

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

**Vorläuferläsionen im Tubenepithel bei Patientinnen mit
high-grade serösen Ovarialkarzinomen - Rolle der
tumorinfiltrierenden Lymphozyten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wenz, Svetlana
geb. Zauzolkova

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. A. Staebler

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ebinger

Tag der Disputation: 19.12.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung.....	6
1.1 Epidemiologie.....	6
1.2 Tumorentitäten im Ovar mit einem Fokus auf epitheliale Neoplasien ...	9
1.3 Aktuelle Entstehungstheorie der high-grade serösen Ovarialkarzinome und STIC-Charakterisierung.....	12
1.4 Rolle der tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten in dem serösen high-grade Ovarialkarzinom	18
1.5 Ziele dieser Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Kollektiv und Auswertung der bereits durchgeführten p53-Färbung....	22
2.2 Immunhistochemie	27
2.2.1 Allgemeine Immunhistochemie	27
2.2.2 Immunhistochemische Färbungen von CD3, CD8 und CD103	28
2.3 Auswertung der Expression von CD3, CD8 und CD103 Antikörper manuell und anhand digitaler Bildanalyse	30
2.4 Statistische Auswertung	35
3 Ergebnisse.....	36
3.1 p53 Expressionsstatus im Kollektiv	36
3.2 Immunhistochemische Darstellung verschiedener Subpopulationen der T-Lymphozyten.....	36
3.3 Statistische Unterschiede und Korrelation der Lymphozytenzahl in normalem Epithel, STIC und invasivem Karzinom	41
4 Diskussion	50

Zusammenfassung	57
Tabellenverzeichnis	59
Bilderverzeichnis	60
Literaturverzeichnis	62
A Anhang	68
A.1 TNM und FIGO-Klassifikation der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms.....	68
Erklärung zum Eigenanteil	70
Danksagung	71

Abkürzungsverzeichnis

STIC	Engl.: serous tubal intraepithelial carcinoma
TP53	Tumorsuppressorgen 53
Ki-67	Antigen Ki 67
IHC	Immunhistochemie
DAB	Diaminobenzidin
SA-HRP	Konjugierte Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Lösung
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
TRIS	Trishydroxymethylaminometan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FIGO	Franz.: Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
TILs	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
5-JÜR	Fünf-Jahres-Überlebensrate
WHO	Engl.: the World Health Organization
HGSC	Engl.:high grade seruos carcinoma
LGSC	Engl.:low grade seruos carcinoma
BRCA	Engl.: Breast cancer Antigen
MHC-Klasse-I-Molekül	Engl.: Major Histokompatibility Complex
TMA	Engl.: Tissue microarrays
PD-1	Engl.: Programmed cell death protein 1
PD-L1	Engl.: Programmed cell death 1 ligand 1

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom oder Eierstockkrebs ist eine bösartige Erkrankung der Eierstöcke. Nach dem Mammakarzinom, den Lungen-, Darm- und Gebärmuttertumoren steht das Ovarialkarzinom in Deutschland [1] und in den USA [2] an fünfter Stelle – weltweit an siebter Stelle [3] – als Todesursache bei Frauen. Dabei zeigen besonders die serösen Ovarialkarzinome einen sehr aggressiven Verlauf mit rascher peritonealer Ausbreitung. Deswegen zählt diese Entität zu den aggressivsten malignen epithelialen Tumoren bei Frauen [4].

Nach Schätzungen des Robert Koch-Instituts und laut der im klinischen Krebsregister zusammengeführten Daten tritt der Eierstockkrebs jährlich in Deutschland mit einer Inzidenz von 7790 Neuerkrankungen auf. Die hohe Sterberate beim Ovarialkarzinom beträgt 7,5 pro 100.000 Fälle. In den Jahren 2009/2010 wurden 5599 Sterbefälle konstatiert. Frauen erkranken an Eierstockmalignomen im Medianalter von 68 Jahre. Das gesamte 5-Jahres-Überleben bei Ovarialtumoren in Deutschland liegt bei 42,6%. [1] (Tabelle 1.1)

In der Abbildung 1.1 ist die Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Diese Kurve zeigt das prozentuale relative Überleben bei serösen und muzinösen Ovarialkarzinomen in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium (vgl. Anhang: FIGO-Klassifikation) und der Histologie.

Bei serösen Ovarialkarzinomen zeigt sich folgende Überlebensrate:

- Bleibt der Tumor auf Ovarien begrenzt, d.h. das Stadium FIGO I, beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) ca. 85%.
- Im Stadium FIGO II - also bei weiterer Ausbreitung des Tumors im kleinen Becken - liegt die 5-JÜR bei ca. 75%.

- Beim Tumorbefall eines oder beider Ovarien, bei weiterer Progression des Ovarialkarzinoms mit histologisch nachgewiesenem peritonealem Aussaat außerhalb des kleinen Beckens und/oder mit Ausbildung der Lymphknotenmetastasen (FIGO-Stadium III) sinkt die 5-JÜR auf ca. 35%.
- Im Stadium FIGO IV beträgt die 5-JÜR ca. 18-20%.

Bei fortgeschrittenem Stadium und hohem Alter der Patientinnen ist diese Diagnose mit sehr schlechter Prognose assoziiert. Deswegen spielt die Früherkennung dieser Erkrankung im Initialstadium eine sehr wichtige Rolle.

Tabelle 1.1: Zusammenstellung der statistischen Daten mit Inzidenz und Mortalität der 24 häufigsten Krebserkrankungen der Frauen in Deutschland [1]

Lokalisation	ICD-10	Neuerkrankungen ^b	Erkrankungsrate ^b	Sterbefälle ^b	Sterberate ^b	Alter ^{c,d}	2-/5-Jahres-Überleben (%) ^{c,d}		10-Jahres-Prävalenz ^{c,d}
		Anzahl	Pro 100.000	Anzahl	Pro 100.000	Median [10 %-, 90 %-Perzentile]	Gesamt	Relativ	
Mundhöhle und Rachen	C00–C14	3490	5,9	1204	1,8	64[48,84]	74,2/60,2	76,4/64,3	5,9
Speiseröhre	C15	1420	2,1	1142	1,7	69[53,85]	29,5/25,4	32,8/26,4	2,1
Magen	C16	6690	8,5	4400	5,1	77[55,89]	41,1/29,7	44,1/34,3	3,5
Darm	C18–C21	28.630	36,8	12.510	13,9	74[54,88]	70,7/56,3	75,9/66,6	5,9
Leber	C22	2480	3,2	2534	3,0	74[56,87]	26,3/14,1 ^d	27,4/15,3 ^d	2,1
Gallenblase und -wege	C23, C24	3070	3,7	2041	2,3	77[60,89]	27,2/15,3 ^d	29,2/17,5 ^d	2,1
Bauchspeicheldrüse	C25	8060	10,0	7950	9,5	76[59,88]	21,7/8,4	22,5/9,1	1,4
Kehlkopf	C32	460	0,8	188	0,3	64[49,81]	74,3/58,4 ^d	76,4/62,7 ^d	6,4
Lunge	C33, C34	17.030	26,5	13.627	19,8	69[53,84]	33,6/18,3	34,7/19,9	2,3
Malignes Melanom der Haut	C43	9580	17,8	1143	1,6	60[35,82]	93,7/86,9	96,9/94,0	8,7
Mesotheliom	C45	350	0,5	298	0,4	72[55,85]	30,7/– ^d	30,8/– ^d	1,9
Brustdrüse	C50	70.340	119,6	17.466	24,0	64[45,83]	92,0/81,7	95,1/88,3	8,1
Vulva	C51	3190	4,6	749	0,8	75[50,88]	74,9/58,1	80,3/67,6	5,8
Gebärmutterhals	C53	4660	9,3	1524	2,5	52[35,81]	76,8/66,5	78,0/68,5	7,0
Gebärmutterkörper	C54	11.550	17,7	2432	3,0	69[53,84]	85,1/74,1	88,7/82,4	7,5
Eierstöcke (ohne Borderline)	C56	7790	12,1	5599	7,5	68[47,85]	65,6/42,6	67,6/46,2	4,6
Niere	C64	5570	8,2	2151	2,4	72[54,85]	83,4/73,7	86,6/81,5	7,1
Harnblase	C67	4150	5,0	1885	1,9	78[59,90]	49,1/45,8	53,0/52,0	4,4
ZNS	C70–C72	3030	5,2	2559	3,9	66[35,83]	37,7/25,5	38,1/26,0	3,4
Schilddrüse	C73	4220	8,7	431	0,5	53[33,74]	96,2/94,6	97,2/96,9	9,2
Morbus Hodgkin	C81	940	2,2	147	0,2	38[19,77]	91,5/87,4 ^d	92,2/89,1 ^d	8,9
Non-Hodgkin-Lymphome	C82–C85	7640	11,2	2921	3,3	71[48,86]	71,7/60,7	75,4/67,9	6,4
Multipl. Myelom	C90	2780	3,7	1850	2,2	74[57,86]	62,8/36,4	65,1/39,4	4,4
Leukämien	C91–C95	4920	7,7	3304	4,0	73[40,88]	65,2/48,5	68,2/53,5	5,6
Sonstige Lokalisationen		12.880	18,4	10.348	12,4	73[48,89]	54,9/40,9	57,3/44,8	4,4
Insgesamt (ohne C44)	C00–C97	224.910	349,1	100.403	127,9	68[46,86]	73,3/61,6	76,4/67,7	6,4

^{C44} andere maligne Neoplasmen der Haut, ^{ICD-10} „International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th revision“, ^{ZNS} zentrales Nervensystem³Nach Schätzungen des Robert Koch-Instituts für 2010 [1] bzw. Ergebnissen des TRM (Tumregister München [6])⁶Krebs in Deutschland 2009/2010 [1]^{c,d}Ergebnisse des TRM [6]; ^cKohorte 2007–2013; ^dKohorte 1998–2013

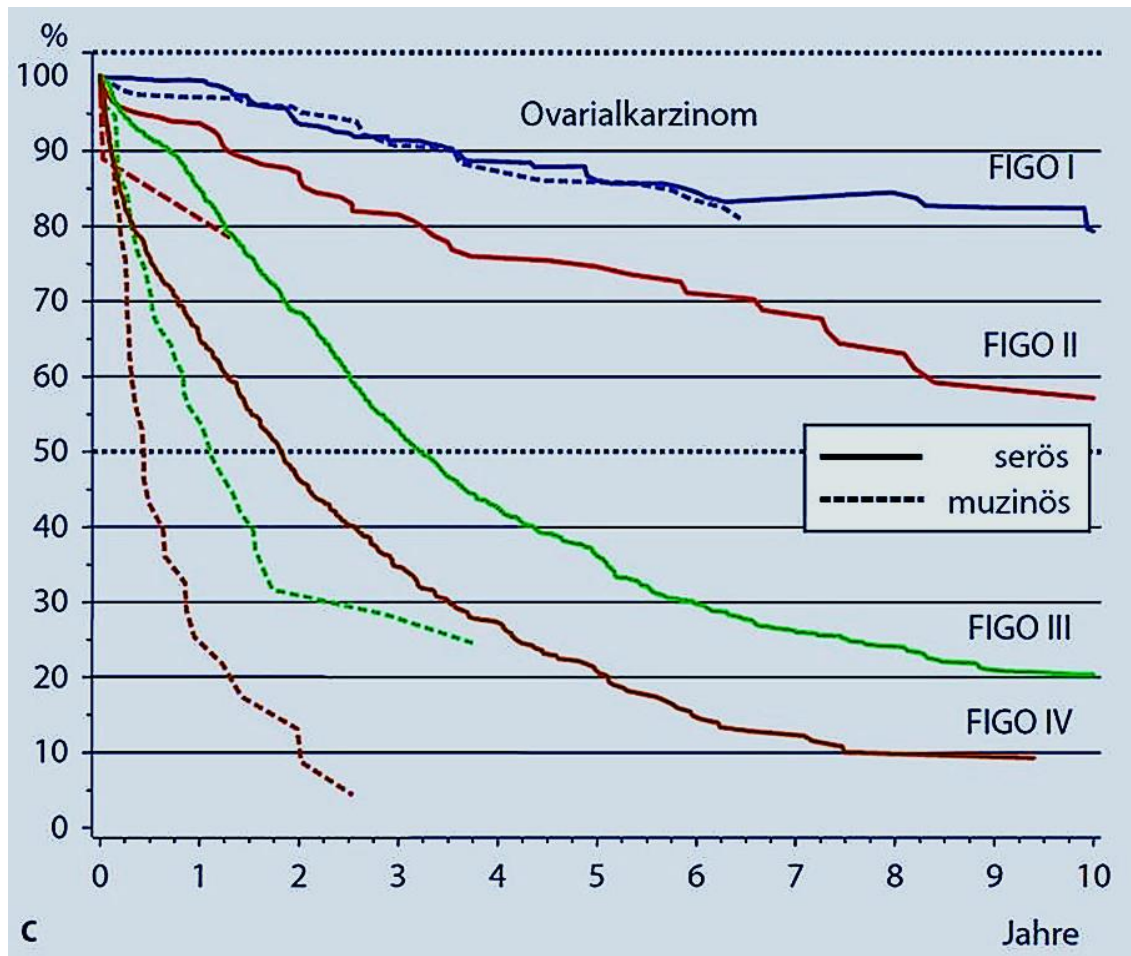


Abbildung 1.1: Prozentuales relatives Überleben beim Ovarialkarzinom in Abhängigkeit vom FIGO*-Stadium und der Histologie (serös und muzinös) (n=2606) [1]. *, „Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique“.

1.2 Tumorentitäten im Ovar mit einem Fokus auf epitheliale Neoplasien

In der aktuellen WHO-Klassifikation der ovariellen Neoplasien unterscheidet man folgende Entitäten:

- Epitheliale Tumore,
- Keimzelltumore,
- Keimstrang-Stroma-Tumore,
- Mesenchymale Tumore und
- Metastase im Ovar mit Primarius in anderen Organen.

Außerdem unterscheidet man in der Gruppe der epithelialen Neoplasien zwischen benignen Tumoren, Borderline-Tumoren und malignen Neoplasien.

Die epithelialen Ovarialkarzinome werden nach Zelltyp wie folgt unterteilt:

- seröse high-grade (70%),
- seröse low-grade (5%),
- klarzellige (10%),
- endometrioid (10%),
- muzinöse (3%),
- transitionalzellige oder Brenner-Tumore, gemischte sero-muzinöse und undifferenzierte Ovarialkarzinome (2%) [5, 6].

Durch eine systematische mikroskopische und klinische Analyse einer großen Anzahl epithelialer Neoplasien im Ovar entstand ein dualistisches Modell der Pathogenese von Ovarialkarzinomen.

In diesem Modell sind alle epitheliale Ovarialtumore in zwei Gruppen unterteilt: Typ-1- und Typ-2-Karzinome [7]. Als Prototyp bei Typ-1-Tumoren gilt low-grade seröses, bei Typ-2-Tumoren gilt als Prototyp high-grade seröses Karzinom [7-9]. Lange Zeit hielt man das oberflächliche Müller-Epithel als Entstehungsort beider Karzinom-Typen (Abbildung 1.2).

Zum Typ-1-Karzinomen gehören: low-grade seröse, muzinöse, klarzellige Karzinome und maligner Brenner-Tumor. Aktuell wird angenommen, dass das invasive low-grade seröse Karzinom entweder von serösem Cystadenom oder vom Adenofibrom oder einem Endometrioseherd ausgehen kann. Seine Pathogenese stellt sich in der weiteren Entwicklung als Proliferation der Epithelzellen dar, mit maligner Umwandlung in einen serösen Borderline-Tumor und bei der weiteren Progression in ein invasives low-grade seröses Karzinom. Man spricht dann über sogenannte Borderline-Tumor-Karzinom-Sequenz. [7, 8] (Abbildung 1.2)

Diese Entität ist durch ein langsames Wachstum, hohe Differenzierung und ein indolentes Verhalten charakterisiert [7, 8]. Das Typ-1-Karzinom umfasst mehrere Tumorentitäten mit unterschiedlichen biologischen Ereignissen. Zu diesen biologischen Ereignissen zählen insbesondere Mikrosatelliten-Instabilität und Mutationen in unterschiedlichen Genen, wie z.B. in KRAS, BRAF, β -Catenin, PTEN, ARID1A Genen sowie relativ geringe chromosomale Störungen [8].

Zum Typ-2-Karzinomen gehören high-grade seröse, maligne Müller-Mischtumore und undifferenzierte Karzinome. Die traditionelle Vorstellung war, dass das oberflächliche Müller-Epithel oder die ovarielle Inklusionszysten mit bösartiger Umwandlung der Epithelzellen [4, 7] eine entscheidende Rolle in de novo Pathogenese spielen (Abbildung 1.2). Es wurden allerdings keine überzeugenden Vorläufer im Ovar oder im Peritoneum identifiziert. Die aktuellsten molekularpathologischen Untersuchungen zeigten jedoch keine genomische Anomalien im ovariellen Oberflächenepithel oder in den ovariellen Einschlusszysten [10]. Die Typ-2-Tumore sind durch geringe Differenzierung, aggressiven Verlauf und schnelle Metastasierung gekennzeichnet [7]. Ein großer Teil dieser Tumore ist aktuell auf Vorläuferläsionen wie STIC (Engl.: serous tubal intraepithelial carcinoma) in Tuben zurückzuführen

Charakteristisch für das high-grade seröse Karzinom (engl.:HGSC) ist seine ungewöhnliche hohe chromosomale Instabilität [8, 11, 12] mit Aberrationen in den Chromosomen 1q, 5q, 8q, 18q, 22q [7, 12-14] sowie nachgewiesene DNA-Amplifikationen und Deletionen [15]. Typisch ist eine ubiquitäre somatische TP53-Mutation bei der HGSC.

