Dutta S, Roy S, Polavaram NS, Stanton MJ, Zhang H, Bhola T, Hönscheid P, Donohue TM, Band H, Batra SK, Muders MH, Datta K. Neuropilin-2 regulates endosome maturation and EGFR trafficking to support cancer cell pathobiology. *Cancer Res* 2016; 76: 418–428

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

Eisenkop SM, Friedman RL, Spirtos NM. The Role of Secondary Cytoreductive Surgery in the Treatment of Patients with Recurrent Epithelial Ovarian Carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 144–153

Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, Mandron M, Herault JP, Neufeld G, Savi P, Herbert JM, Bono F. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* 2006; 108: 1243–1250

Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 328–335

Finch A, Beiner M, Lubinski J, Lynch HT, 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. Salpingo-oophorectomy and the Risk of Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Cancers in Women With a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *JAMA* 2006; 196: 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

Fukahi K, Fukasawa M, Neufeld G, Itakura J, Korc M. Aberrant Expression of Neuropilin-1 and-2 in Human Pancreatic Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 581–590

Gershenson DM, Sun CC, Lu KH, Coleman RL, Sood AK, Malpica A, Deavers MT, Silva EG, Bodurka DC. Clinical Behavior of Stage II-IV Low-Grade Serous Carcinoma of the Ovary. *Obstet Gynecol* 2006; 108: 361–369

Giger RJ, Cloutier J-F, Lavengood D V., Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD, Geppert M. Neuropilin-2 Is Required In Vivo for Selective Axon Guidance Responses to Secreted Semaphorins. *Neuron* 2000; 25: 29-41

Giger RJ, Urquhart ER, Gillespie SKH, Lavengood D V, Ginty DD, Kolodkin AL. 1998. Neuropilin-2 Is a Receptor for Semaphorin IV: Insight into the Structural Basis of Receptor Function and Specificity. *Neuron* 1998; 21: 1079–1092

Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, Neufeld G. Neuropilin-2 and neuropilin-1 are receptors for the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF) and of placenta growth factor-2, but only neuropilin-2 functions as a receptor for the 145-amino acid form of VEGF. *J Biol Chem* 2000; 275: 18040–18045

Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Shibuya M, Neufeld G. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Neuropilin-2 Form Complexes. *J Biol Chem* 2001; 276: 18688–18694

Goel HL, Bae D, Pursell B, Gouvin LM, Lu S, Mercurio AM. Neuropilin-2 promotes branching morphogenesis in the mouse mammary gland. *Development* 2011; 138: 2969–2976

Goel HL, Chang C, Pursell B, Leav I, Lyle S, Xi HS, Hsieh CC, Adisetiyo H, Roy-Burman P, Coleman IM, Nelson PS, Vessella RL, Davis RJ, Plymate SR, Mercurio AM. VEGF/neuropilin-2 regulation of Bmi-1 and consequent repression of IGF-IR define a novel mechanism of aggressive prostate cancer. *Cancer Discov* 2012; 2: 906–921

González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, DePont Christensen R, Graybill W, Mirza MR, McCormick C, Lorusso D, Hoskins P, Freyer G, Baumann K, Jardon K, Redondo A, Moore RG, Vulsteke C, O’Cearbhaill RE, Lund B, Backes F, Barretina-Ginesta P, Haggerty AF, Rubio-Pérez MJ, Shahin MS, Mangili G, Bradley WH, Bruchim I, Sun K, Malinowska IA, Li Y, Gupta D, Monk BJ. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019; 381: 2391–2402

Gray MJ, Van Buren G, Dallas NA, Xia L, Wang X, Yang AD, Somcio RJ, Lin YG, Lim S, Fan F, Mangala LS, Arumugam T, Logsdon CD, Lopez-Berestein G, Sood AK, Ellis LM. Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 109–120

Greimel E, Kristensen GB, Van Der Burg MEL, Coronado P, Rustin G, Del Rio AS, Reed NS, Nordal RR, Coens C, Vergote I. Quality of life of advanced ovarian cancer patients in

the randomized phase III study comparing primary debulking surgery versus neo-adjuvant chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2013; 131: 437–444

Hapani S, Chu D, Wu S. Risk of gastrointestinal perforation in patients with cancer treated with bevacizumab: a meta-analysis. *Lancet Oncol* 2009; 10: 559–568