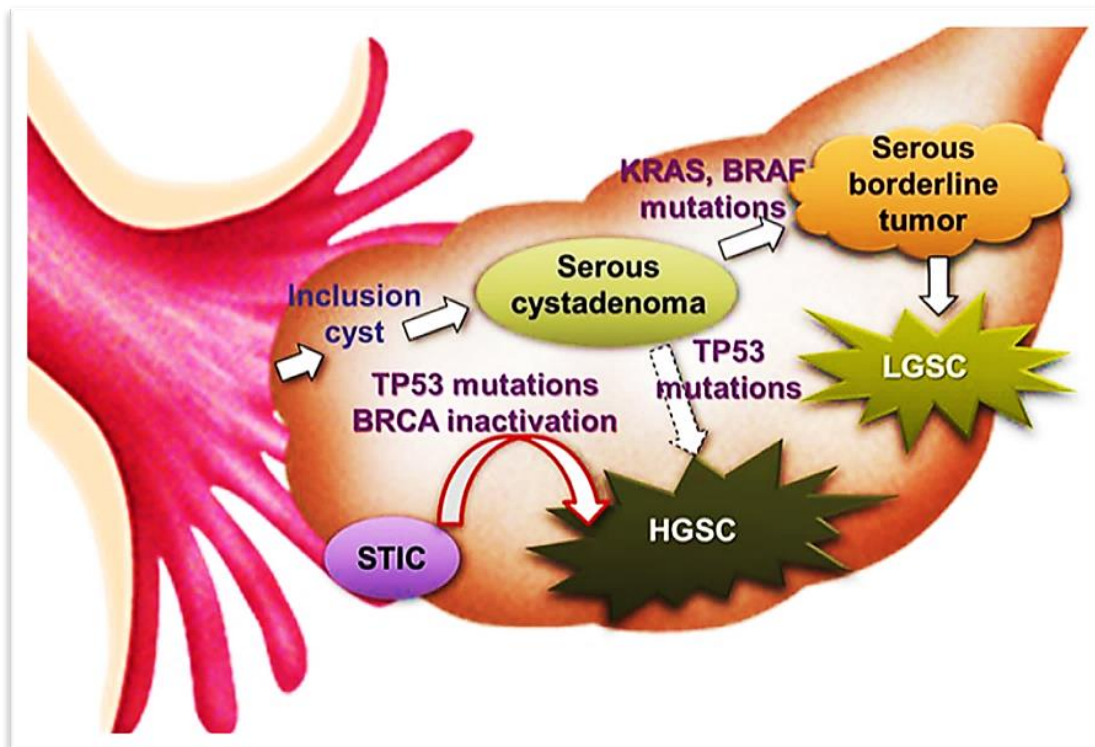


Abbildung 1.2: Entstehungsmodell und Progressionswege der low-grade (LGSC) und high-grade (HGSC) serösen Karzinome. LGSC entstehen von einem stufenweise entwickelten serösen Borderline-Tumor, oft mit Nachweis assoziierter BRAF- und KRAS-Mutationen. Für Entstehung von HGSC ist TP53-Mutation verantwortlich, außerdem besteht es hohes Entstehungsrisiko bei BRCA*-Genen-Inaktivierung. Laut früherer Theorie entstehen die Typ2-Tumore aus einer Inklusionszyste mit Ausbildung eines serösen Zystadenoms und weiterer bösartiger Umwandlung in das invasive Karzinom. Ein großer Teil dieser Tumore ist aktuell auf Vorläuferläsionen wie STIC in Tuben zurückzuführen. [13] *Breast cancer Antigen.

1.3 Aktuelle Entstehungstheorie der high-grade serösen Ovarialkarzinome und STIC-Charakterisierung

Interessanterweise stellen invasive high-grade seröse Karzinome im Ovar, in Tuben und im Peritoneum mehrere maligne Neoplasien dar. Diese Neoplasien entstehen an unterschiedlichen anatomischen Orten mit sehr ähnlichem Wachstum und klinischem Verlauf, aber ohne derzeit bekannte Ursprungszelle [9]. In früheren Zeiten wurden die meisten serösen high-grade Tumore des kleinen Beckens wegen ihrer hoher Inzidenz in diesen Lokalisationen entweder als Ovarialkarzinome oder als primäre Peritonealkarzinome eingestuft [16, 17]. Wichtiges Hauptkriterium beim Peritonealkarzinom ist nach wie vor, dass sich die Haupttumormassen mit entsprechender Morphologie im Peritoneum

befinden [9, 18]. Bei Diagnosefeststellung dieser Peritonealkarzinome wurde die Beteiligung des Eileiters als Metastase interpretiert. Im Gegensatz dazu stellte sich das primäre high-grade seröse Tubenkarzinom als eine extreme Rarität dar [19]. Lange Zeit konnte ein Tubenkarzinom nur in Fällen bei einem eindeutigen Nachweis von Haupttumormassen im Salpinx festgestellt werden [20, 21].

Es gab keine evidenzbasierten Kriterien für die Unterscheidung der primären Tubenkarzinome von lokalen Metastasen in den Tuben bei Ovarialkarzinom. Später berichtete die Weltgesundheitsorganisation (engl.: WHO) - basierend auf Ergebnissen von einigen Fallkontroll-Studien der BRCA1/2-Mutationsträgerinnen - über eine direkte Rolle der Tuben in der Entwicklung von zumindest einigen dieser high-grade serösen Karzinome. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei den Risiko-Patientinnen und Frauen mit gesicherten epithelialen Neoplasien im kleinen Becken ein Standardverfahren mit kompletter mikroskopischer Untersuchung beider Tuben empfohlen. [18, 19, 22, 23] (Abbildung 1.3)

Im Rahmen der prophylaktischen risikoreduzierenden Salpingo-Oophorektomie wurden die STIC-Läsionen zuerst bei Frauen mit familiärer Belastung durch BRCA1/2-Keimbahnmutationen entdeckt [4, 22, 24, 25]. Diese Maßnahmen ergaben außerdem, dass die Inzidenz von okkulten Tubenkarzinomen deutlich höher war [8, 26, 27].

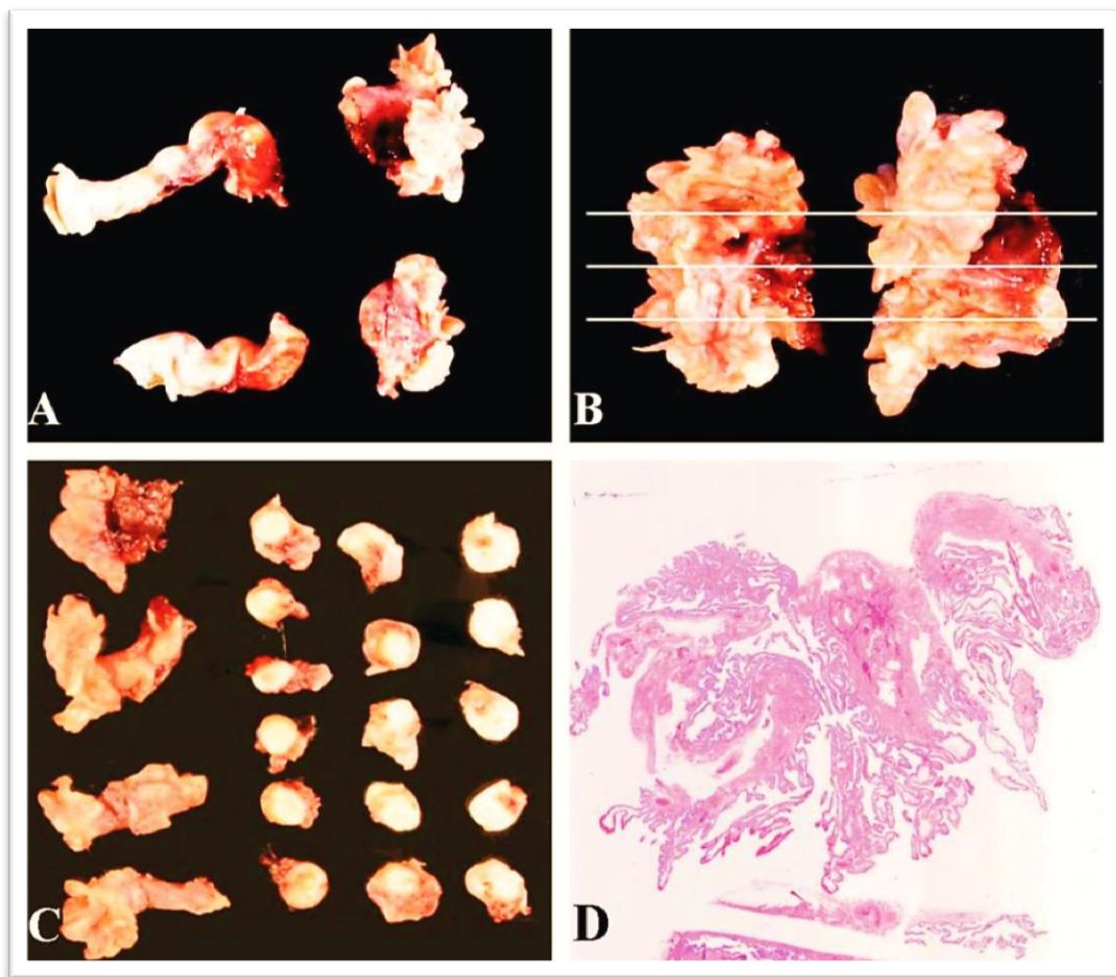


Abbildung 1.3: Protokoll kompletter ausführlicher Inspektion und mikroskopischer Untersuchung der Tuben. Der Fimbrientrichter wird von restlichem Tubenanteil abgesetzt (A) und längs in der gezeigten Richtung geschnitten (B). Der restliche Tubenanteil wird in Querschnitten mit 2-3 mm großem Intervall geschnitten (C). Histologisch zeigen sich zahlreiche Plicae der Schleimhaut im Fimbrientrichterbereich (D). [19]

Fast gleichzeitig wurden in unterschiedlichen Studien koexistierende STIC-Läsionen in 48% [9] bis 50-65% der Fällen [16, 17] mit histologisch identischer sporadischer HGSC beschrieben [9, 14, 16, 17, 28-30]. So wurden die STICs als Vorläuferläsionen für Typ-2-Ovarialkarzinome mit einem Entstehungsort in der Tube genannt [4, 5, 9, 16, 17, 26, 28, 30, 31].

Es ist wichtig zu vermerken, dass in diesen Studien der ausgedehnte Tubenbefall bei fortgeschrittenen HGSC als Metastase in Tuben interpretiert und deshalb aus weiterer Untersuchung ausgeschlossen wurde. Maßgebend für diesen Ausschluss waren folgende Kriterien: Bilateralität, oberflächliches

plaqueartiges oder knotiges Wachstum der Tumorealeen in Tuben [16, 17]. So wurde die Tube und insbesondere der tubale Fimbrientrichter [32] (bis zu 93% aller untersuchten Fälle [9]) zum ersten Mal als anatomische Lokalisation für Entwicklung der Vorläufer-Läsionen high-grade seröser Karzinome des kleinen Beckens betrachtet auch ohne genetische Prädisposition im Hintergrund [33, 34]. Argumentiert wurde es dadurch, dass der Fimbrientrichter einen direkten Kontakt zum Mesothel des kleinen Beckens hat und sich in unmittelbarer Nähe der Eioberfläche bei Eisprung befindet [13, 19]. Zu diesem Zeitpunkt war es theoretisch denkbar, dass eine regionspezifische Empfindlichkeit für die Entstehung von tubalen intraepithelialen Karzinomen besteht [19]. Im Kontrast dazu untersuchte eine aktuelle Studie zahlreiche inzidentelle STIC-Läsionen in einem großen Untersuchungskollektiv und zeigte, dass die Prävalenz von zufällig entdeckten STICs bei über 50 Jahre alten Frauen ohne genetische Prädisposition doch sehr gering ist [35].

Histologisch besteht die normale Tubenschleimhaut aus drei Zelltypen: ziliotragenden, sekretorischen und Stiftchenzellen. Die letzten werden als entleerte sekretorische Zellen oder als zugrunde gehende Zellen definiert. Die häufigste sind ziliotragende Zellen, gefolgt von sekretorischen Zellen, die zusammen über 90% der epithelialen Zellpopulation ausmachen. Außerdem intraepithelial zeigen sich eingestreute Lymphozyten an der epithelial-stromalen Übergangsstelle [23].

Es gibt Meinungen, dass sich ein großer Teil der HGSC aus sekretorischen Eileiterepithelzellen entwickelt [14, 17, 23, 36]. So erstellte Karst et al. [16] ein experimentelles Mausmodell der menschlichen HGSC mit Isolierung der sekretorischen Zellen aus gesunden menschlichen Tuben, mit Erzeugung transformierter Zellen durch eine bestimmte Onkogenen-Wirkung (z.B. c-Myc). Die dabei hervorgegangenen Zellen waren immunhistochemisch, morphologisch und genetisch den menschlichen HGSC ähnlich. Diese Zellen wurden in die Mäuse implantiert und zeigten das invasive Wachstum einer gering differenzierten epithelialen Neoplasie mit Expression von PAX-8, WT-1,

aberranter Expression von p53-Antikörper und sehr hoher Proliferationsaktivität in der Mib-1-Färbung. Eine DNA-Analyse der Tumorzellen ergab schwere genomische Aberrationen, die sehr stark an solche in den Tumorzellen des humanen serösen high-grade serösen Karzinoms erinnern. [16]

Die Diagnostik einer STIC-Läsion basiert hauptsächlich auf ausgeprägten Zellatypien, Verlust der Zellpolarität, Kerngrößenschwankungen mit Hyperchromasie und unregelmäßiger Kernmembran, erhöhter Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns, Verlust der Zilien und gelegentlich Mitosefiguren [23]. Immunhistochemisch werden die STICs aufgrund eines entsprechenden Expressionsprofils der etablierten Marker verifiziert:

- 1) aberrante Expression von p53-Antikörper, das bedeutet entweder Überexpression in >60% [5] - >75% der Zellen [19], oder kompletter Ausfall der Färbung (<5% positiver neoplastischer Zellen [5]);
- 2) nukleäre Expression von Mib-1-Proliferationsmarker in >70-75% [19, 23] bis >80% [4] der Zellen.

Dabei gilt eine aberrante Expression von p53-Antikörper als Surrogat-Marker für Nachweis von TP53-Mutationen [5, 32]. Die nachgewiesene Missense-Mutation in kodiertem TP53-Tumorsuppressorgen führt zur Akkumulation des mutierten p53-Proteins und zu seiner Überexpression mit starker nukleärer Färbung [19, 26]. Während die Nonsense-Mutation in diesem Gen die Erkennung des Proteins durch den Antikörper verhindert, was immunhistochemisch als komplett fehlende Expression imponiert [23, 26]. Als Ereignis der TP53-Mutation zeigt sich ein progressiver Verlust der Zellzykluskontrolle [4]. Dadurch wird eine Kaskade von molekularen Veränderungen mit unkontrollierter Zellteilung und Verhinderung der Zellapoptose initiiert [32].

Zusammenfassend zeigten die früheren Studien von STIC mittels PCR-Analyse nachgewiesene DNA-Schädigung und identische somatische TP53-Mutationen in den STIC-Läsionen der nichtneoplastischen Tuben bei BRCA1/2-Mutationsträgerin [4, 27] und auch in allen STIC-Läsionen mit assoziiertem invasivem Karzinom [4, 9, 37]. Diese Ergebnisse unterstützen die

Entstehungstheorien der serösen high-grade serösen Karzinomen des kleinen Beckens aus einer Vorläuferläsion in distalem Tubenanteil [10, 28, 38, 39].

Darüber hinaus wurde die sogenannte p53-Signatur als Vorstufe der STIC-Läsion vorgeschlagen [4, 40].

Die Inzidenz von p53-Signatur dominiert im distalen Fimbrientrichter des Eileiters [37]. Definitionsmäßig sind das mindestens 12 aufeinander folgende nicht neoplastische zilienträgende und sekretorische Zellen mit aberranter p53-Expression wie bei einer STIC-Läsion, jedoch ohne gesteigerte Proliferationsaktivität [4, 19, 23, 37, 40]. Das Epithel ist in dieser Läsion hyperplastisch mit geringer Kerngrößenschwankung. Eine Pseudostratifizierung ist dabei nicht ausgeschlossen. Es zeigt sich eine niedrige Proliferationsaktivität, typischerweise in einem Intervall von <10% [23] bis <25% [37]. Lee et al. berichtete über z.T. STIC-assoziierte p53-Signaturen mit identischen somatischen TP53-Mutationen bei der BRCA-Mutationsträgerinnen [4, 37]. Allerdings hat die p53-Signatur bis heute klinisch keine signifikante Bedeutung verdient, vor allem aufgrund eines relativ häufigen Vorkommens in den sonst unauffälligen nicht neoplastischen Tuben [23]. Außerdem war die pathogenetische Beziehung zwischen STIC-Läsion und p53-Signatur bis jetzt unklar [8].

Eine neue Studie publizierte evolutionäre Ergebnisse, die mittels Whole-Exome Sequencing eine progressive Zunahme der klonalen Veränderungen nachgewiesen hat und lineare Entwicklung invasiver seröser high-grade Karzinome aus dem tubalen Epithel zu p53-Signatur, zu STIC-Läsion und weiter zu invasiver Neoplasie zeigte. Bemerkenswert in dieser Arbeit ist, dass die Autoren einen Zeitraum der Progression von STIC zum Ovarialkarzinom in den Fällen, die sie analysiert haben, im Durchschnitt von 6,5 Jahre definierten. [10]

1.4 Rolle der tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten in dem serösen high-grade Ovarialkarzinom

Ein invasiver solider Tumor stellt histologisch ein komplexes Zellmilieu dar, welches außer Tumorzellen noch andere Komponenten - wie Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen - umfasst. Es wurde beobachtet, dass manche Tumore mit einem starken intratumoralen lymphozytären Infiltrat einhergehen. Die Anwesenheit von tumorinfiltrierenden Lymphozyten z.B. bei Mammakarzinom, Ösophaguskarzinom, Prostatakarzinom und Melanom korrelierte mit dem klinischen Verlauf der untersuchten Patienten und war mit einer besseren Prognose assoziiert [41-44]. Früher wurde auch Immunantwort und Korrelation zwischen Lymphozyten-Infiltration und histopathologischen Subtypen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom untersucht [45, 46].

Zahlreiche Studien zeigten, dass ein assoziiertes intratumorales entzündliches Infiltrat bei vielen menschlichen Tumoren aus T-Lymphozyten wie T-Helferzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten sowie aus den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), B-Lymphozyten und Makrophagen besteht [47, 48]. Außerdem spiegelt der Nachweis von Immunzellen in der Tumormikroumgebung nicht immer ein günstiger Verlauf mit guter Prognose wider [49]. Bestandteile des Immunsystems - wie z.B. regulatorische CD4+ T-Lymphozyten - hemmen die adaptive Immunantwort, können die Tumorangiogenese fördern und unterstützen damit das Überleben der neoplastischen Zellen, sowie weiteres Tumorwachstum und Metastasierung [50, 51].

Zhang et al. [52] identifizierte zum ersten Mal CD3+ T-Lymphozyten intratumoral bei HGSC mit proportionaler erhöhter Expression von Interferon- γ , Interleukin-2 und Chemokinen. Später untersuchte Helal et al. [53] tumorinfiltrierendes entzündliches Infiltrat in zahlreichen gutartigen und bösartigen Eierstocktumoren und zeigte auf, dass die CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten signifikant höher in bösartigen Eierstocktumoren und vor allem in serösen Ovarialkarzinomen vorkommen.

Man geht davon aus, dass das Ovarialkarzinom vom körperlichen Immunsystem relativ früh erkannt wird. Möglicherweise spielen die zytotoxischen T-Lymphozyten bei der Tumorzelleneliminierung eine entscheidende Rolle [54]. Die zytotoxische CD8+ tumorinfiltrierende Lymphozyten zusammen mit Makrophagen bilden einen Hauptbestandteil entzündlicher Zellpopulation [53, 55, 56]. Dabei erkennen Oberflächenrezeptoren der zytotoxischen T-Lymphozyten bestimmte tumorassoziierte Antigene, welche über MHC-Klasse-I-Moleküle (engl.: Major Histokompatibility Complex) präsentiert werden. Diese T-Zellen sind in der Lage die antigenexprimierende Zielzellen direkt zu töten. In vorliegender Arbeit sowie auch in anderen Veröffentlichungen wird vermutet, dass das seröse high-grade Ovarialkarzinom unterschiedliche Antigene - einschließlich Neoantigene - exprimiert und damit eine spezifische zelluläre Immunantwort hervorruft [57, 58].