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

Harter P, du Bois A, Hahmann M, Hasenburger A, Burges A, Loibl S, Gropp M, Huober J, Fink D, Schröder W, Muenstedt K, Schmalfeldt B, Emons G, Pfisterer J, Wollschlaeger K, Meerpohl HG, Breitbach GP, Tanner B, Sehouli J. Surgery in Recurrent Ovarian Cancer: The Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR Trial. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1702–1710

Harter P, Hauke J, Heitz F, Reuss A, Kommos S, Marmé F, Heimbach A, Prieske K, Richters L, Burges A, Neidhardt G, De Gregorio N, El-Balat A, Hilpert F, Meier W, Kimmig R, Kast K, Sehouli J, Baumann K, Jackisch C, Park-Simon TW, Hanker L, Kröber S, Pfisterer J, Gevensleben H, Schnelzer A, Dietrich D, Neunhöffer T, Krockenberger M, Brucker SY, Nürnberg P, Thiele H, Altmüller J, Lamla J, Elser G, Du Bois A, Hahnen E, Schmutzler R. Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1). *PLoS One* 2017; 12: e0186043

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, Hasenburger 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

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

Herzog Y, Kalcheim C, Kahane N, Reshef R, Neufeld G. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev* 2001; 109: 115–119

Hoshida T, Isaka N, Hagendoorn J, Di Tomaso E, Chen YL, Pytowski B, Fukumura D, Padera TP, Jain RK. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: Therapeutic implications. *Cancer Res* 2006; 66: 8065–8075

Huang J, Chan WC, Ngai CH, Lok V, Zhang L, Lucero-Prisno DE, Xu W, Zheng ZJ, Elcarte E, Withers M, Wong MCS. Worldwide Burden, Risk Factors, and Temporal Trends of Ovarian Cancer: A Global Study. *Cancers (Basel)* 2022; 14: 2230

Immormino RM, Lauzier DC, Nakano H, Hernandez ML, Alexis NE, Ghio AJ, Tilley SL, Doerschuk CM, Peden DB, Cook DN, Moran TP. Neuropilin-2 regulates airway inflammatory responses to inhaled lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018; 315: 202–211

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

Jiang H, Xi Q, Wang F, Sun Z, Huang Z, Qi L. Increased expression of neuropilin 1 is associated with epithelial ovarian carcinoma. *Mol Med Rep* 2015; 12: 2114–2120

Jordan SJ, Green AC, Whiteman DC, Moore SP, Bain CJ, Gertig DM, Webb PM. Serous ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancers: A comparative epidemiological analysis. *Int J Cancer* 2008; 122: 1598–1603

Joseph D, Ho SM, Syed V. Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 499–509

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; 15: 290–298

Mosgaard BJ, Lidegaard O, Kjaer SK, Schou G, Andersen AN. Infertility, fertility drugs, and invasive ovarian cancer: a case-control study. *Fertil Steril* 1997; 67: 1005–1012.

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV., Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004; 5: 74–80

Karlan BY, Lynn Baldwin R, Lopez-Luevanos E, Raffel LJ, Barbuto D, Narod S, Platt LD. Peritoneal serous papillary carcinoma, a phenotypic variant of familial ovarian cancer: Implications for ovarian cancer screening. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 917–928

Kärpänen T, Heckman CA, Keskitalo S, Jeltsch M, Ollila H, Neufeld G, Tamagnone L, Alitalo K. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J* 2006; 20: 1462–1472

Kawakami A, Kitsukawa T, Takagi S, Fujisawa H. Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J Neurobiol* 1996; 29: 1–17

Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Abe Y, Osamura Y, Inoue H, Ueyama Y, Nakamura M. Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 2196–2201

Kindermann G, Maassen V, Kuhn W. Laparoscopic Management of Ovarian Tumors Subsequently Diagnosed as Malignant. *Journal of Pelvic Surgery* 1996; 2: 245–251

Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin Genes Encode a Family of Transmembrane and Secreted Growth Cone Guidance Molecules. *Cell* 1993; 75: 1389–1399

Kondo S, Matsumoto T, Yokoyama Y, Ohmori I, Suzuki H. The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF121) produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis and vascular permeability. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1243: 195–202

Kotsopoulos J, Gronwald J, Karlan B, Rosen B, Huzarski T, Moller P, Lynch HT, Singer CF, Senter L, Neuhausen SL, Tung N, Eisen A, Foulkes WD, Ainsworth P, Sun P, Lubinski J, Narod SA. Age-specific ovarian cancer risks among women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Gynecol Oncol* 2018; 150: 85–91