Die fortgeschrittene high-grade seröse Ovarialkarzinome wurden in einer Studie dahin gehend untersucht, ob gewisse intrinsische Tumoraggressivität durch Beurteilung von Proliferationsaktivität und die Bestimmung der intratumoralen T-Zellinfiltration für therapeutische Entscheidungen nach Durchführung einer chirurgischen Tumorreduktion nützlich sein kann. Interessanterweise war ein starkes intratumorales CD3+ und CD8+ T-Zellinfiltrat eher bei aggressiven high-grade Ovarialkarzinomen mit hohem Proliferationsindex und nicht bei indolenten Tumoren zu sehen. [57]

Sehr wichtig bei dieser Konstellation ist die prognostische Bedeutung von TILs (tumorinfiltrierende Lymphozyten) in einer großen Subgruppe von HGSC, wo nachweislich eine hohe Zahl von TILs mit einer günstigeren krankheitsspezifischen Prognose korreliert [59]. So berichtete Zhang et al. [52] über einen signifikanten Unterschied des progressionsfreien und des gesamten Überlebens zwischen Ovarialkarzinomen mit oder ohne tumorinfiltrierenden Lymphozyten. Allerdings sind die HGSC mit hoher Zahl von TILs mit verlängertem Überleben assoziiert [53, 57, 59-62]. In letzter Zeit wird in dieser Subgruppe von Karzinomen mit deutlicher immunogener Reaktion eine

individualisierte Immuntherapie diskutiert. Einige Studien [58, 62] zeigten bei Ovarialkarzinomen zusätzlich eine Korrelation zwischen hoher Dichte von TILs und klinischem Ansprechen auf Chemotherapie.

In einem experimentellen Mausmodell wurde eine wirksame antitumorale Reaktion der transferierten CD8+ T-Zellen bei Ovarialkarzinom aufgezeigt, die wohl ausreicht, um Regression des fortgeschrittenen Tumors zu initiieren. Diese Reaktion war mit deutlicher T-Zellproliferation und Ausschüttung von Interleukin-2 und Interleukin-15 verbunden. Eine geringe Dichte von TILs führte zu keiner Tumorregression. Eine besondere Schwierigkeit dabei war die schlechte Persistenz der Zellen, erschwerte T-Zellvermehrung nach ihrer Übertragung und eine gewisse hemmende Wirkung der Inhibitoren auf aktivierte T-Lymphozyten. Somit kommt es bei bestimmten immunogenen Tumoren - wie z.B. bei Ovarialkarzinom - nicht immer zur effizienten Eliminierung der neoplastischen Zellen. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen trotzdem das diskutierte Konzept, dass das Ovarialkarzinom durch Ansätze T-Zellbasierter Immuntherapie einen möglichen günstigen Verlauf zeigt. [54]

Zahlreiche aktuelle Untersuchungen zeigten, dass Prognose und Überleben - abhängig von genauer Lage der Lymphozyten im Tumorgewebe - kontrastierend unterschiedlich sein kann. Es wurde berichtet, dass die antitumorale Immunantwort teilweise durch direkte Zell-Zell-Kontakte vermittelt wird und dabei eine genaue Lage der TILs im Tumorgewebe eine entscheidende Rolle spielen kann [62-67]. Mit diesem Thema beschäftigten sich mehrere Studien, die letztendlich aber zu widersprüchlichen Ergebnissen kamen [49, 58, 60]. In einigen Studien wurde festgestellt, dass hohe intratumorale Zelldichte von CD8+ - aber nicht CD3+ Lymphozyten - statistisch mit besserem Überleben korreliert [60, 68]. Später wurde allerdings festgestellt, dass eine hohe intratumorale Dichte von CD3+ T-Lymphozyten in Kombination mit fehlender/“negativer“ stromaler lymphozytärer Infiltration statistisch mit längerem gesamten und progressionsfreien Überleben assoziiert ist [49]. Allein die hohe CD3+ Lymphozytendichte intratumoral war laut einigen Autoren als ein

unabhängiger prognostischer Faktor für längeres gesamtes Überleben statistisch identifiziert [69, 70].

Hinsichtlich der intraepithelialen Lymphozyten wurde über vielfältige funktionelle Aktivitäten des Oberflächenmoleküls Integrin CD103 ($\alpha E/\beta 7$) berichtet. Integrin CD103 wird durch Bindung an E-Cadherin weitgehend von intraepithelialen CD8+ Lymphozyten im intestinalen Epithel und in der Lungenschleimhaut exprimiert [71-73]. Die meisten CD103+ TILs sind als zytotoxischen T-Zellen, natürliche Killerzellen (NK) und auch als CD4+ T-Lymphozyten präsentiert [74]. Darüber hinaus wurde ein CD103-Marker beim serösem Ovarialkarzinom als weiterer prognostischer Marker etabliert [75] mit nachgewiesener Korrelation zwischen besserer krankheitsspezifischer Überlebenszeit und hoher Zahl von CD3+/CD103+ [62], oder CD8+/CD103+ tumorinfiltrierenden Lymphozyten [74].

1.5 Ziele dieser Arbeit

Die Rolle der Immunantwort in STIC wurde bisher nur wenig untersucht [76]. Um die mögliche Rolle der spezifischen zellulären Immunantwort bei der Entstehung der STIC und der HGSC zu beleuchten, haben wir in dieser Arbeit vor allem drei wesentliche Fragen adressiert:

1. Welche Subpopulationen von immunkompetenten Zellen - abhängig von ihrer Lage intratumoral oder in angrenzendem Stroma – sind an der Immunantwort in Vorläuferläsionen beteiligt?
2. Wie verändert sich die Lymphozytenzahl in STICs und ihrer Umgebung im Vergleich zu der benachbarten tubalen Schleimhaut und zum korrespondierenden Karzinom?
3. Gibt es eine Korrelation zwischen der Immunantwort in STICs und in den assoziierten Karzinomen? Hierbei analysieren wir, ob bei Tumoren mit einer ausgeprägten Immunantwort, die ersten immunkompetenten Zellen bereits in den Vorläuferläsionen vorhanden sind oder erst später beim fortschreitenden invasiven Prozess auftreten.

2 Material und Methoden

2.1 Kollektiv und Auswertung der bereits durchgeführten p53-Färbung

Das bereits charakterisierte Patientinnenkollektiv aus der Arbeit von Sophie Heüveldop mit diagnostizierten high-grade serösen Karzinomen des kleinen Beckens und assoziierten serösen tubalen intraepithelialen Karzinomen (STICs) wurde weiter retrospektiv analysiert. Es waren in den Jahren zwischen 2004 - 2012 insgesamt 150 Patientinnen der Universitätsfrauenklinik Tübingen untersucht, bei denen konsekutiv ein high-grade seröses Karzinom diagnostiziert wurde. Davon waren 101 Fälle für weitere Untersuchungen geeignet. Alle Patientinnen unterzogen sich einer chirurgischen Behandlung mit bilateraler Adnexektomie, Hysterektomie, Omentektomie bzw. Lymphnodektomie. Das Resektionsmaterial von allen Fällen wurde im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen untersucht. Das Untersuchungsmaterial bestand aus Gewebeblöcken, die für die histologische Untersuchung formalinfixiert und paraffineingebettet waren.

Das Projekt wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen genehmigt.

Alle Gewebeblöcke und histologische Schnitte zu den vorgenannten Fällen wurden aus dem pathologischen Archiv bezogen und von einer Pathologin mit Zusatzausbildung im Bereich der Gynäkopathologie (A.S.) erfasst. Bei allen Fällen wurde die Tuben nach dem empfohlenen Algorithmus aufgearbeitet [22]. Dabei wurden die histologischen Schnitte von komplett eingebetteten Tuben sorgfältig lichtmikroskopisch und anhand der immunhistochemischen Färbungen von Tumorsuppressorprotein p53 und Proliferationsmarker Mib-1 (Antikörper Ki-67) auf relevante pathologische Veränderungen untersucht.

Aufgrund dieser Untersuchungen konnte eine Datenbank von 23 Patientinnen mit insgesamt 29 nachgewiesenen STIC-Läsionen erstellt werden.

Alle (100%) korrespondierenden Karzinome waren high-grade seröse Karzinome. Bei 17 (74%) Fällen waren die Haupttumormassen in Ovarien, bei 3 (13%) Fällen in Tuben lokalisiert. Bei 1 (4%) Fall wurde ein primäres peritoneales Karzinom und bei 2 (9%) Fällen die Malignen Müller-Mischtumore der Ovarien festgestellt.

Zum Diagnosezeitpunkt waren alle Patientinnen im Alter zwischen 48 und 84 Jahre und hatten ein fortgeschrittenes Tumorstadium von IIIa bis IIIc mit peritonealer Tumorausbreitung (nach TNM-Klassifikation). 14 (61%) Tumore präsentierten sich bei Diagnosefeststellung mit Lymphknotenmetastasen (N1). Bei 6 (21%) Patientinnen entwickelten sich keine Lymphknotenmetastasen (N0). Zu 3 (13%) Fällen konnte keine Aussage zum Lymphknotenstatus getroffen werden (Nx) (Tabelle 2.1). Bei den Patientinnen aus meiner Untersuchungspopulation gab es zu diesem Zeitpunkt keine Information über BRCA-Keimbahnmutationsstatus oder zusätzliche familiäre Belastung.

Bezüglich morphologischer Variationen unterscheidet Soslow et al. in seiner Publikation die high-grade seröse Karzinome mit solidem, pseudoendometrioidem oder transitionalem Wachstumsmuster [77]. Dominierende Tumorarchitektur bei dieser Entität ist papilläres Wachstumsmuster, welches statistisch bei >50% der Fällen von HGSC beobachtet wird [78].

Bei jedem Fall unserer Untersuchung wurden histologischer Subtyp und Differenzierungsgrad des jeweiligen Tumors ohne Kenntnis der klinischen und immunhistochemischen Daten von einer erfahrenen Pathologin (A.S.) neu evaluiert. Darunter zeigten sich 13 (57%) papillär-seröse, 5 (22%) pseudoendometrioiden, 4 (17%) solide und 1 (4%) transitionalzellartige Karzinome (Abbildung 2.1).

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Studienkollektivs aufgeschlüsselt nach histologischem Subtyp, den klinisch-pathologischen Parametern, Tumorstadium und Lymphknotenstatus

Klinisch-pathologische Parameter	Papillär-serös		Pseudo-endometrioid		Solid		Transitional		Gesamt	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Total	13	(56,5)	5	(22,2)	4	(17,4)	1	(4,3)	23	(100)
Tumor-Stadium										
IIIa			1	(20)					1	(4,3)
IIIb			1	(20)	1	(25)			2	(8,7)
IIIc	13	(100)	3	(60)	3	(75)	1	(100)	20	(86,9)
Lymphknotenstatus										
Nx	1	(7,7)	2	(40)					3	(13,0)
N0	4	(30,8)	1	(20)	1	(25)			6	(26,1)
N1	8	(61,5)	2	(40)	3	(75)	1	(100)	14	(60,8)

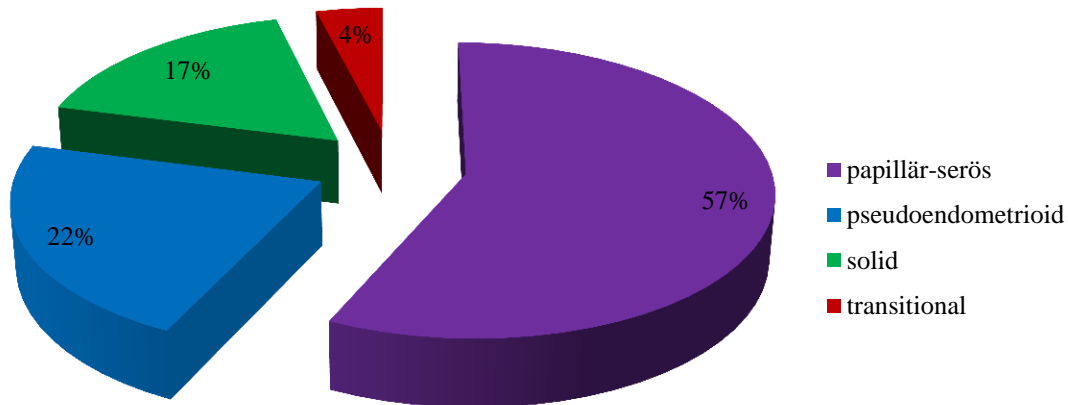


Abbildung 2.1: Häufigkeitsverteilung (%) der unterschiedlichen histologischen Subtypen der high-grade serösen Karzinome im Gesamtkollektiv.

Schlussendlich wurden insgesamt 29 STIC-Läsionen detektiert, davon 6 (21%) Fälle mit nachgewiesenen bilateralen STICs. Alle STIC-Läsionen befanden sich im Fimbrientrichterbereich der Tube. 2 (7%) Fälle wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen, da die STIC-Läsionen in tieferen histologischen Schnitten nicht mehr vorhanden waren. Die tumorfreien Abschnitte des unauffälligen Tubenepithels dienten bei jedem untersuchten Fall als interne Kontrolle.

Bei den Fällen mit unzureichendem Tumorgewebe wurden zusätzlich ein bis zwei Paraffinblöcke mit repräsentativem karzinomtragendem Gewebe aus dem pathologischen Archiv herausgesucht. Mit dem Rotationsmikroskop der Firma Microm HM355S wurden aus den Blöcken mit dem in paraffineingebetteten Tumor- und Tubengewebe die histologische Schnitte mit einer Dicke von 2,5 µm angefertigt und auf Superfrost-Objektträger aufgetragen. Diese Schnitte wurden einerseits mittels Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Danach erfolgten die immunhistochemischen Färbungen an unmittelbar folgenden Schnitten mit 2,5 µm Dicke.

Zuallererst erfolgte eine histologische Begutachtung der Gewebeschnitte mit p53-Färbung. Die Ergebnisse der p53-Färbung der histologischen Schnitte mit pathologisch verändertem Tubenepithel wurden mithilfe eines semiquantitativen Punktesystems bewertet. Auf diese Weise konnte die Färbeintensität der angefärbten Zellen ausgewertet werden. Allen STIC-Läsionen mit Ausfall von p53-Expression wurde die Punktzahl 0 vergeben. Falls die STICs ein starkes diffuses nukleäres Reaktionsprodukt aufwiesen, wurde für diese Areale die Punktzahl 3 vergeben. Die Fälle mit auffälligem Tubenepithel und schwacher p53-Expression wurden mit der Punktzahl 1 bewertet und im Untersuchungskollektiv als Fälle mit nicht auswertbarem Färbemuster bezeichnet. Im unauffälligen Tubenepithel zeigte sich in einzelnen Zellen eine typische mäßige heterogene Expression in weniger als 10% der Epithelien. Dies entspricht einer Punktzahl 2 (Tabelle 2.2). Alle STIC-Läsionen mit komplettem Ausfall oder mit p53-Überexpression zeigten deutlich gesteigerte Proliferationsaktivität für Ki67-Antigen in ca. 70% der neoplastischen Epithelzellen. Anschließend wurde das Färbemuster von p53-Expression in STIC-Läsionen mit dem Expressionsprofil der korrespondierenden Karzinome verglichen.

Tabelle 2.2: Punktesystem zu Bewertung der immunhistochemischen Färbung für p53-Protein

Score	Interpretation der Färbeintensität von p53-Protein
0	Kompletter Ausfall der Färbung, keine Expression
1	Schwach, nicht auswertbar
2	Mäßig, heterogen in einzelnen Zellen
3	Starke diffuse Überexpression

Die Gewebeschnitte wurden von einer erfahrenen Gynäkopathologin (A.S.) und mir - unabhängig voneinander – bewertet. Das semiquantitative Punktesystem ist etabliert und wurde auch in anderen Arbeiten schon mehrfach beschrieben. In allen Fällen diente als interne Kontrolle das unauffällige Tubenepithel.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Allgemeine Immunhistochemie

Jeder immunhistochemische Prozess basiert auf einer immunologischen Reaktion zwischen Antigenen und spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern. Antigene sind Proteine, die mithilfe bestimmter oberflächlicher Epitope die Antikörperbildung auslösen und mit gebildeten Antikörpern reagieren.

Um die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe durch eine Farbreaktion zu detektieren [79], wurde für meine Arbeit eine indirekte Färbemethode - die sogenannte (Strept-) Avidin-Biotin-Komplex-Methode - angewandt. Im ersten Schritt bindet der primäre spezifische monoklonale Antikörper das Epitop des nachzuweisenden Antigens. Im zweiten Schritt wurde ein biotinmarkierter (biotinylierter) Sekundärantikörper an einen primären Antikörper gebunden. Danach reagiert der enzymmarkierter (Strept-)Avidin-Komplex mit dem biotinylierten sekundären Antikörper. Im letzten Schritt erfolgt die Visualisierung der Reaktion. Bei diesem Vorgang wandelt das Enzym Meerrettichperoxidase das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) mit dem zugegebenen Wasserstoffperoxid-Substrat in einen Farbkomplex um. Das Chromogen wird oxidiert und lagert sich als brauner Farbstoff an den gesamten Komplex an. Auf diese Weise wird das gesuchte Antigen sichtbar (Abbildung 2.2).

Die Färbungen wurden mit dem vollautomatischen Immunfärbungssystem Benchmark XT der Firma Ventana (Medical Systems, Tucson, AZ, USA) durchgeführt. Die Reagenzien stammten ebenfalls von der vorgenannten Firma.

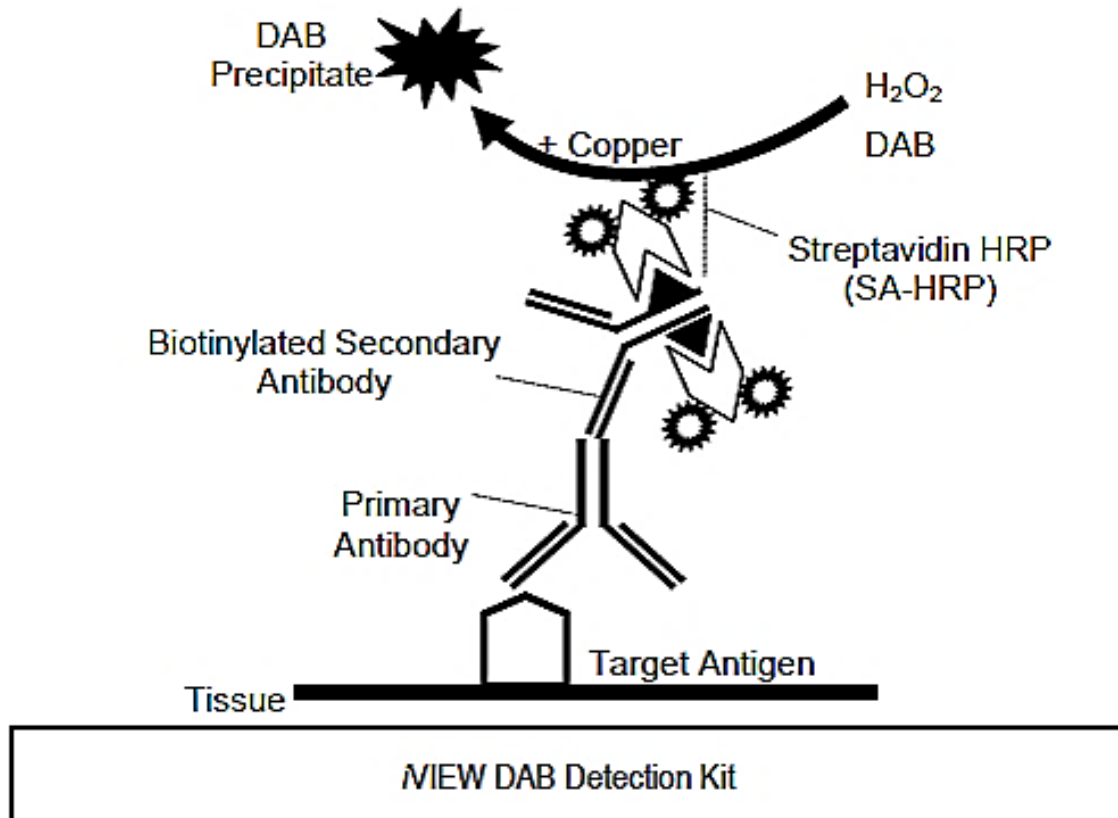


Abbildung 2.2: Prinzip der Immunhistochemie (zur Verfügung gestellt von der Firma Roche): Der Primärantikörper koppelt an das Antigen. Biotinylierter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Danach enzymmarkierter (Strept-)Avidin-Komplex reagiert mit biotinyliertem sekundärem Antikörper. Als letzte wandelt das Enzym Meerrettichperoxidase das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) im zugegebenen Wasserstoffperoxid-Substrat-Komplex in einen Farbkomplex um. Das Chromogen wird oxidiert und lagert sich als brauner Farbstoff an den gesamten Komplex an. SA-HRP: Konjugierte Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Lösung.