Kurman RJ, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. in: Kurman RJ, Carcangiu ML, Young RH, Herrington CS, Hrsg. *WHO Classification of Tumors of Female Reproductive Organs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014

Kurman RJ, Shih IeM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer -- shifting the paradigm. *Hum Pathol* 2011; 42: 918-931

Lampe B, Kroll N, Piso P, Forner DM, Mallmann P. Prognostic Significance of Sugarbaker's Peritoneal Cancer Index for the Operability of Ovarian Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2015; 25: 135–144

Lasch L, Fillenberg S. Maligne Tumoren der Adnexe. in: Springer Berlin Heidelberg, Hrsg. *Basiswissen Gynäkologie und Geburtshilfe*. Berlin: Springer, 2017: 94-100

Leitzmann MF, Koebnick C, Danforth KN, Brinton LA, Moore SC, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Lacey JV. Body Mass Index and Risk of Ovarian Cancer. *Cancer* 2009; 115: 812–822

Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *An J Pathol* 2010; 177: 1053–1064.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2022: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 5.1, 2022, AWMF-Registernummer: 032/035OL. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/> (Zugriffsdatum: 13.07.2023)

Liu Z, Zhang TT, Zhao JJ, Qi SF, Du P, Liu DW, Tian QB. The association between overweight, obesity and ovarian cancer: A meta-analysis. *Jpn J Clin Oncol* 2015; 45: 1107–1115

Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001; 20: 672–682

Mendes-da-Cruz DA, Brignier AC, Asnafi V, Baleyrier F, Messias CV, Lepelletier Y, Bedjaoui N, Renand A, Smaniotto S, Canioni D, Milpied P, Balabanian K, Bouso P, Leprêtre S, Bertrand Y, Dombret H, Ifrah N, Dardenne M, Macintyre E, Savino W, Hermine O. Semaphorin 3F and neuropilin-2 control the migration of human T-cell precursors. *PLoS One* 2014; 9: e103405

Messersmith EK, David Leonardo E, Shatz CJ, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Kolodkin AL. Semaphorin III Can Function as a Selective Chemorepellent to Pattern Sensory Projections in the Spinal Cord. *Neuron* 1995; 14: 949–959

Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim B-G, Oaknin A, Friedlander M, Lisyanskaya A, Floquet A, Leary A, Sonke GS, Gourley C, Banerjee S, Oza A, González-Martín A, Aghajanian C, Bradley W, Mathews C, Liu J, Lowe ES, Bloomfield R, DiSilvestro P. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 2495–2505

Muller YA, Chen Y, Christinger HW, Li B, Cunningham BC, Lowman HB, De Vos AM. VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure* 1998; 6: 1153–1167

Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM. Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor Enhances Vascular Permeability Via Nitric Oxide and Prostacyclin. *Circulation* 1998; 97: 99–107

Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* 2014; 41: 49–61

Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1998; 273: 31273–31282

Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982; 5: 649–655.

Olofsson B, Pajusolatt K, Kaipainen A, Von Euler G, Joukovt V, Saksela O, Orpanat A, Pettersson RF, Alitalott K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells (angiogenesis/endothelium/mitosis). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 2576–2581

Olsen CM, Green AC, Whiteman DC, Sadeghi S, Kolaheer F, Webb PM. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2007; 43: 690–709

Osada R, Horiuchi A, Kikuchi N, Ohira S, Ota M, Katsuyama Y, Konishi I. Expression of semaphorins, vascular endothelial growth factor, and their common receptor neuropilins and allelic loss of semaphorin locus in epithelial ovarian neoplasms: increased ratio of vascular endothelial growth factor to semaphorin is a poor prognostic factor in ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 2006; 37: 1414–1425

Pavelock K, Braas K, Ouafik L, Osol G, May V. Differential Expression and Regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptors Neuropilin-1 and Neuropilin-2 in Rat Uterus. *Endocrinology* 2001; 142: 613–622

Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, Nagle CM, Doherty JA, Cushing-Haugen KL, Wicklund KG, Chang-Claude J, Hein R, Lurie G, Wilkens LR, Carney ME, Goodman MT, Moysich K, Kjaer SK, Hogdall E, Jensen A, Goode EL, Fridley BL, Larson MC, Schildkraut JM, Palmieri RT, Cramer DW, Terry KL, Vitonis AF, Titus LJ, Ziogas A, Brewster W, Anton-Culver H, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Anderson R, Brueggmann D, Fasching PA, Gayther SA, Huntsman DG, Menon U, Ness RB, Pike MC, Risch H, Wu AH, Berchuck A. Association between endometriosis and risk of histological

subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet* 2012; 13: 385–394

Pellet-Many C, Mehta V, Fields L, Mahmoud M, Lowe V, Evans I, Ruivo J, Zachary I. Neuropilins 1 and 2 mediate neointimal hyperplasia and re-endothelialization following arterial injury. *Cardiovasc Res* 2015; 108: 288–298

Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Kurzeder C, Bois A du, Sehouli J, Kimmig R, Stähle A, Collinson F, Essapen S, Gourley C, Lortholary A, Selle F, Mirza MR, Leminen A, Plante M, Stark D, Qian W, Parmar MKB, Oza AM. A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer. *New Engl J Med* 2011; 365: 2484–2496

Prat J. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J Gynecol Oncol* 2014; 124: 1–5.

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

Püschel AW. The semaphorins: A family of axonal guidance molecules? *Eur J Neurosci* 1996; 8: 1317–1321

Püschel AW, Adams RH, Betz H. Murine Semaphorin D/Collapsin Is a Member of a Diverse Gene Family and Creates Domains Inhibitory for Axonal Extension. *Neuron* 1995; 14: 941–948

Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, González-Martín A, Berger R, Fujiwara K, Vergote I, Colombo N, Mäenpää J, Selle F, Sehouli J, Lorusso D, Guerra Alía EM, Reinthaller A, Nagao S, Lefeuvre-Plesse C, Canzler U, Scambia G, Lortholary A, Marmé

F, Combe P, de Gregorio N, Rodrigues M, Buderath P, Dubot C, Burges A, You B, Pujade-Lauraine E, Harter P. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019; 381: 2416–2428

Remmele W, Hildebrand U, Hienz HA, Klein PJ, Vierbuchen M, Behnken LJ, Heicke B, Scheidt E. Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on estrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986; 409: 127–147

Robert-Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V; 2019: Krebs in Deutschland für 2019/2020. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html
(Zugriffsdatum: 05.04.2024)

Rossignol M, Gagnon ML, Klagsbrun M. Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: Identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* 2000; 70: 211–222

Roy S, Bag AK, Dutta S, Polavaram NS, Islam R, Schellenburg S, Banwait J, Guda C, Ran S, Hollingsworth MA, Singh RK, Talmadge JE, Muders MH, Batra SK, Datta K. Macrophage-derived neuropilin-2 exhibits novel tumor-promoting functions. *Cancer Res* 2018; 78: 5600–5617

Rushing EC, Stine MJ, Hahn SJ, Shea S, Eller MS, Naif A, Khanna S, Westra WH, Jungbluth AA, Busam KJ, Mahalingam M, Alani RM. Neuropilin-2: A novel biomarker for malignant melanoma? *Hum Pathol* 2012; 43: 381–389

Rustin GJS, Van Der Burg MEL, Griffin CL, Guthrie D, Lamont A, Jayson GC, Kristensen G, Mediola C, Coens C, Qian W, Parmar MKB, Swart AM. Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): A randomised trial. *Lancet* 2010; 376: 1155–1163

Rustin GJS, Marples M, Nelstrop AE, Mahmoudi M, Meyer T. Use of CA-125 to Define Progression of Ovarian Cancer in Patients With Persistently Elevated Levels. *J Clin Oncol* 2011; 19: 4054–4057

Sahay A, Molliver ME, Ginty DD, Kolodkin AL. Development/Plasticity/Repair Semaphorin 3F Is Critical for Development of Limbic System Circuitry and Is Required in Neurons for Selective CNS Axon Guidance Events. *J Neurosci* 2003; 23: 6671–6680

Sakland M. Grading of patients for surgical procedures. *Anesthesiology* 1941; 2: 281–284

Samuel S, Gaur P, Fan F, Xia L, Gray MJ, Dallas NA, Bose D, Rodriguez-Aguayo C, Lopez-Berestein G, Plowman G, Bagri A, Sood AK, Ellis LM. 2011. Neuropilin-2 mediated β -catenin signaling and survival in human gastro-intestinal cancer cell lines. *PLoS One* 2011; 6: e23208

Schweizerische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (SGGG), 2020: Opportunistische Salpingektomie zur Senkung des Ovarialkarzinomrisikos, Expertenbrief Nr. 64.
<https://www.rosenfluh.ch/gynaekologie-2020-04/opportunistische-salpingektomie-zur-senkung-des-ovarialkarzinomrisikos/>
(Zugriffsdatum: 08.04.2025)