2.2.2 Immunhistochemische Färbungen von CD3, CD8 und CD103

Die Gewebeschnitte wurden zunächst auf Superfrost-Objekträgern platziert. Danach wurden die Schnitte bei höchstens 60° im Wärmeschrank mindestens 60 Minuten lang angetrocknet. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit Xylol und der absteigenden Ethanolreihe dehydratisiert und mit einem anorganischen Puffer entparaffiniert. Die Entparaffinierung erfolgte im Benchmark XT mit EZ Prep. Da bei der Fixierung mit 4%-gepuffertem Formalin der Zugang zu den strukturell veränderten (maskierten) Epitopen erschwert wird, erfolgte zunächst eine korrekte hitzeinduzierte Vorbehandlung der Schnittpräparate. Bei diesem

Vorgang werden die gesuchten Antigenstrukturen demaskiert. Für die CD8 und CD103 Antikörper ist Epitopdemaskierung mittels eines vorgewärmten Tris/Borat/EDTA-Puffer (CC1 mild) pH8,4 und für Antikörper gegen CD3 mittels eines Tris/Borat/EDTA-Puffer (CC1 Std) pH8,4 erforderlich.

In dieser Arbeit wurden Konzentrate von monoklonalen Antikörpern angewandt. Die monoklonale Antikörper gegen CD3 und CD103 werden aus Kaninchenserum gewonnen. Der monoklonale Antikörper CD8 wird aus Mausserum hergestellt. Für die Verdünnung wurde der „Antibody Diluent“ von Firma Zytomed Systems verwendet. Dieser Verdünnungspuffer stabilisiert die Antikörper sowohl mikrobiologisch als auch chemisch und reduziert dabei die Hintergrundfärbung.

Die für die Studie ausgewählten Antikörper sind in der folgenden Tabelle 2.3 zusammen mit Angaben über Hersteller, Antikörperverdünnung und Herkunftsquelle dargestellt.

*Tabelle 2.3: Übersichtstabelle über die verwendeten Antikörper. *Verdünnungspuffer „Antibody Diluent“ der Firma Zytomed Systems*

Monoklonale Antikörper	Clon	Hersteller	Spezies	Optimale Verdünnung*
CD3	SP7	DCS Innovative Diagnostik, Hamburg, Deutschland	Kaninchen	1:100
CD8	C8/144B	Dako, Glostrup, Dänemark	Maus	1:150
CD103 / Integrin Alpha- E	EPR/4166(2)	Gene Tex, Irvine, CA	Kaninchen	1:500

iView DAB-Detektion-Kit enthielt als Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-, bzw. Anti-Maus-Antikörper. Durch die oben beschriebene Reaktion mit Meerrettichperoxidase wandelt der Antigen-Antikörper-Komplex mit dazugegebenem Wasserstoffperoxid-Chromogen-Komplex in ein sichtbares Reaktionsprodukt um (iView DAB Detection Kit, Ventana). Zur Kontrastbildung erfolgt eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Bläuen des übrigen Gewebes. Anschließend erfolgte Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol sowie Eindecken mit dem Eindeckmedium Cytoseal.

2.3 Auswertung der Expression von CD3, CD8 und CD103 Antikörper manuell und anhand digitaler Bildanalyse

Die Objektträger mit immunhistologischen Färbungen von CD3, CD8 und CD103 Antikörper wurden mit dem Gerät Mirax-Scanner Zeiss gescannt und mittels des Programms Adobe Photoshop 5.5 (Hersteller: Firma Adobe) bearbeitet.

Mit einem Ziel die T-Lymphozyten-Quantität in den neoplastischen Arealen und im Tubenepithel zu erfassen, erfolgte eine computergestützte Bildanalyse. Dabei wurden die gescannten histologischen Schnitte mithilfe des Programms Definiens Tissue Studio™ [80] ausgewertet. Das System wurde anhand einer Mikrometerskala geeicht. In den digitalen Bildern ließen sich Flächenbestimmungen berechnen und es wurden alle nötigen Messungen durchgeführt.

Als Basiskriterien der Lymphozyten-Quantifizierung wurden folgende Messparameter bestimmt:

- 1) Für normales Epithel: die optimale Epithellänge bei jedem Fall betrug ca. 5 mm, die Epitheldicke war konstant 0,017 mm. Das Areal mit angrenzendem Stroma hatte bei jedem Fall eine Länge von 5 mm und konstante Dicke von 0,1 mm.

- 2) Für STIC-Läsionen: es wurde mindestens eine repräsentative STIC-Läsion pro Fall untersucht. Wenn sich während der histologischen Untersuchung mehrere STICs pro Fall zeigten, dann wurden zwei repräsentative Areale in diese Analyse angeschlossen mit einer optimalen Gesamtlänge der STIC-Läsionen und des angrenzenden Stromas, jeweils von 5 mm. Die Dicke von neoplastischem Epithel variierte von 0,014 bis 0,08 mm. Bei jedem Fall hatte das angrenzende Stroma eine konstante Dicke von 0,1 mm.

Aufgrund der Rasterbildung der Bildanalyse von STIC-Läsionen und von normalem Epithel erfolgte eine Fehlzuordnung der Lymphozyten an der anderen Seite der Basalmembran, sodass hier auf eine automatische Detektion der Lymphozyten verzichtet wurde. Stattdessen wurden die Messareale mit dem Bildanalyse-Programm Definiens Tissue Studio™ erfasst und anschließend die Lymphozytenzahl in den STIC-Läsionen und im normalen Epithel manuell ausgezählt. (Abbildung 2.3 und 2.4).

Separat für das Epithel und angrenzendes Stroma ergab sich ein Wert in mm² bezogen auf eine Fläche (für invasives Karzinom) oder auf eine Strecke (für STIC-Läsionen und normales Epithel) durch Multiplikation von Länge und Dicke.

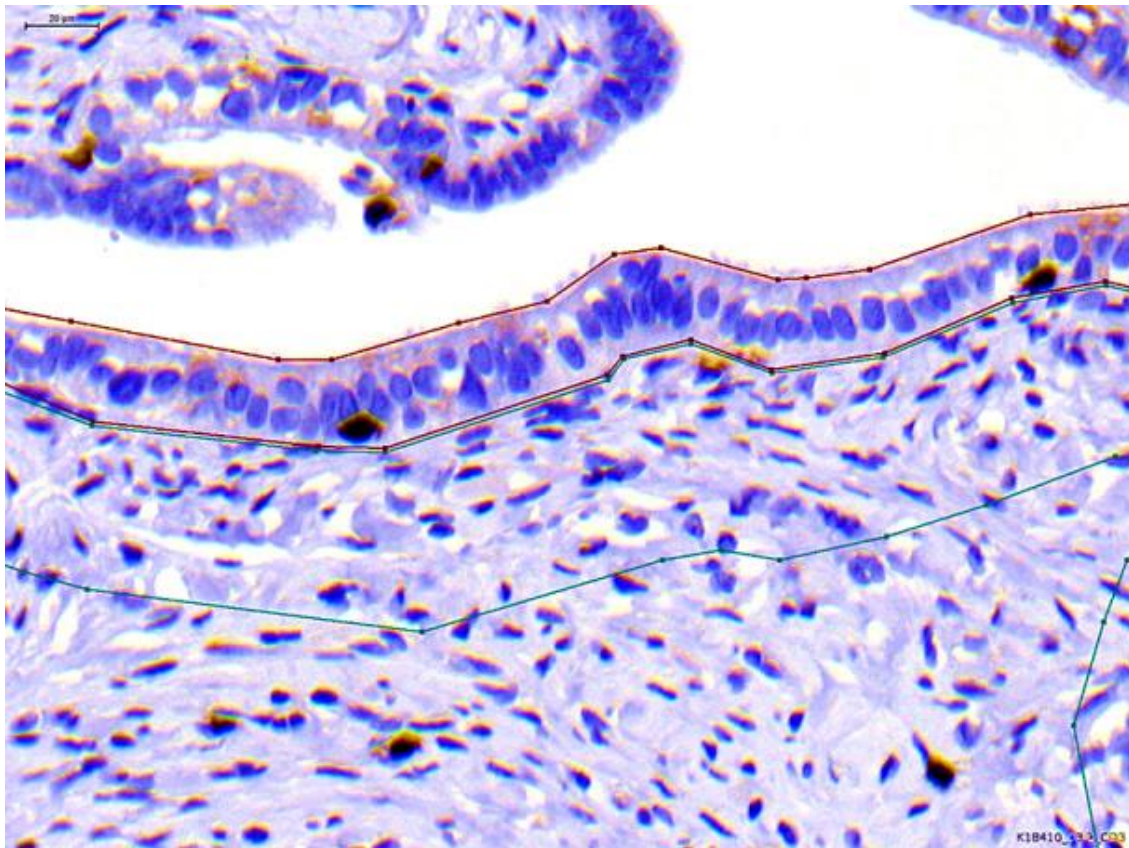


Abbildung 2.3: Normales Epithel mit mittels Difiens Tissue Studio™ Programms markiertem Epithel und subepitheliale Stroma (dunkelrot Epithel, grün Stroma), CD3-Färbung, Vergrößerung $\times 20\mu\text{m}$.

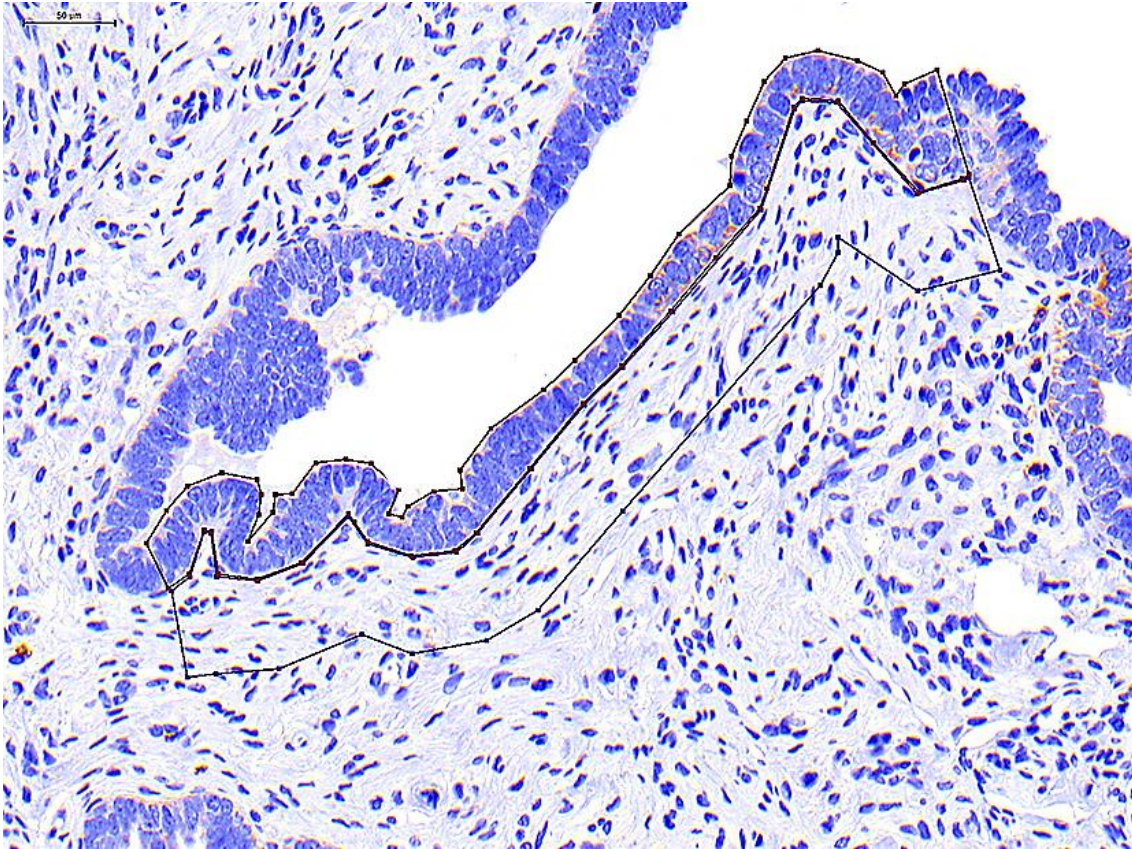


Abbildung 2.4: STIC mit mittels *Difiniens Tissue Studio™* Programms markiertem neoplastischem Epithel und subepithelialem Stroma, CD3-Färbung, Vergrößerung $\times 50\mu\text{m}$.

- 3) Für invasive Karzinome: pro Fall wurden zwei Arealen mit korrespondierendem Tumor und zwei Areale mit angrenzendem Stroma gemessen und markiert. Jedes ausgewählte Areal stellt ein Quadrat mit einer Seitenlänge von $500\mu\text{m}$ oder $0,5\text{ mm}$ dar.

Der Flächeninhalt beträgt:

$$A = a^2 = 0,5^2 = 0,25\text{ mm}^2$$

Letztendlich stellte jedes analysiertes Areal eine Fläche von $0,25\text{ mm}^2$ dar, sodass sich zwei Tumorareale und zwei Stroma-Areale mit jeweils einer Gesamtfläche von $0,5\text{ mm}^2$ ergaben (Abbildung 2.5).

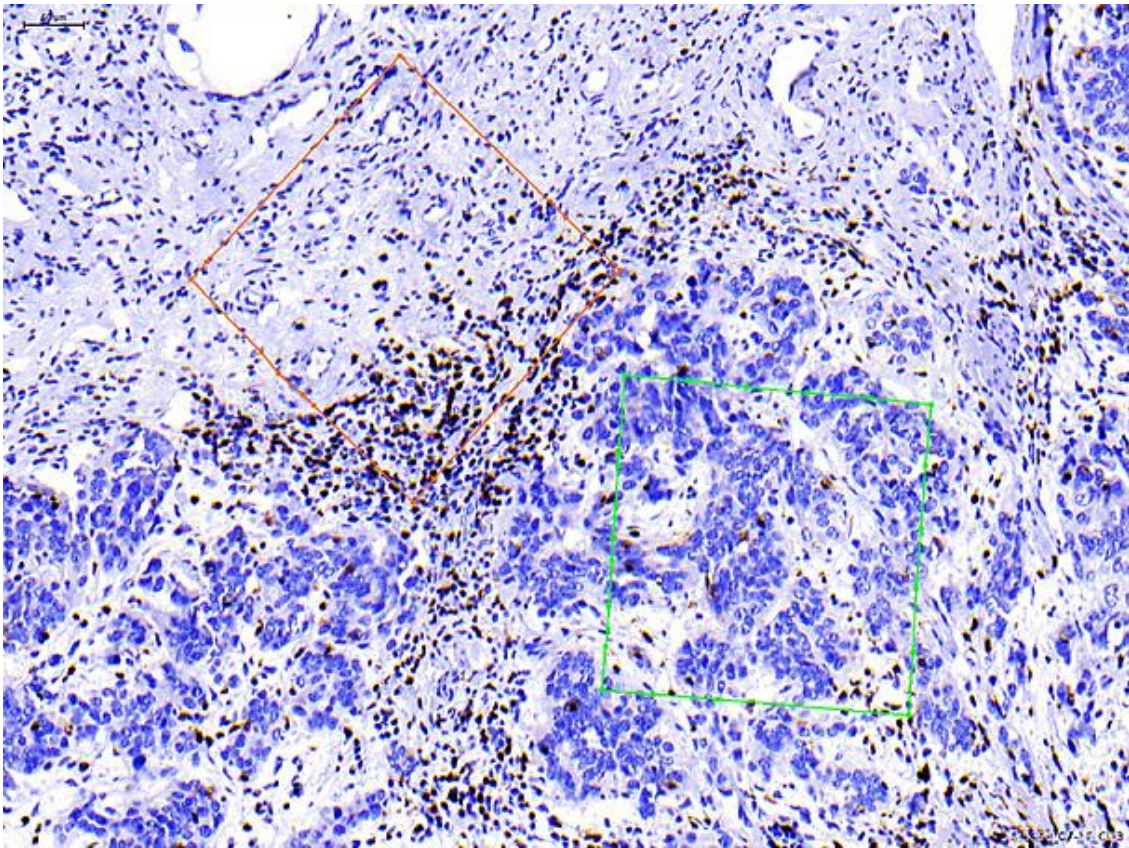


Abbildung 2.5: Invasives high-grade seröses Karzinom mit insgesamt vier mittels des Definiens Tissue Studio™ Programms markierten Arealen: zwei Areale mit Tumor und zwei Areale mit angrenzendem peritumoralem Stroma. In der Abbildung ein Tumor-Areal und ein Stroma-Areal miterfasst (hell grün Tumor, orange angrenzendes Stroma), Vergrößerung $\times 50\mu\text{m}$.

Anhand des Programms Definiens Tissue Studio™ wurden alle gemessenen Areale des korrespondierenden Karzinoms als digitale Bildanalyse ausgeführt. Zuerst wurde mittels eines Kernerkennungsalgorithmus ein Kerndurchmesser von $16\ \mu\text{m}$ angegeben, um die korrekte Zellpopulation von positiven Lymphozyten zu identifizieren. Dabei wurden die positiven und negativen Zellen gegeneinander mit unterschiedlichem Chromogen detektiert. Das Programm detektierte eine nukleäre Expression der Antikörper in den Lymphozyten als schwach, mäßig und stark gefärbte Kerne. Außerdem wurden die positiven und negativen Zellen unterschiedlich farbig markiert (Abbildung 2.6). Damit wird die korrekte Erkennung von allen positiven und negativen Zellen ermöglicht. Anschließend wurde die vollautomatische Zellanalyse ausgeführt.