Shepherd JH. Revised FIGO staging for gynaecological cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96: 889–892

Sulpice E, Plouët J, Bergé M, Allanic D, Tobelem G, Merkulova-Rainon T. Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood* 2008; 111: 2036–2045

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209–249

Tangjitgamol S, Manusirivithaya S, Laopaiboon M, Lumbiganon P, Bryant A. Interval debulking surgery for advanced epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 10: CD006014

Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddles JC, Abraham JA. Vascular endothelial growth factor: A new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 1198–1206

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947–11954

Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, Franchi M, Tateo S, Zanetta G, Scarfone G, Giurgea L, Timmers P, Coens C, Pecorelli S. Impact of Adjuvant Chemotherapy and Surgical Staging in Early-Stage Ovarian Carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm Trial. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 113–125

Union for International Cancer Control. in: Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th Edition. New York: Wiley Blackwell, 2017

Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, Coukos G, Crum CC, Drapkin R, Etemadmoghadam D, Friedlander M, Gabra H, Kaye SB, Lord CJ, Lengyel E, Levine DA, McNeish IA, Menon U, Mills GB, Nephew KP, Oza AM, Sood AK, Stronach EA, Walczak H, Bowtell DD, Balkwill FR. Rethinking ovarian cancer: Recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 719–725

Vector Laboratories, 2024: Immpress HRP Horse Anti-Mouse IgG Plus Polymer Kit, Peroxidase (MP-7802-15). <https://vectorlabs.com/products/immpress-hrp-horse-anti-mouse-igg-plus-kit>

(Zugriffsdatum: 29.03.2024)

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, Tropé G. C, Dobbs S, Essapen S, Hoskins P, Green J, Gilby E, Van Baal M, Twigg J, Van Der Burg MEL, Godfrey K, Lacave AJ, Angioli R, Nath R, Chin K, Redman C, Lotocki R, Olaitan A, Mosgaard B, Rustin G, Ind T, Persic M, Hogg M, Van Der Velden J, Ledermann J, Peter Sykes PS, Madhavan K, Kannisto P, Hird V, Evans A, Sandvei R. R, Gauthier P, Cruickshank DJ, Ottevanger PB, Pearson S, Kitchener H, Hall M, Bessette P, Pecorelli S, Gerdin E, Lopes T, Fish A, Barlow C, Van Eygen K, Floquet A, Tholander B, Gul N, Gornall R, Luesley D, Kirwan P, Symonds P, Henry R, Poole D, McNeish I, Hocking M, Sammaraie A, Speiser P, Leblanc E, Green JA, De Oliveira CF, Grimshaw R, Zola P, Parkin D, Lamb M, Hong A, Gillespie A, Hamid A, Ahmed A, Plante M, De Valk B, Nordin A, Clamp A, Perez D, Graham Dark GD, Ferguson M, MacGregor C, Skailes G, Jones R, Cawdell G, Leeson S, Elit L, Dittrich C, Gotlieb W, Cullimore J, Crosse B, Ridley P, Head A, Nieto J, Awwad S, Brinkmann D, Eustace D, Hindley A, Katsaros D, Popadiuk C, Kristeller T, Redman C, Chan S, Marth C, Yiannakis D, Lankaster K, Beynon G, Suhail A, Indrajit F, Quigley M, Adeyemi O, Lofts F, McNally O, Tristam A, Lee M, Counsell R, Gleeson N, Papadopoulos A, Maggino T, Honkoop A, Ghatage P, Vermorken JB, De Greve J, Boman K, Petru E. 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, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, Verheijen RHM, Van Der Burg MEL, Lacave AJ, Panici B, Kenter GG, Casado A, Mendiola C, Verleye L, Stuart GCE, Pecorelli S, Reed NS. Neoadjuvant Chemotherapy or Primary Surgery in Stage IIIC or IV Ovarian Cancer. *New Engl J Med* 2010; 363: 943–53

Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, Roeb W, Agnew KJ, Stray SM, Wickramanayake A, Norquist B, Pennington KP, Garcia RL, King MC, Swisher EM. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 18032–18037

Wang F qiang, Barfield E, Dutta S, Pua T, Fishman DA. VEGFR-2 silencing by small interference RNA (siRNA) suppresses LPA-induced epithelial ovarian cancer (EOC) invasion. *Gynecol Oncol* 2009; 115: 414–423

Wang M, Wisniewski CA, Xiong C, Chhoy P, Goel HL, Kumar A, Zhu LJ, Li R, St Louis PA, Ferreira LM, Pakula H, Xu Z, Loda M, Jiang Z, Brehm MA, Mercurio AM. Therapeutic blocking of VEGF binding to neuropilin-2 diminishes PD-L1 expression to activate antitumor immunity in prostate cancer. *Sci Transl Med* 2023; 15: eade5855

Wang Y, Deng W, Liu J, Yang Q, Chen Z, Su J, Xu J, Liang Q, Li T, Liu L, Li X. IKK β increases neuropilin-2 and promotes the inhibitory function of CD9+ Bregs to control allergic diseases. *Pharmacol Res* 2022; 185: 106517

Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis* 2004; 7: 335–345

Wei C. Korrelationskoeffizient nach Spearman. Logrank-Test. in: Springer Berlin Heidelberg, Hrsg. Basiswissen Medizinische Statistik. Berlin: Springer, 2019: 66-70, 163-164

Wittmann P, Grubinger M, Grger C, Huber H, Sieghart W, Peck-Radosavljevic M, Mikulits W. Neuropilin-2 induced by transforming growth factor- β augments migration of hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer* 2015; 15: 909

Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, Morita T. Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) Exhibit Potent Activity through Their Specific Recognition of KDR (VEGF Receptor 2). *J Biol Chem* 2003; 278: 51985–51988

st

Yasuoka H, Kodama R, Hirokawa M, Takamura Y, Miyauchi A, Inagaki M, Sanke T, Nakamura Y. Neuropilin-2 expression in papillary thyroid carcinoma: Correlation with VEGF-D expression, lymph node metastasis, and VEGF-D-induced aggressive cancer cell phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E1857-61

Yasuoka H, Kodama R, Tsujimoto M, Yoshidome K, Akamatsu H, Nakahara M, Inagaki M, Sanke T, Nakamura Y. Neuropilin-2 expression in breast cancer: correlation with lymph node metastasis, poor prognosis, and regulation of CXCR4 expression. *BMC Cancer* 2009; 9: 220

Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular Endothelial Growth Factors. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1015–1026

Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Bréant C, Karkkainen MJ, Alitaro K, Eichmann A. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002; 129: 4797–4806

Yuan Y, Gu ZX, Tao XF, Liu SY. Computer tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography or positron emission tomography/computer tomography for detection of metastatic lymph nodes in patients with ovarian cancer: A meta-analysis. *Eur J Radiol* 2012; 81: 1002–1006

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie des UKB unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea durchgeführt.

Die Ausarbeitung des Projektkonzepts erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Eva Egger, leitender Oberärztin der Klinik, und Herrn PD Dr. med. Michael Muders, der bis Juni 2022 als Oberarzt am Institut für Pathologie des UKB tätig war. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Sarah Förster von mir eigenständig durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde in Zusammenarbeit mit Frau PD. Dr. med. Eva Egger, Frau Dr. med. Lina Adloff und Herrn PD Dr. med. Michael Muders zusammengestellt. Weiter halfen Herrn Carsten Golletz und Frau Christiane Esch bei der Beschaffung der Materialien für die Durchführung der immunhistochemischen Färbung.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Unterstützung von Herrn Markus Schmidt.

Im Zuge der Texterstellung diente ChatGPT-4o der Überprüfung orthografischer Korrektheit. Nach dem Einsatz dieses Tools habe ich die betreffenden Textstellen überprüft und übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertation.

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

10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea für die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas.

Mein Dank gilt Frau PD Dr. med. Eva Egger für die umfangreiche Betreuung seit Beginn der klinischen Datenerhebung bis hin zur Fertigstellung dieser Promotion.

Herrn PD Dr. med. Michael Muders möchte ich für die Hilfestellung bei der Auswahl der Präparate danken.

Besonders danke ich Frau Dr. Sarah Förster für die umfangreiche Unterstützung während der Laborarbeiten und auch über diesen Rahmen hinaus. Ihre Vorschläge und Geduld haben maßgeblich zur praktischen Umsetzung dieses Projekts beigetragen.

Großer Dank gebührt Herrn Carsten Golletz und Frau Christiane Esch für die Bereitstellung der Gewebelöcke sowie die Hilfe bei der Anfertigung geeigneter Gewebeschnitte.

Darüber hinaus danke ich Alexander Burgmayr, der mir stets Mut gemacht hat.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinen drei Geschwistern, die immer an mich glauben.

Danke.