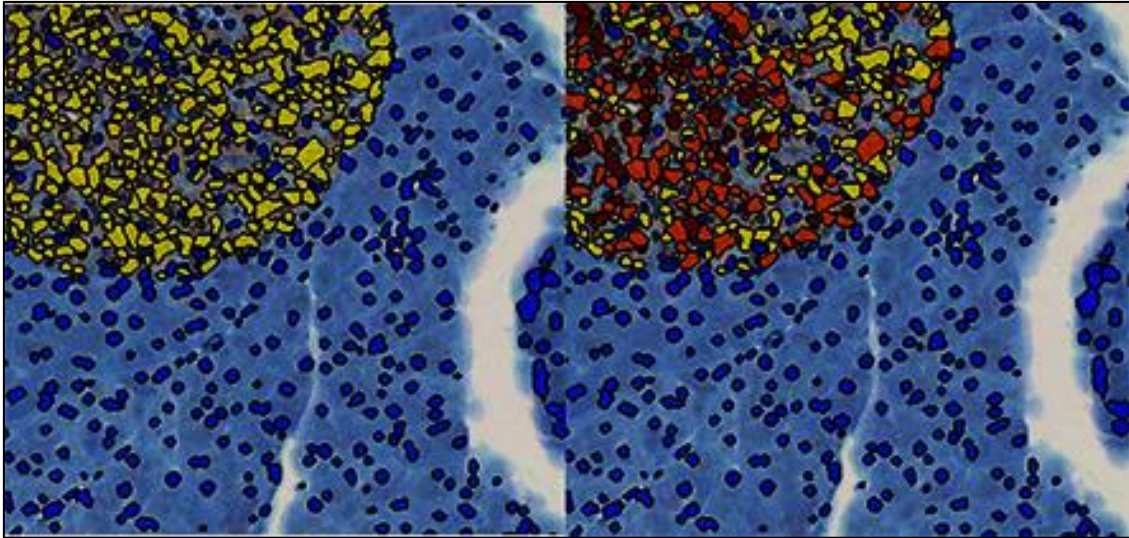


Abbildung 2.6: Detektionsergebnisse nach Kernererkennung (links: negative Kerne blau, positive Kerne gelb; rechts: negative Kerne blau, kleine positive Kerne gelb, mäßig große positive Kerne orange, große positive Kerne braun) oder z.B. Detektion der Kernen nach Intensität (rechts: negative Kerne blau, schwach positive Kerne hellrot, mäßig positive Kerne orange, stark positive Kerne braun) (Definiens Tissue Studio™ 2.1.1, User Guide [80]).

Als Messergebnis resultierte daraus die absolute Zahl immunhistochemisch gefärbter Lymphozyten bezogen auf Fläche für korrespondierende invasive Karzinome und auf Strecke pro 1 mm² für STIC-Läsionen und normales Epithel.

2.4 Statistische Auswertung

Alle benötigten Daten für Quantifizierung der Lymphozytenzahl in STIC-Läsionen, im normalen Tubenepithel und in den korrespondierenden Karzinomen, sowie Ergebnisse der weiteren immunhistologischen Färbungen wurden in eine Microsoft® Excel Tabelle übertragen. Statistische Analysen und Diagrammen wurden mit dem Softwarepaket SPSS12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Statistikprogramm GraphPad durchgeführt. Die Korrelationen und signifikante Unterschiede zwischen CD3+, CD8+ und CD103+ Lymphozytenzahl in tumoralem Stroma und unmittelbar intratumoral/intraepithelial wurden mithilfe t-Tests bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ ermittelt.

Das Studienvorhaben wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen bewilligt (Pr. Nr.- 645/2012B02).

3 Ergebnisse

3.1 p53 Expressionsstatus im Kollektiv

Basierend auf konventionellen morphologischen Kriterien und mithilfe der immunhistochemischen Färbungen wurden insgesamt 27 Fälle mit den serösen tubalen intarepithelialen Karzinomen identifiziert. Die folgende Tabelle (Tabelle 3.1) zeigt die Verteilung der immunhistochemischen Scores in STIC-Läsionen in unserem Patientenkollektiv. Für weitere Untersuchungen wurden Fälle ausgesucht mit folgenden für STIC-Läsionen typischen Kriterien: deutlich hohem Proliferationsindex (ca. 70%) in der Mib-1-Färbung und einer Überexpression oder Ausfall von p53-Protein mit entsprechendem Score 3 oder Score 0. Das unauffällige Tubenepithel wurde mit der Punktzahl 2 bewertet.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der immunhistochemischen p53-Färbung im Untersuchungskollektiv

Gesamt		STIC-Läsionen				Ausgeschlossen	
		Score 3, Überexpression des p53-Proteins		Score 0, Ausfall des p53- Proteins		Nicht auswertbar oder Score 1	
N	%	N	%	N	%	N	%
27	100	20	74	6	22	1	3,7

Es wurden in drei (11%) Fällen in unserem Untersuchungskollektiv kleine Areale mit p53-Signatur gefunden.

3.2 Immunhistochemische Darstellung verschiedener Subpopulationen der T-Lymphozyten

Es wurden bei allen Fällen CD3-, CD8- und CD103-Expression in den Lymphozyten sowohl intratumoral/intraepithelial als auch im tumoralen Stroma

festgestellt. Die invasiven Karzinome zeigten - jedoch ohne Zusammenhang mit einem konkreten histologischen Subtyp - ungefähr die gleiche Anzahl von Fällen mit viel und wenig tumorinfiltrierenden Lymphozyten (Abbildung 3.1).

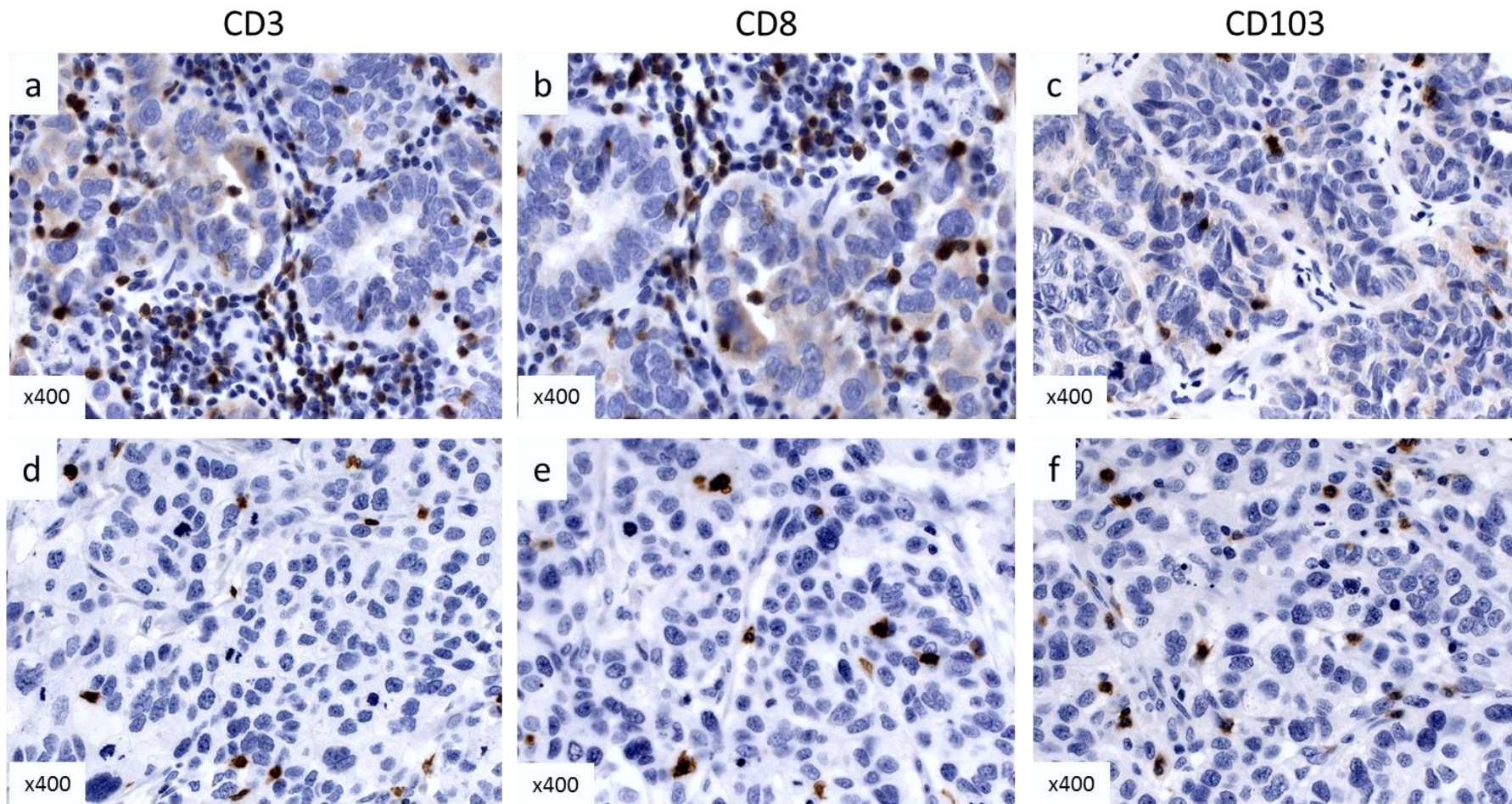


Abbildung 3.1: Invasive seröse high-grade Karzinome mit viel (a, b, c) und wenig (d, e, f) tumorinfiltrierenden Lymphozyten in CD3-, CD8- und CD103-Färbungen. Vergrößerung x400.

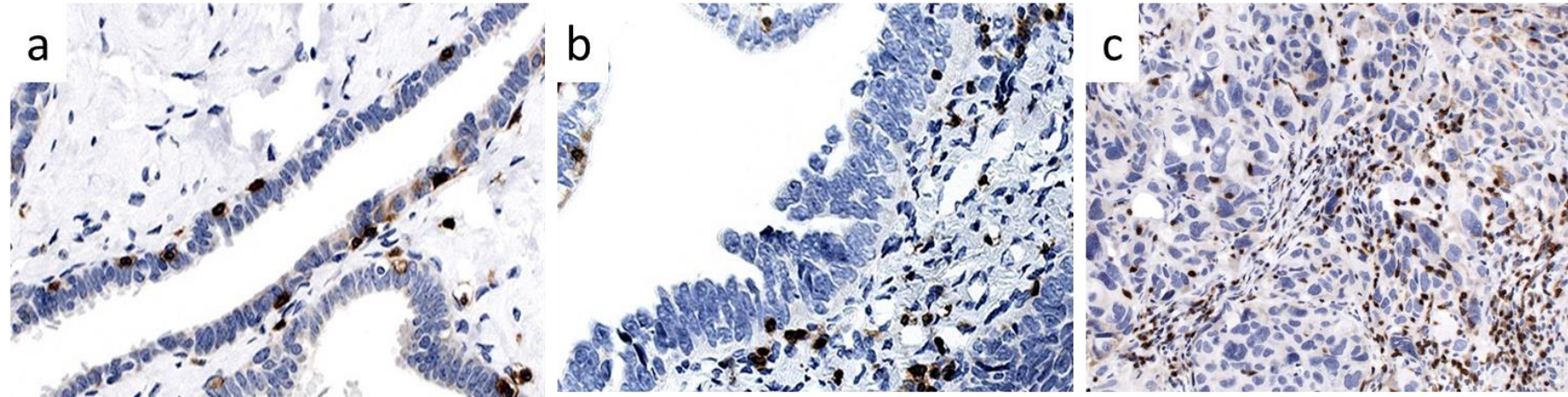


Abbildung 3.2: Normales Epithel (a), STIC (b) und invasives Karzinom (c) mit immunohistochemischer Darstellung der intraepithelialen/tumorinfiltrierenden Lymphozyten in der CD3-Färbung, Vergrößerung x400.

In dieser Studie wurde beobachtet, dass STIC-Läsionen überwiegend eine geringe Lymphozytenzahl in neoplastischem Epithel zeigen im Vergleich zu benachbartem normalem Tubenepithel oder zu korrespondierendem Karzinom (Abbildung 3.2).

In der nächsten Abbildung (Abbildung 3.3) sieht man Unterschiede der lymphozytärer Infiltration in normalem Epithel und zwei Subgruppen von STICs mit viel und wenig intraepithelialen Lymphozyten.

Um die Lymphozyten-Subpopulationen im Gewebe pro mm² zu quantifizieren, wurde von uns ein einfacher Algorithmus entwickelt. Dieser Algorithmus wurde bereits im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben.

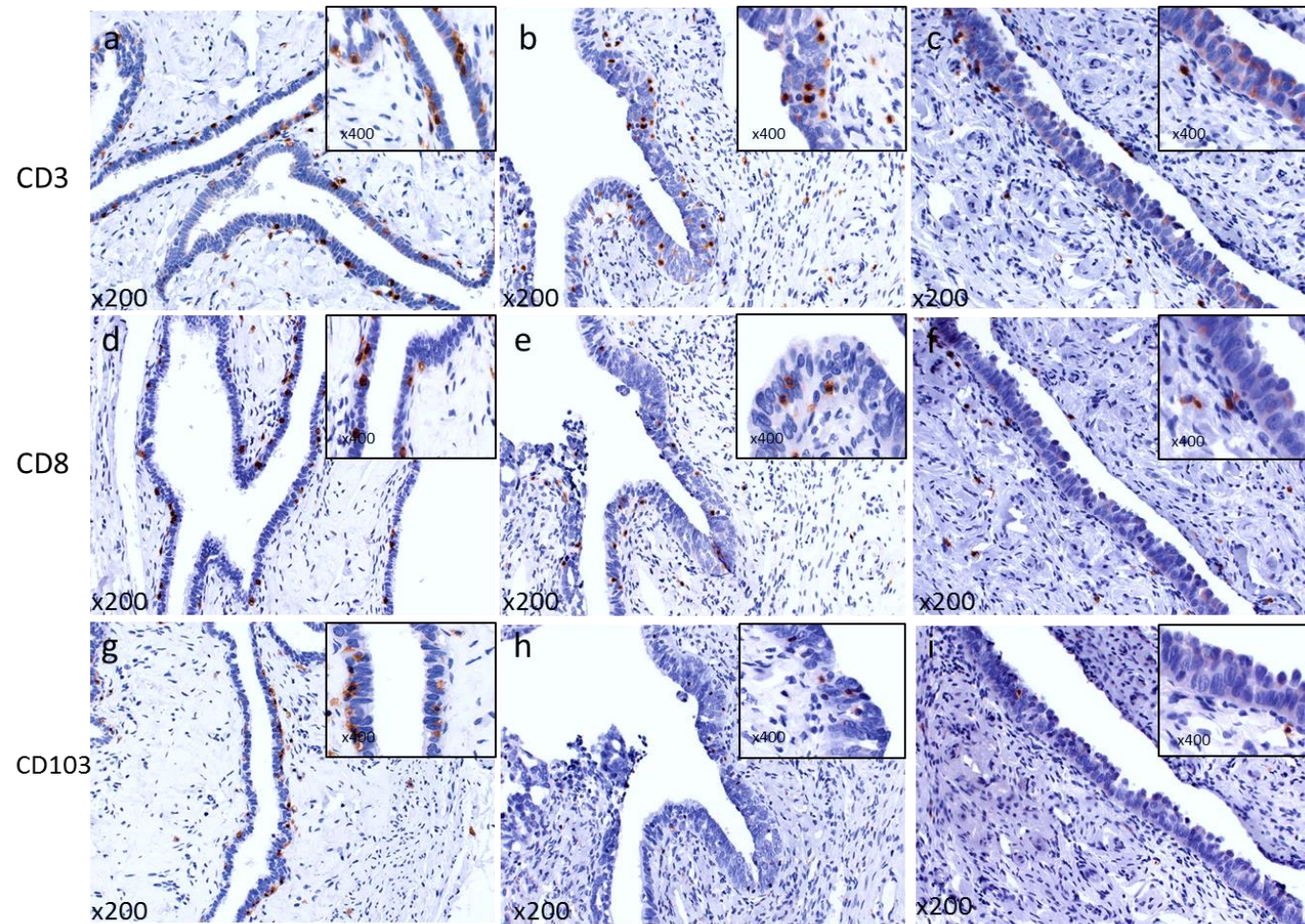


Abbildung 3.3: Normales Epithel (a, d, g), STIC mit viel (b, e, h) und wenig (c, f, i) intraepithelialen/ tumorinfiltrierenden Lymphozyten in CD3-, CD8- und CD103-Färbungen, Vergrößerung x200.

3.3 Statistische Unterschiede und Korrelation der Lymphozytenzahl in normalem Epithel, STIC und invasivem Karzinom

Wir konnten zu jedem Fall die Mittelwerte von Lymphozytenzahl für normales Epithel, STIC-Läsionen und korrespondierende invasive Karzinome ermitteln. Mithilfe von t-Test wurde überprüft, ob die gerechneten Mittelwerte für Stichproben sich systematisch voneinander unterscheiden (Tabellen 3.2 und 3.3).

Das unauffällige tubale Epithel zeigte eine gleichmäßige Verteilung der vereinzelt eingestreuten intraepithelialen Lymphozyten mit einer durchschnittlichen Anzahl von 328 Lymphozyten pro 1mm^2 für CD3+, 295 Lymphozyten pro 1mm^2 für CD8+ und 111 Lymphozyten pro 1mm^2 für CD103+ Antikörper. Das entspricht jeweils 5,5 Zellen, 5 Zellen und 2 Zellen pro 1mm Epithellänge. Die durchgeführte Analyse der immunhistochemisch detektierten Lymphozyten verglichen mit ihrer Anzahl in STIC-Läsionen zeigte eine deutliche Verminderung der intraepithelialen Lymphozyten als in benachbartem normalem Tubenepithel mit entsprechend 224 pro 1mm^2 in CD3+, 208 pro 1mm^2 in CD8+ und 121 Lymphozyten pro 1mm^2 in CD103-Expression, obwohl dieser Unterschied nur für CD3-Expression signifikant war, mit einem P-Wert von 0,03. Für die Verteilung der intraepithelialen/tumorinfiltrierenden Lymphozyten in CD8- und CD103-Färbung zeigte sich keine Signifikanz mit einem P-Wert von 0,146 und 0,763 entsprechend. (Tabelle 3.4) In invasiven Karzinomen war die durchschnittliche Lymphozytenzahl intratumoral 522/ mm^2 CD3-positiven (P=0,013), 247/ mm^2 CD8-positiven (P=0,444) und 184/ mm^2 CD103-positiven (P=0,111) Lymphozyten. Nur für CD3-Expression war die Anzahl der TILs statistisch deutlich signifikant.

Es wurde HE-morphologisch und immunhistochemisch eine deutliche lymphozytäre Infiltration in STIC-angrenzendem Stroma bei allen Fällen mit p53-Überexpression und p53-Ausfall beobachtet. Die durchgeführte

Quantifizierung und weitere statistische Analyse der Lymphozyten-Verteilung zeigten sehr hohe signifikante Unterschiede der lymphozytären Infiltration in Stroma zwischen normalem tubalem Epithel und STIC-Läsion, sowie zwischen STIC-Läsion und korrespondierendem Karzinom. Die unauffällige Tube zeigte eine geringe Lymphozytendichte im subepithelialen Stroma mit einer durchschnittlichen Anzahl von 55 Lymphozyten pro 1mm² für CD3+, 29 Lymphozyten pro 1mm² für CD8+ und 9 Lymphozyten pro 1mm² für CD103+ Antikörper. In STIC-Läsionen zeigte sich stromal eine sehr hohe signifikante Zahl der infiltrierenden T-Lymphozyten mit 377/mm² CD3-positiven (P<0,001), 181/mm² CD8-positiven (P<0,001) und 44/mm² CD103-positiven (P=0,004) Lymphozyten. In den korrespondierenden invasiven Karzinomen steigt die Lymphozytenzahl in tumoralem Stroma weiterhin mit durchschnittlich 920/mm² CD3-positiven (P<0,001), 660/mm² CD8-positiven (P<0,001) und 206/mm² CD103-positiven (P<0,001) Lymphozyten.

Tabelle 3.2: Signifikanzniveau für Stichproben mit paarigen Werten von CD3- und CD8-Expression in normalem Epithel, in STIC und im Karzinom

Test für Stichproben mit paarigen Werten

	df	Sig. (2- seitig)
Paar 1 Normales Epithel_CD3_Epithelial - STIC_CD3_Epithelial	25	,030
Paar 2 STIC_CD3_Epithelial - Karzinom_CD3_Epithelial	25	,013
Paar 3 Normales Epithel_CD8_Epithelial - STIC_CD8_Epithelial	25	,146
Paar 4 STIC_CD8_Epithelial - Karzinom_CD8_Epithelial	25	,444
Paar 5 Normales Epithel_CD3_Stroma - STIC_CD3_Stroma	25	,000
Paar 6 STIC_CD3_Stroma - CA_CD3_Stroma	25	,000
Paar 7 Normales Epithel_CD8_Stroma - STIC_CD8_Stroma	25	,000
Paar 8 STIC_CD8_Stroma - CA_CD8_Stroma	25	,000

Tabelle 3.3: Signifikanzniveau für Stichproben mit paarigen Werten von CD103-Expression in normalem Epithel, in STIC und im Karzinom

Test für Stichproben mit paarigen Werten

		df	Sig. (2- seitig)
Paar 1	Normales Epithel_CD103_Epithelial - STIC_CD103_Epithelial_mm ²	25	,763
Paar 2	STIC_CD103_Epithelial - Karzinom_CD103_Epithelial	25	,111
Paar 3	Normales Epithel_CD103_Stroma - STIC_CD103_Stroma	25	,004
Paar 4	STIC_CD103_Stroma - Karzinom_CD103_Stroma	25	,000

Tabelle 3.4: Übersichtstabelle mit Mittelwerten, Standardfehler der Mittelwerte der Lymphozytenzahl und Signifikanzniveau in normalem Epithel und in STICs pro 1mm^2

		Normal		STIC		Karzinom		Signifikanz N.Ep/STIC P<0,05
		Mittelwert	Standardfehler Mittelwert	Mittelwert	Standardfehler Mittelwert	Mittelwert	Standardfehler Mittelwert	
CD103	Epithel	111	18,45	121	31,69	184	48,74	0,763
	Stroma	9	1,02	44	11,34	206	36,55	0,004
CD3	Epithel	328	32,4	224	37,64	522	116	0,03
	Stroma	55	7,85	377	70,5	920	114	<0,001
CD8	Epithel	295	41,23	208	40,1	247	49,39	0,146
	Stroma	29	4,36	181	39,21	660	85,8	<0,001

In der Tabelle 3.4 sind Mittelwerte der Lymphozytenzahl in normalem Epithel, in den STICs und in den korrespondierenden Karzinomen zusammengeführt mit Bezug auf ihre Lage intraepithelial oder stromal pro 1mm^2 . Die statistisch erfassten Standardfehler der Mittelwerte bedeuten Standardabweichungen der Mittelwerte für alle Stichproben; sie sind relativ gering und zeigen, wie genau konnte die Lymphozytenzahl geschätzt werden. Bezüglich der relevanten Unterschiede der Lymphozytenzahl in normalem Epithel und in STIC sind statistische Signifikanzwerte in der Tabelle dargestellt.

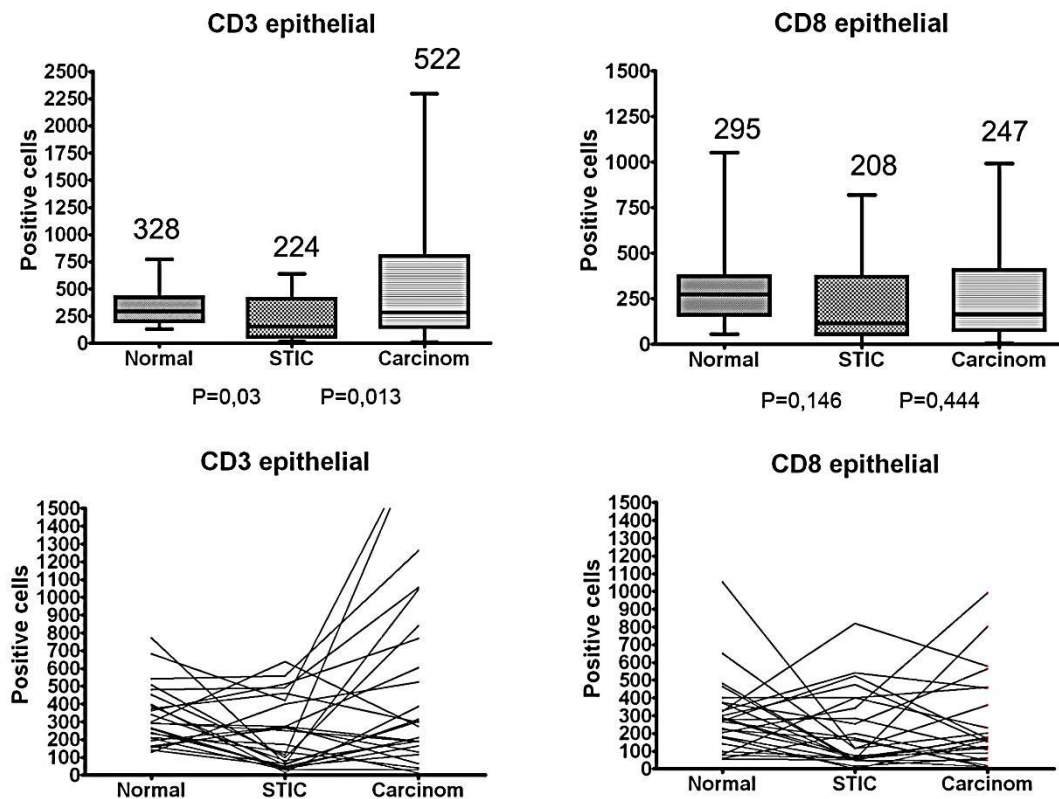


Abbildung 3.4: Graphische Darstellung der Verteilung der intraepithelialen/tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten im Vergleich: normales Epithel/STIC/Karzinom. In zwei Grafiken oben sind Boxplot-Grafiken mit Mittelwert für jede Gewebeart gezeigt. Jede Box präsentiert Streubreite der Lymphozytenzahl. In zwei unteren Grafiken sind Liniendiagramme dargestellt, jede Linie entspricht jedem einzelnen Fall. Signifikante Verminderung der intraepithelialen/tumorinfiltrierenden Lymphozytenzahl im Vergleich im normalen Epithel und STIC für CD3-Antikörper ($P=0,03$). Im Karzinom ist der Lymphozytengehalt signifikant höher als im STIC ($P=0,013$). Für die Verteilung der intraepithelialen/tumorinfiltrierenden Lymphozyten in CD8-Färbung zeigte sich ähnliche Tendenz, jedoch ohne signifikante Unterschiede ($P=0,146$ und $P=0,444$).

Diese Lymphozyten-Quantifizierung bestätigte unsere Beobachtung, dass die intraepithelialen Lymphozyten in den STIC-Läsionen im Durchschnitt geringer sind als im normalen Epithel. Damit wurde für CD3-exprimierenden Lymphozyten ($P=0,03$) ein signifikanter Unterschied dieses Parameters nachgewiesen. (Abbildung 3.4)

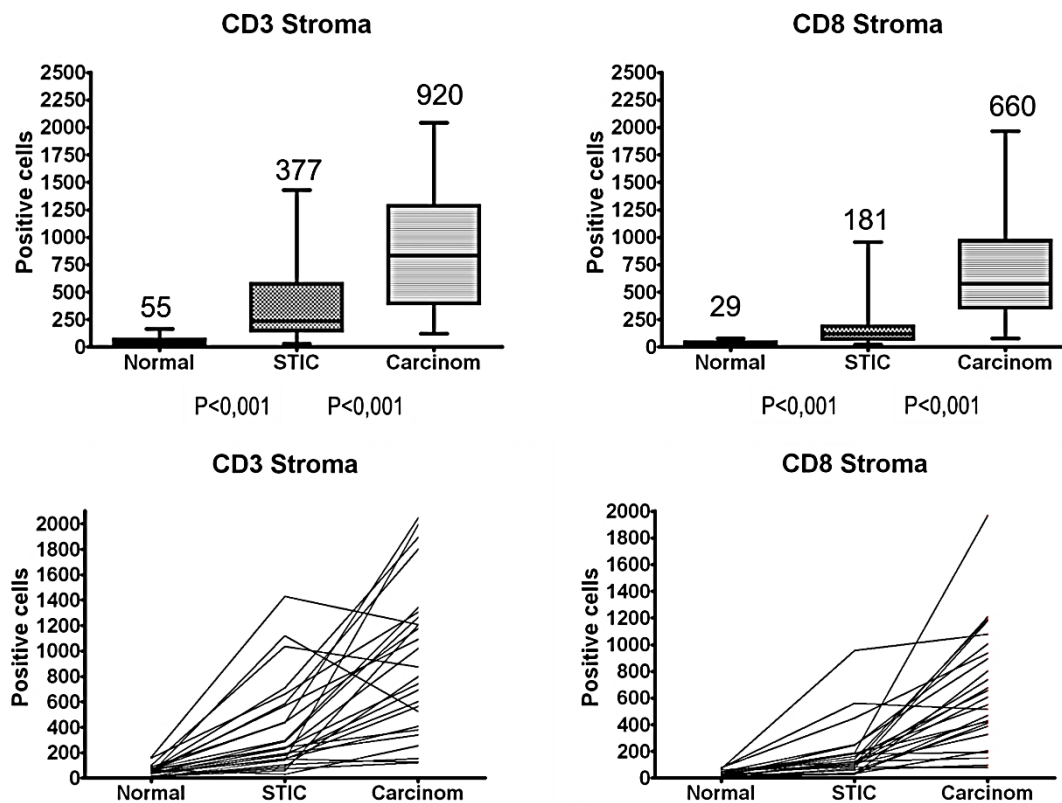


Abbildung 3.5: Graphische Darstellung der Lymphozytenzahl subepithelial und in der Tumor-Mikroumgebung für CD3- und CD8-Färbung in normalem Epithel /STIC/Karzinom. In zwei Grafiken oben sind Boxplot-Grafiken mit Mittelwert für jede Gewebeat gezeigt. Jede Box präsentiert Streubreite der Lymphozytenzahl. In zwei unteren Grafiken sind Liniendiagramme dargestellt, jede Linie entspricht jedem einzelnen Fall. Man sieht, dass normales Epithel sehr wenige Lymphozyten im Stroma beinhaltet. In STIC sieht man sehr hohen signifikanten Anstieg von Lymphozytenzahl ($P < 0,001$), und bei der Progression von STIC zum Tumor beobachtet man sehr deutliche Stromainfiltration mit hoher Signifikanz ($P < 0,001$).

Die stromale Lymphozytenzahl für CD3- und CD8-Färbung in normalem Epithel und STIC zeigte hoch signifikanten Anstieg der Lymphozytenzahl in STICs ($P < 0,001$).

Bei der Progression der Neoplasie beobachtet man sehr deutliche T-Zellinfiltration in der Mikroumgebung des invasiven Tumors mit hohem signifikantem Unterschied der Lymphozytenzahl ($P < 0,001$). (Abbildung 3.5)

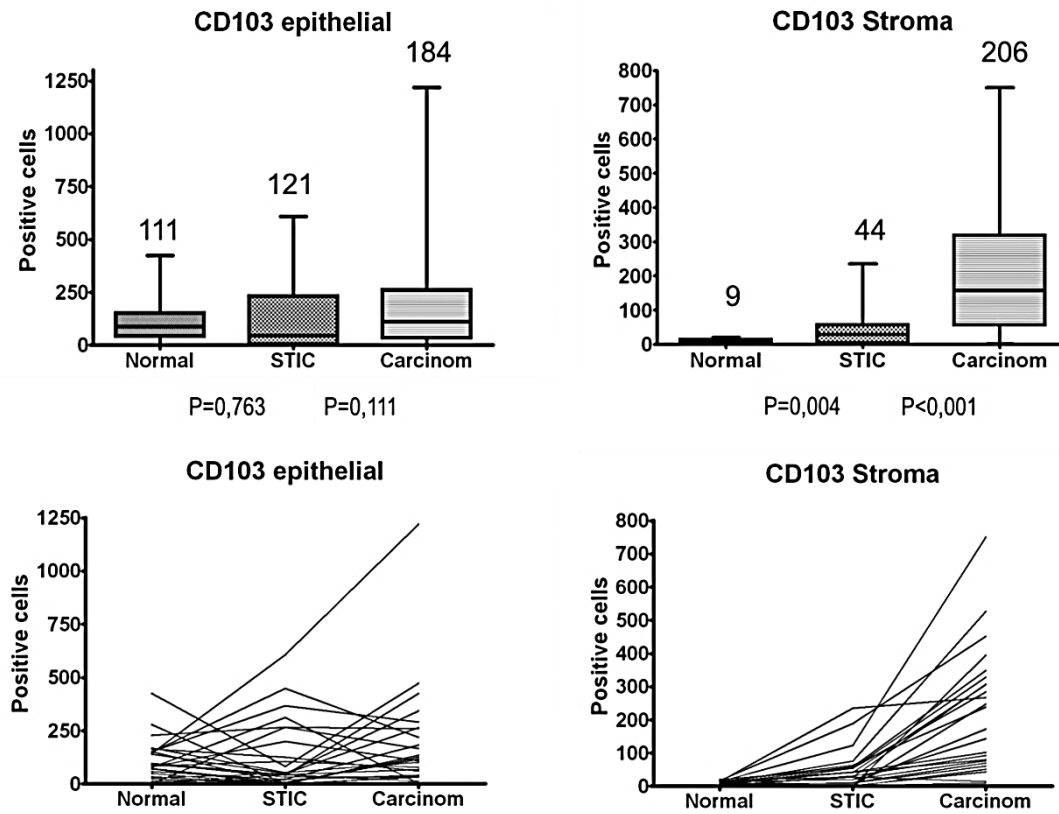


Abbildung 3.6: Graphische Darstellung der Verteilung der CD103-markierten Lymphozyten im Vergleich normales Epithel/STIC/Karzinom. In zwei Grafiken oben sind Boxplot-Grafiken mit Mittelwert für jede Gewebeart gezeigt. Jede Box präsentiert Streubreite der Lymphozytenzahl. In zwei unteren Grafiken sind Liniendiagramme dargestellt, jede Linie entspricht jedem einzelnen Fall. Man sieht keine signifikanten Unterschiede von CD103-exprimierenden Lymphozyten intraepithelial in normalem Epithel/STIC/Karzinom und einen hoch signifikanten Anstieg vom Lymphozytengehalt im Stroma von normalem Tubenepithel zum STIC und weiter zum invasiven Karzinom.

Aus diesen Grafiken (Abbildung 3.6) ist ersichtlich, dass sich keine signifikante Unterschiede von CD103-exprimierenden Lymphozyten intraepithelial/intratumoral im normalen Epithel, STIC und Karzinom (entsprechend $P=0,763$ und $P=0,111$) ergeben. Dafür ist einen hoch signifikanten Anstieg vom Lymphozytengehalt im Stroma des normalen Tubenepithels verglichen mit der Lymphozytenzahl bei STIC ($P=0,004$) und in invasivem Karzinom ($P<0,001$) ersichtlich. Basierend auf diesen Ergebnissen ist in dieser Arbeit nachgewiesen, dass die STIC-Läsion - bei statistisch hoch signifikanter T-Zellinfiltration in der CD3-, CD8- und CD103-Färbungen - eine Immunantwort im Stroma bewirkt.

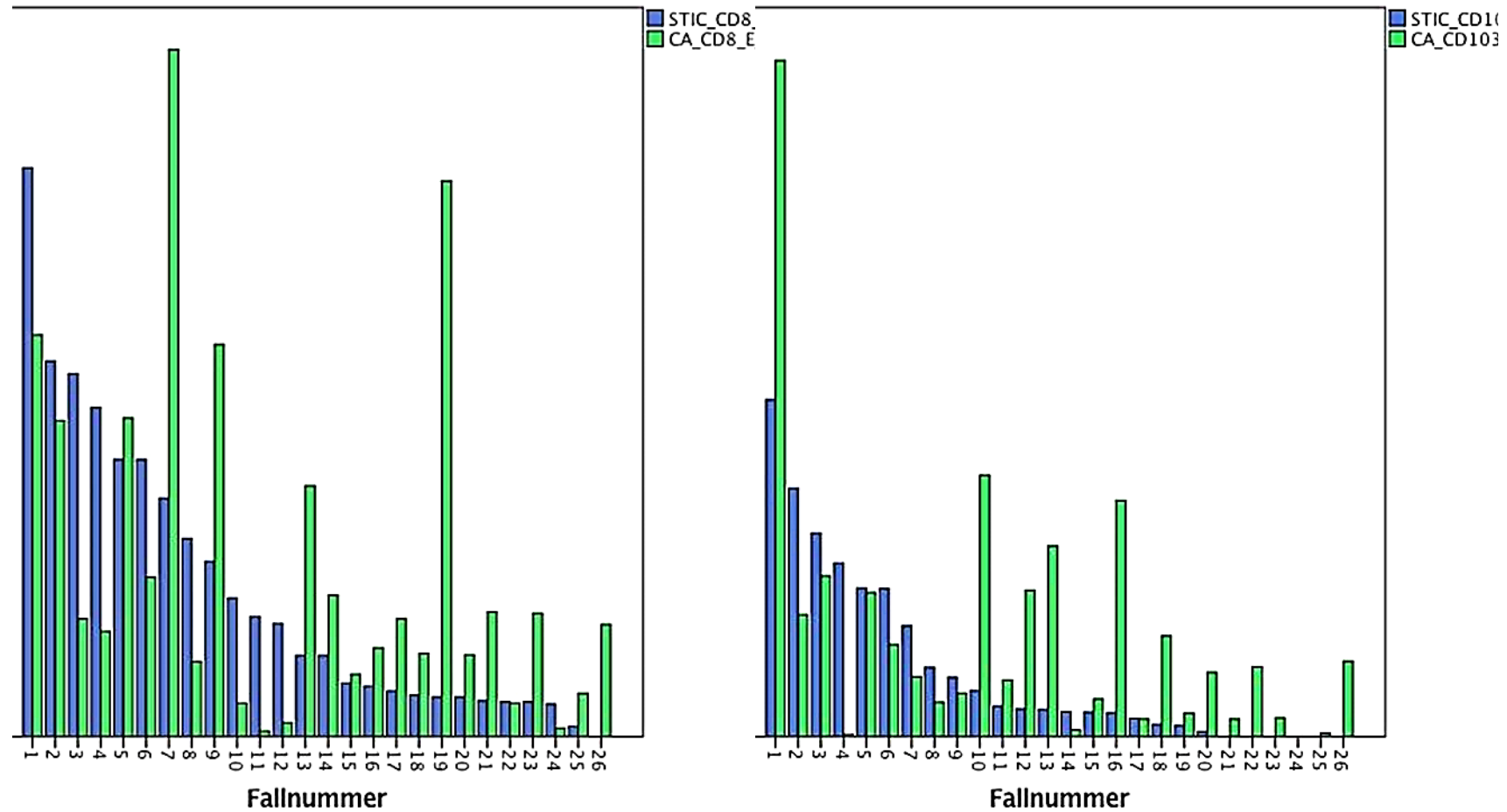


Abbildung 3.7: Verteilung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten in STIC und in korrespondierendem Karzinom für CD8- und CD103-Expression in den 26 Fällen aus unserem Untersuchungskollektiv. Zelldichte der immunkompetenten T-Lymphozyten in STIC-Läsionen positiv korreliert mit Immunantwort in den korrespondierenden invasiven Karzinomen.

In der Abbildung 3.7 ist beispielweise die Verteilung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten in den STICs und in den korrespondierenden Karzinomen für CD8- und CD103-Expression gezeigt. In der Mehrheit der Fälle beobachtete man die Tendenz, dass die Zelldichte der immunkompetenten T-Lymphozyten in den STIC-Läsionen mit Immunantwort in den korrespondierenden invasiven Karzinomen positiv korreliert.

Eine signifikante Korrelation zwischen STIC und Karzinom zeigte sich für folgende Lymphozytenpopulationen:

- CD103 positive tumorinfiltrierende intraepitheliale Lymphozyten (Korrelationskoeffizient 0,618; P= 0,013);
- CD103 positive Lymphozyten im Stroma (Korrelationskoeffizient 0,565; P=0,003);
- CD8 positive tumorinfiltrierende intraepitheliale Lymphozyten (Korrelationskoeffizient 0,402; P=0,042).

Keine signifikante Korrelation zwischen STIC und Karzinom zeigte sich für folgende Lymphozytenpopulationen:

- CD3 positive tumorinfiltrierende intraepitheliale Lymphozyten (Korrelationskoeffizient 0,303; P=0,132);
- CD3 positive Lymphozyten im Stroma (Korrelationskoeffizient 0,321; P=0,110);
- CD8 positive Lymphozyten im Stroma (Korrelationskoeffizient 0,278; P=0,169).

4 Diskussion

Es gibt wenige Daten zur Immunantwort in den Vorläufer-Läsionen von invasivem serösem high-grade Karzinom des weiblichen Genitaltraktes. In unserer Arbeit wurde schrittweise den Entstehungsweg von STIC-Läsionen zu HGSC verfolgt. Wir haben uns darauf konzentriert die immunkompetenten Zellen, vor allem zytotoxische T-Zellen zu quantifizieren und ihre Rolle in STICs zu untersuchen, abhängig von ihrer Lage intratumoral oder im angrenzenden Stroma. Es zeigte sich insgesamt eine heterogene Immunantwort in den STIC-Läsionen. Basierend auf unseren morphologischen Beobachtungen formulieren wir die Hypothese, dass sowohl CD3- als auch CD8-positive T-Lymphozyten in einer Mehrheit der STIC-Läsionen deutlich reduziert sind, im Vergleich zum normalen Epithel. Somit zeigt sich eine deutlich verminderte Immunantwort in STICs im Vergleich zum normalen Epithel. In unserer quantitativen Analyse war dieser Unterschied nur für CD3 positiven Lymphozyten signifikant. Die vorliegende Arbeit zeigte weiterhin, dass die STIC-Läsion bei statistisch hoch signifikanter T-Zellinfiltration in der CD3-, CD8- und CD103-Färbungen eine Immunantwort in angrenzendem Stroma bewirkt. Die invasiven Karzinome zeigten ungefähr gleiche Zahl von Fällen mit viel und wenig TILs. Die Zelldichte von immunkompetenten T-Lymphozyten in den STIC-Läsionen korreliert positiv mit Immunantwort in den korrespondierenden invasiven Karzinomen.

Eine prognostische Bedeutung von TIL in den STIC-Läsionen wurde bis jetzt anhand von quantitativen Kriterien sehr unzureichend untersucht. Allerdings gab es bis jetzt nur eine Studie [76], die eine potenzielle Rolle von T-Lymphozyten in den STIC-Läsionen - abhängig von BRCA-Status und von ovariellen Zyklus - untersucht hat. Dabei wurden Immuninfiltrate in STICs in zwei Untersuchungsgruppen mit und ohne BRCA1/2-Mutation beobachtet. Laut dieser Studie scheinen die Makrophagen intraepithelial als vorherrschende Zellpopulation in STICs zu sein. Bis her ging man davon aus, dass die T-Zell-

Infiltration später bei weiterer maligner Progression auftritt. Das Zellinfiltrat wurde unter Verwendung von automatisierter Bildanalyse-Software analysiert und es wurde ein, bereits in anderer Studie beschriebenes, Score-System verwendet [81] mit Angaben von Prozentsatz der positiven Zellen. Eine spezifische Lage der Lymphozyten wurde dabei jedoch nicht in Betracht gezogen. So wurden sowohl intraepitheliale Lymphozyten als auch Lymphozyten im subepithelialen Stroma zusammengezählt. Dabei kann eine präzise Trennung beider Lymphozytengruppen in der gefältelten tubalen Schleimhaut eine herausfordernde Aufgabe für das moderne Bildanalyzesystem darstellen. Zum ersten Mal berichtete man über Anwesenheit von CD3+ und CD8+ Lymphozyten und Gesamtzunahme von CD8+ Zellen in STIC, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen diesen Parameter in STIC und invasivem Karzinom oder STIC und normalem Epithel. Es wurden statistisch keine signifikanten Unterschiede von CD3- und CD8-Expression in den Patientengruppen mit prä- oder postovulatorischem ovariellen Zyklus festgestellt. [76]

In vorliegender Arbeit haben wir 26 STIC-Läsionen nach den von anderen Autoren veröffentlichten und standardisierten Kriterien [82, 83] diagnostiziert. Die von uns verwendete CD3-, CD8- und CD103- Marker stellen robuste Biomarker für Identifizierung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Tumorgewebe dar. Wir entwickelten einen einfachen Algorithmus, um die Lymphozyten intraepithelial/intratumoral sowie in angrenzendem Stroma pro 1 mm² zu quantifizieren. Für die Auswertung von CD3-, CD8- und CD103-positive Lymphozyten in STICs, in benachbarter unauffälliger tubaler Schleimhaut und in korrespondierendem invasivem Karzinom wurden eine kombinierte computergestützte Bildanalyse und ein manueller Zählalgorithmus verwendet. Als Messergebnis resultierte daraus die absolute Zahl von T-Lymphozyten

- bezogen auf Fläche für korrespondierende invasive Karzinome und
- bezogen auf Strecke pro 1 mm² für STIC-Läsionen und normales Epithel.

Wir konnten zeigen, dass alle drei Marker CD3, CD8 und CD103 in STIC-angrenzendem Stroma mindestens fünffach erhöht waren. In den STIC-

Läsionen selbst (intraepithelial) zeigte sich hingegen eine überwiegend niedrige Zahl von TILs. In vielen Fällen in STIC-Läsionen blieb die Anzahl von TILs sogar unterhalb des normalen Niveaus (Referenzgrenze 2 bis 5,5 Zellen pro 1mm). Aufgrund dessen haben wir vermutet, dass eine Unterdrückung der zellulären Immunantwort bei der Entwicklung dieser Subgruppe der STIC-Läsionen vorliegt, die möglicherweise zu einer ungestörten intraepithelialen Ausbreitung der neoplastischen Zellen führt. Wir untersuchten die Beziehung von CD103 positiven Lymphozyten zu den anderen Komponenten der Immunantwort sowohl in STIC als auch in invasivem serösem Karzinom. Interessanterweise korrelierte die Zahl von CD103+ tumorinfiltrierenden Lymphozyten positiv mit der Anzahl von CD3+ und CD8+ TILs. Somit waren, unserer Meinung nach, die meisten CD103+ Zellen tatsächlich eine Untergruppe von CD8+ zytotoxischen TILs und nicht CD56+ NK-Zellen. Darüber hinaus fanden wir eine signifikante Korrelation zwischen CD103+, CD8+ TILs in STIC und dem assoziierten Karzinom. Diese Beobachtung verknüpft CD103+ und CD8+ Lymphozyten mit einer tumorantigenspezifischen Immunantwort, die bereits auf der Ebene von STIC-Läsionen ausgelöst wird. Die zytotoxischen T-Lymphozyten im subepithelialen Stroma spielen vermutlich eine entscheidende Rolle, um die Mikroumgebung ungünstig für die Vorläuferläsion zu ändern. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass sich nicht alle STIC-Läsionen im Verlauf in invasive Karzinome entwickeln.

Wie schon von George et al. [76] erwähnt wurde, darf aber nicht die Anwesenheit von Lymphozyten innerhalb der histologisch nichtneoplastischen tubalen Schleimhaut - das heißt bei einer chronischen Salpingitis - als Kriterium für ein erhöhtes oder geringes Karzinomrisiko interpretiert werden.

Es wurden bis jetzt mehrere Arbeiten publiziert, die sich mit Quantifizierung von TILs in invasiven Ovarialkarzinomen - abhängig von ihrer Lage unmittelbar im Tumorgewebe oder im Stroma - beschäftigte. Die Präsenz von CD3, CD8, CD103 positiven Lymphozyten sowie ihre Kombination in HGSC gelten als unabhängige Prognosefaktoren für progressionsfreies und gesamtes Überleben der erkrankten Patientinnen [62, 69, 74]. In einigen Studien davon wurden aber

oft außer seröser high-grade Ovarialkarzinomen noch andere histologische Variante wie endometrioid, klarzellige und muzinöse Ovarialkarzinome in der Analyse miteingezogen [49]. In der vorliegenden Arbeit liegen die gerechnete Mittelwerte für invasive high-grade seröse Karzinome von 522 CD3+ Lymphozyten, 247 CD8+ Lymphozyten und 184 CD103+ Lymphozyten pro 1mm² intratumoral. Diese Daten korrelieren mit den von anderen Autoren veröffentlichten Daten, wie z.B. Tomsova et al. [69] zeigte. Die Verteilung von TILs in invasiven Karzinomen in der Arbeit von Al-Attar et al. [49] variierte von 1 bis 184 Lymphozyten/mm². Im Stroma wurde CD3+ lymphozytäre Infiltration nur als vorhanden oder fehlend beurteilt [49]. Die offensichtliche Diskrepanzen in Ergebnissen zwischen diesen Arbeiten (vorliegende Arbeit und von anderen Autoren [49, 60, 69]) sind möglicherweise durch methodische Unterschiede erklärbar. In einigen Studien gab es keine getrennte Auswertung von intratumoralen und stromalen Lymphozyten und ihre Lage im Tumorgewebe wurde nicht wirklich berücksichtigt [52].

Heutzutage zeigen sich allerdings deutliche Fortschritte in Kenntnissen der Molekularbiologie der high-grade serösen Ovarialkarzinome. Die aktuellste Studie publizierte Ergebnisse zur Genexpressionsanalyse einer Gruppe von HGSC mit und ohne assoziierte STIC-Läsionen und verglich die genomische Daten mit denen in normalem Gewebe aus jeder möglichen Ursprungsort. Dabei zeigte sich eine bessere Korrelation (Korrelationskoeffizient 0,73) zwischen Tumorproben von HGSC und Eileitergewebe, als zwischen HGSC und Ovarialgewebe (Korrelationskoeffizient 0,66) oder Peritoneum (Korrelationskoeffizient 0,56). Die Autoren berichteten über keine molekularen Unterschiede zwischen HGSC mit und ohne STICs, was der Ursprungsort aus Tubenepithel bestätigt. [84]

Eine andere aktuelle Publikation hat mittels Whole-Exome Sequencing die lineare Entwicklung von HGSC aus STIC-Läsionen mit progressiver Zunahme der klonalen Veränderungen in TP53, BRCA1, BRCA2 oder PTEN Genen nachgewiesen [10].

Das immunhistologische Profil einiger in-situ Läsionen wird aktuell sehr breit diskutiert. Es wurden in letzter Zeit zahlreiche Fälle mit duktalem Carcinoma in-situ (DCIS) bei gesichertem triple-negativem Mammakarzinom untersucht. Die DCIS-Komponente und invasive Karzinome zeigten in diesen Studien das ähnliche signifikante perifokale lymphozytäre Infiltrat [85, 86]. Hendry et al. [87] quantifizierte TILs im DCIS-angrenzenden Stroma und stellte fest, dass die DCIS-Komponente ähnliche signifikante lymphozytäre Infiltration wie bei assoziierten invasiven triple-negativen Mamma-Karzinomen zeigt [87].

Eine kleine Studie hat bei Patienten mit Melanoma in situ einen positiven Effekt von lokaler Anwendung eines Medikamentes mit Immunzellen untersucht. Zum therapeutischen Ansatz wurden grundsätzlich Bestandteile eines entzündlichen Infiltrates, wie T-Helferzellen, signifikant hohe Zahl zytotoxischer Zellen, Monozyten oder Makrophagen angewandt. Bei den posttherapeutischen Kontrolluntersuchungen zeigten sich keine Residuen von Melanoma in situ. Dabei könnte die T-lymphozelluläre Immunantwort die Apoptose von neoplastischen Melanozyten auslösen. [88]

Es stellt sich logischerweise nächste Frage: warum sind die tumorinfiltrierende Lymphozyten vor allen in invasiven Ovarialkarzinomen und in einigen STICs nicht in der Lage, das Tumorwachstum erfolgreich zu hemmen?

Diesbezüglich gibt es wenige Berichte über alternative molekularpathologischen Aspekte und Immunantwort in HGSC [89-91]. Es gibt plausible Hypothesen, dass die unterschiedliche Immunantworten auf verschiedene genetische Mutationen unter Ausbildung heterogener Tumorzellpopulation zurückzuführen ist. In vorliegender Arbeit wie auch in anderen Publikationen wird zusätzlich vermutet, dass das seröse high-grade Ovarialkarzinom unterschiedliche Antigene - einschließlich Neoantige – exprimiert, und damit wird eine spezifische zelluläre Immunantwort moduliert [57, 58].

So wird aktuell sehr aktiv eine Verteilung, Homogenität und Expressionsstärke von dem Oberflächenprotein PD-1 (eng.: Programmed cell death protein 1) sowie seine Interaktion mit PD-L1 (eng.: Programmed cell death 1 ligand 1) in

soliden Tumoren untersucht. Unter normalen physiologischen Bedingungen sind die Immun-Checkpoint-Proteine (wie z.B. PD-1-Rezeptor) für Verhinderung der Autoimmunreaktionen und für Schutz vor Gewebsschaden bei einer Immunreaktion auf Infektion verantwortlich. Es ist bekannt, dass die Immun-Checkpoint-Inhibitoren die Funktion von TILs (CD8+ Effektor-Zellen) fehlregulieren können. Gleichzeitig werden ihre Liganden in transformierten Tumorzellen überexprimiert. Es resultiert sich daraus eine Immunresistenz in der Tumormikroumgebung. [92]

Es wird angenommen, dass die durch ihre Liganden verstärkte PD-1-Expression an Anergie der T-Effektorzellen beteiligt ist. Es wurde eine PD-1-Koexpression in CD8/CD103 positiven T-Lymphozyten im invasiven Ovarialkarzinom nachgewiesen. Es ist denkbar, dass die erhöhte Expression von PD-1 auf TILs zu einer verminderten Zytokinproduktion und Erschöpfung des zytotoxischen Effektes führen könnte. [92, 93]

Laut zahlreichen Studien wird der positive PD-1-Status in unterschiedlichen soliden Tumoren mit einer schlechten oder wiederum mit einer deutlich besseren Überlebensrate assoziiert [61, 94-98]. In vielen Fällen z.B. bei triple-negativen invasiven Mammakarzinomen korreliert die PD-1-Expression mit dem ausgeprägten Immuninfiltrat [99, 100].

Andererseits wie bereits erwähnt, ist der Nachweis von Immunzellen in der Tumormikroumgebung nicht immer mit guter Prognose assoziiert [49]. So hemmen die regulatorische CD4+ T-Lymphozyten die adaptive Immunantwort und können die Tumorangiogenese fördern. Damit wird Tumorwachstum und Metastasierung unterstützt [50, 51]. Bösmüller et al. [101] berichtete über deutlich erhöhte Zahl von CD4+ und CD8+ Lymphozyten in peritumoralem Stroma von HGSC. Unmittelbar im Tumor wurden aber überwiegend CD3+, CD103+ und CD56+ Zellen detektiert [101].

Wir haben versucht die Immunantwort in HGSC mit der Immunantwort in STICs zu vergleichen. Leider war es nicht möglich die Ergebnisse lymphozytärer

Infiltration unserer Arbeit in absoluten Zahlen mit den Ergebnissen oben beschriebener Arbeit von George et al. [76] in Prozenten zu vergleichen.

Die Aussagekraft der in unserer Arbeit durchgeführten Untersuchungen war eingeschränkt, da sich die STIC-Läsionen fast ausschließlich als kleine Areale dargestellt haben. Diese Areale in Einzelfällen waren nicht mehr in tieferen Stufen vorhanden.

Die TILs in verschiedenen invasiven Karzinomen sind als ein prognostischer Faktor gut etabliert. Allerdings vermuten wir, dass die Ausprägung und Expressionsmuster von tumorinfiltrierenden Lymphozyten in den STIC-Läsionen möglicherweise eine prognostische Bedeutung hat. Eine weitere Analyse der immunologischen Parameter ist bei Patientinnen mit Vorläufer-Läsionen erforderlich, um die Rolle der tumorinfiltrierenden Lymphozyten besser zu verstehen. Allerdings müssen noch Grenzwerte von Lymphozytenzahl mit Bezug auf ihre genaue Lage intratumoral/stromal festgelegt werden. In Zukunft ist es sinnvoll auch die Ovarialkarzinome und STICs in einem großen Untersuchungskollektiv zu untersuchen. Außerdem ist es auch interessant in Zukunft eine Gruppe von STICs und korrespondierenden Ovarialkarzinomen zu untersuchen, in denen keine TILs somit keine Immunantwort stattgefunden hat. Bezüglich Anwesenheit der intraepithelialen Lymphozyten als Kontrollproben sollte man auch die tumorfreie und dysplasiefreie tubale Schleimhaut von anderen gesunden Frauen verwenden. In unserer Arbeit waren die Areale mit unauffälliger Schleimhaut von gleichen Patientinnen analysiert mit durchschnittlicher Lymphozytenzahl von 328/mm² für CD3+, 295/mm² für CD8+ und 111/mm² für CD103+ Antikörper, was etwas höher ist als die Lymphozytenzahl der normalen tubalen Schleimhaut in der Arbeit von Ardighieri et al. [102] mit 120/mm² CD3+ und 160/mm² CD+ Zellen.

Zusammenfassung

Zielsetzung: Viele Studien in früheren Zeiten zeigten, dass seröses tubales intraepitheliales Karzinom (engl.: serous tubal intraepithelial carcinoma) eine Vorläufer-Läsion von HGSC darstellt. Die Tuben mit Vorhandensein der intraepithelialen Lymphozyten, als angeborenen und adaptiven Immunzellkomponenten, haben große Bedeutung in der Entstehungstheorie der Vorläufer-Läsionen von HGSC. Nach aktuellem Kenntnisstand, spielen Neoantigene sowie die zelluläre Immunantwort eine entscheidende Rolle in Karzinogenese und Tumoreliminierung. Die Ergebnisse zahlreicher Studien über prognostische Bedeutung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten wiesen den Weg zur Fragestellung der vorliegenden Arbeit. In dieser Arbeit sollten wir erforschen, ob eine Immunantwort in der STIC-Läsion und ihrer Mikroumgebung stattfindet, und welche immunkompetenten Zellen an der Immunantwort in den Vorläuferläsionen beteiligt sind. Außerdem sollte eine mögliche Korrelation zwischen der Immunantwort in STICs und in den assoziierten Karzinomen untersucht werden.

Material und Methoden: Es wurde eine Datenbank mit 23 Fällen von high-grade serösen Karzinomen des kleinen Beckens und insgesamt 29 assoziierten STIC-Läsionen zusammengefasst. In allen detektierten STIC-Läsionen wurden CD3, CD8 und CD103 positive Lymphozyten dargestellt und sowohl manuell als auch mithilfe digitaler Bildanalyse quantifiziert. Danach wurden Korrelationen und signifikante Unterschiede von TILs bei Vorläuferläsionen, bei korrespondierenden invasiven high-grade serösen Karzinomen im Vergleich zur Lymphozytenzahl in normalem Tubenepithel stromal und unmittelbar intratumoral/intraepithelial statistisch analysiert.

Ergebnisse: In neoplastischem Epithel der STIC-Läsionen zeigte sich eine signifikante Reduzierung der CD3+ TILs ($P=0,03$) und deutlich jedoch nicht signifikant verminderte Zahl der CD8+ TILs ($P=0,146$) pro 1 mm² Epithelstrecke im Vergleich zum normalen Epithel. In STIC-angrenzendem Stroma zeigte sich

eine sehr hohe signifikante Zahl von TILs mit 377/mm² CD3-positiven (P<0,001), 181/mm² CD8-positiven (P<0,001) und 44/mm² CD103-positiven (P=0,004) Lymphozyten. In den korrespondierenden invasiven Karzinomen steigt die Lymphozytenzahl in tumoralem Stroma weiterhin deutlich signifikant in den CD3-, CD8- und CD103-Färbungen (P<0,001). Die Zelldichte von immunkompetenten T-Lymphozyten in den STIC-Läsionen korrelierte positiv mit Immunantwort in den korrespondierenden invasiven Karzinomen.

Schlussfolgerung: Die Dichte von CD3, CD8 und CD103 positiven TILs in den STIC-Läsionen kann in Analogie zu invasiven Ovarialkarzinomen als Indikator der zellulären Immunantwort betrachtet werden. Die durchgeführte Lymphozyten-Quantifizierung bestätigte unsere Beobachtung, dass die intraepithelialen Lymphozyten in den STIC-Läsionen im Durchschnitt geringer sind als im nichtneoplastischen tubalen Epithel. Die geringe Zahl zytotoxischer Zellen in den STIC-Läsionen kann auf eine eingeschränkte zelluläre Immunantwort hinweisen und begünstigt möglicherweise eine ungestörte intraepitheliale Ausbreitung von neoplastischen Zellen. Hingegen bewirkt die signifikante mindestens fünffach erhöhte Zunahme der TILs im Stroma eine Immunantwort in der STIC-Mikroumgebung, was einen weiteren invasiven Prozess in der Tube hemmen könnte. Es ist denkbar, dass diese Prozesse in STICs eine längere nicht-invasive Phase der Vorläufer-Läsionen in den Tuben begünstigen. Es zeigt sich außerdem eine signifikante Korrelation zwischen der Zahl der Lymphozyten in der Umgebung der STIC und dem korrespondierenden Karzinom. Somit ist die Modulation der Immunantwort als Charakteristikum einzelner Tumoren schon in der Phase der Vorläuferläsion relevant.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Zusammenstellung der statistischen Daten mit Inzidenz und Mortalität der 24 häufigsten Krebserkrankungen der Frauen in Deutschland [1].....	8
Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Studienkollektivs aufgeschlüsselt nach histologischem Subtyp, den klinisch-pathologischen Parametern, Tumorstadium und Lymphknotenstatus.....	24
Tabelle 2.2: Punktesystem zu Bewertung der immunhistochemischen Färbung für p53-Protein	26
Tabelle 2.3: Übersichtstabelle über die verwendeten Antikörper	29
Tabelle 3.1: Ergebnisse der immunhistochemischen p53-Färbung im Untersuchungskollektiv.....	36
Tabelle 3.2: Signifikanzniveau für Stichproben mit paarigen Werten von CD3- und CD8-Expression im Epithel, in STIC und Karzinom.....	42
Tabelle 3.3: Signifikanzniveau für Stichproben mit paarigen Werten von CD103-Expression in normalem Epithel, in STIC und im Karzinom	43
Tabelle 3.4: Übersichtstabelle mit Mittelwerten, Standardfehler der Mittelwerte der Lymphozytenzahl und Signifikanzniveau in normalem Epithel und in STICs pro 1mm ²	44

Bilderverzeichnis

Abbildung 1.1: Prozentuales relatives Überleben beim Ovarialkarzinom in Abhängigkeit vom FIGO*-Stadium und der Histologie (serös und muzinös) (n=2606) [1]	9
Abbildung 1.2: Entstehungsmodell und Progressionswege der low-grade (LGSC) und high-grade (HGSC) serösen Karzinome.....	12
Abbildung 1.3: Protokoll kompletter ausführlicher Inspektion und mikroskopischer Untersuchung der Tuben [19]	14
Abbildung 2.1: Häufigkeitsverteilung (%) der unterschiedlichen histologischen Subtypen der high-grade serösen Karzinome im Gesamtkollektiv. .	25
Abbildung 2.2: Prinzip der Immunhistochemie (zur Verfügung gestellt von der Firma Roche).....	28
Abbildung 2.3: Normales Epithel mit mittels Difiנים Tissue Studio™ Programms markiertem Epithel und subepitheliale Stroma, CD3-Färbung, Vergrößerung x20µm.	32
Abbildung 2.4: STIC mit mittels Difiנים Tissue Studio™ Programms markiertem neoplastischem Epithel und subepitheliale Stroma, CD3-Färbung, Vergrößerung x50µm.....	33
Abbildung 2.5: Invasives high-grade seröses Karzinom mit insgesamt vier mittels des Difiנים Tissue Studio™ Programms markierten Arealen: zwei Areale mit Tumor und zwei Areale mit angrenzendem peritumoralem Stroma. In der Abbildung ein Tumor-Areal und ein Stroma-Areal miterfasst, Vergrößerung x50µm.....	34
Abbildung 2.6: Detektionsergebnisse nach Kernererkennung oder z.B. Detektion der Kernen nach Intensität (Defiנים Tissue Studio™ 2.1.1, User Guide [80]).....	35
Abbildung 3.1: Invasive seröse high-grade Karzinome mit viel (a, b, c) und wenig (d, e, f) tumorinfiltrierenden Lymphozyten in CD3-, CD8- und CD103-Färbungen, Vergrößerung x400.	38

Abbildung 3.2: Normales Epithel (a), STIC (b) und invasives Karzinom (c) mit immunhistochemischer Darstellung der intraepithelialen/tumorinfiltrierenden Lymphozyten in der CD3-Färbung, Vergrößerung x400.	39
Abbildung 3.3: Normales Epithel (a, d, g), STIC mit viel (b, e, h) und wenig(c, f, i)intraepithelialen/ tumorinfiltrierenden Lymphozyten in CD3-, CD8- und CD103- Färbungen, Vergrößerung x200.	40
Abbildung 3.4: Graphische Darstellung der Verteilung der intraepithelialen/tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten im Vergleich: normales Epithel/STIC/Karzinom.....	45
Abbildung 3.5: Graphische Darstellung der Lymphozytenzahl subepithelial und in der Tumor-Mikroumgebung für CD3- und CD8- Färbung in normalem Epithel /STIC/Karzinom	46
Abbildung 3.6: Graphische Darstellung der Verteilung der CD103-markierten Lymphozyten im Vergleich normales Epithel/STIC/Karzinom.....	47
Abbildung 3.7: Verteilung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten in STIC und in korrespondierendem Karzinom für CD8- und CD103-Expression in den 26 Fällen aus unserem Untersuchungskollektiv.	48

Literaturverzeichnis

1. Holzel, D., et al., [Clinical and epidemiological cancer registration in Germany]. *Pathologie*, 2016. **37**(4): p. 371-87.
2. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. *CA Cancer J Clin*, 2013. **63**(1): p. 11-30.
3. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*, 2011. **61**(2): p. 69-90.
4. Lee, Y., et al., *A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube*. *J Pathol*, 2007. **211**(1): p. 26-35.
5. Kurman, R.J., et al., *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. 4 ed. Vol. 6. 2014: International Agency for Research on Cancer.
6. Prat, J. and F.C.o.G. Oncology, *Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum*. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2014. **124**(1): p. 1-5.
7. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(5): p. 1511-8.
8. Vang, R., M. Shih Ie, and R.J. Kurman, *Fallopian tube precursors of ovarian low- and high-grade serous neoplasms*. *Histopathology*, 2013. **62**(1): p. 44-58.
9. Kindelberger, D.W., et al., *Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship*. *Am J Surg Pathol*, 2007. **31**(2): p. 161-9.
10. Labidi-Galy, S.I., et al., *High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 1093.
11. Kuo, K.T., et al., *Analysis of DNA copy number alterations in ovarian serous tumors identifies new molecular genetic changes in low-grade and high-grade carcinomas*. *Cancer Res*, 2009. **69**(9): p. 4036-42.
12. Gorringer, K.L., et al., *Copy number analysis identifies novel interactions between genomic loci in ovarian cancer*. *PLoS One*, 2010. **5**(9): p. 11408.
13. Saida, T., et al., *Revised FIGO staging system for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: important implications for radiologists*. *Jpn J Radiol*, 2016. **34**(2): p. 117-24.
14. Karst, A.M. and R. Drapkin, *Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution*. *J Oncol*, 2010. **2010**: p. 932371.
15. Cancer Genome Atlas Research, N., *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*. *Nature*, 2011. **474**(7353): p. 609-15.
16. Karst, A.M., K. Levanon, and R. Drapkin, *Modeling high-grade serous ovarian carcinogenesis from the fallopian tube*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(18): p. 7547-52.
17. Przybycin, C.G., et al., *Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin?* *Am J Surg Pathol*, 2010. **34**(10): p. 1407-16.
18. McCluggage, W.G., et al., *Data set for reporting of ovary, fallopian tube and primary peritoneal carcinoma: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR)*. *Modern Pathology*, 2015. **28**: p. 1101.
19. Medeiros, F., et al., *The Tubal Fimbria Is a Preferred Site for Early Adenocarcinoma in Women With Familial Ovarian Cancer Syndrome*. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2006. **30**(2): p. 230-236.
20. Hu, C.Y., M.L. Taymor, and A.T. Hertig, *Primary carcinoma of the fallopian tube*. *Am J Obstet Gynecol*, 1950. **59**(1): p. 58-67.

21. Sedlis, A., *Carcinoma of the fallopian tube*. Surg Clin North Am, 1978. **58**(1): p. 121-9.
22. Longacre, T.A., et al., *Recommendations for the reporting of fallopian tube neoplasms*. Virchows Arch, 2007. **450**(1): p. 25-9.
23. Mehrad, M., et al., *A pathologist's road map to benign, precancerous, and malignant intraepithelial proliferations in the fallopian tube*. Adv Anat Pathol, 2010. **17**(5): p. 293-302.
24. Piek, J.M., et al., *Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer*. J Pathol, 2001. **195**(4): p. 451-6.
25. Rebbeck, T.R., *Prophylactic oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. Eur J Cancer, 2002. **38 Suppl 6**: p. S15-7.
26. Salvador, S., et al., *Chromosomal instability in fallopian tube precursor lesions of serous carcinoma and frequent monoclonality of synchronous ovarian and fallopian tube mucosal serous carcinoma*. Gynecol Oncol, 2008. **110**(3): p. 408-17.
27. Vang, R. and J.E. Wheeler, *Diseases of the Fallopian Tube and Paratubal Region*, in *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, R.J. Kurman, L.H. Ellenson, and B.M. Ronnett, Editors. 2011, Springer US: Boston, MA. p. 529-578.
28. Carlson, J.W., et al., *Serous tubal intraepithelial carcinoma: its potential role in primary peritoneal serous carcinoma and serous cancer prevention*. J Clin Oncol, 2008. **26**(25): p. 4160-5.
29. Levanon, K., C. Crum, and R. Drapkin, *New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact*. J Clin Oncol, 2008. **26**(32): p. 5284-93.
30. Jarboe, E., et al., *Serous carcinogenesis in the fallopian tube: a descriptive classification*. Int J Gynecol Pathol, 2008. **27**(1): p. 1-9.
31. Roh, M.H., D. Kindelberger, and C.P. Crum, *Serous tubal intraepithelial carcinoma and the dominant ovarian mass: clues to serous tumor origin?* Am J Surg Pathol, 2009. **33**(3): p. 376-83.
32. Sehdev, A.S., et al., *Serous tubal intraepithelial carcinoma upregulates markers associated with high-grade serous carcinomas including Rsf-1 (HBXAP), cyclin E and fatty acid synthase*. Mod Pathol, 2010. **23**(6): p. 844-55.
33. Callahan, M.J., et al., *Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction*. J Clin Oncol, 2007. **25**(25): p. 3985-90.
34. Shaw, P.A., et al., *Candidate serous cancer precursors in fallopian tube epithelium of BRCA1/2 mutation carriers*. Mod Pathol, 2009. **22**(9): p. 1133-8.
35. Meserve, E.E.K., et al., *Frequency of "incidental" serous tubal intraepithelial carcinoma (STIC) in women without a history of or genetic risk factor for high-grade serous carcinoma: A six-year study*. Gynecol Oncol, 2017. **146**(1): p. 69-73.
36. Crum, C.P., *Intercepting pelvic cancer in the distal fallopian tube: theories and realities*. Mol Oncol, 2009. **3**(2): p. 165-70.
37. Lee, Y., et al., *Advances in the recognition of tubal intraepithelial carcinoma: applications to cancer screening and the pathogenesis of ovarian cancer*. Adv Anat Pathol, 2006. **13**(1): p. 1-7.
38. Eckert, M.A., et al., *Genomics of Ovarian Cancer Progression Reveals Diverse Metastatic Trajectories Including Intraepithelial Metastasis to the Fallopian Tube*. Cancer Discov, 2016. **6**(12): p. 1342-1351.
39. Kuhn, E., et al., *Shortened telomeres in serous tubal intraepithelial carcinoma: an early event in ovarian high-grade serous carcinogenesis*. Am J Surg Pathol, 2010. **34**(6): p. 829-36.

40. Jarboe, E.A., et al., *Tubal and ovarian pathways to pelvic epithelial cancer: a pathological perspective*. *Histopathology*, 2009. **55**(5): p. 619.
41. Schumacher, K., et al., *Prognostic Significance of Activated CD8+ T Cell Infiltrations within Esophageal Carcinomas*. *Cancer Research*, 2001. **61**(10): p. 3932-3936.
42. Marrogi, A.J., et al., *Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor- β as prognostic factors in breast carcinoma*. *International Journal of Cancer*, 1997. **74**(5): p. 492-501.
43. Halpern, A.C. and L.M. Schuchter, *Prognostic models in melanoma*. *Semin Oncol*, 1997. **24**(1 Suppl 4): p. 2-7.
44. Vesalainen, S., et al., *Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma*. *Eur J Cancer*, 1994. **30A**(12): p. 1797-803.
45. Brasanac, D., et al., *Immunohistochemical analysis of HLA class II antigens and tumor infiltrating mononuclear cells in renal cell carcinoma: correlation with clinical and histopathological data*. *Neoplasma*, 1999. **46**(3): p. 173-8.
46. Csiszar, A., et al., *Characterisation of cytokine mRNA expression in tumour-infiltrating mononuclear cells and tumour cells freshly isolated from human colorectal carcinomas*. *Eur Cytokine Netw*, 2001. **12**(1): p. 87-96.
47. Balch, C.M., et al., *Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers*. *Arch Surg*, 1990. **125**(2): p. 200-5.
48. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
49. Al-Attar, A., et al., *T cell density and location can influence the prognosis of ovarian cancer*. *Pathol Oncol Res*, 2010. **16**(3): p. 361-70.
50. Dougan, M. and G. Dranoff, *The Immune Response to Tumors*, in *Current Protocols in Immunology*. 2001, John Wiley & Sons, Inc.
51. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
52. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(3): p. 203-13.
53. Helal Tel, A., et al., *Immunophenotyping of tumor-infiltrating mononuclear cells in ovarian carcinoma*. *Pathol Oncol Res*, 2004. **10**(2): p. 80-4.
54. Yang, T., et al., *CD8+ T cells induce complete regression of advanced ovarian cancers by an interleukin (IL)-2/IL-15 dependent mechanism*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(23): p. 7172-80.
55. Freedman, R.S. and C.D. Platsoucas, *Immunotherapy for peritoneal ovarian carcinoma metastasis using ex vivo expanded tumor infiltrating lymphocytes*. *Cancer Treat Res*, 1996. **82**: p. 115-46.
56. Santin, A.D., et al., *In vitro induction of tumor-specific human lymphocyte antigen class I-restricted CD8 cytotoxic T lymphocytes by ovarian tumor antigen-pulsed autologous dendritic cells from patients with advanced ovarian cancer*. *Am J Obstet Gynecol*, 2000. **183**(3): p. 601-9.
57. Adams, S.F., et al., *Intraepithelial T cells and tumor proliferation: impact on the benefit from surgical cytoreduction in advanced serous ovarian cancer*. *Cancer*, 2009. **115**(13): p. 2891-902.
58. Raspollini, M.R., et al., *Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma*. *Ann Oncol*, 2005. **16**(4): p. 590-6.
59. Clarke, B., et al., *Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss*. *Mod Pathol*, 2009. **22**(3): p. 393-402.
60. Sato, E., et al., *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(51): p. 18538-43.

61. Hamanishi, J., et al., *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3360-5.
62. Bosmuller, H.C., et al., *Combined Immunoscore of CD103 and CD3 Identifies Long-Term Survivors in High-Grade Serous Ovarian Cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2016. **26**(4): p. 671-9.
63. Barnett, J.C., et al., *Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype*. Gynecol Oncol, 2010. **116**(3): p. 556-62.
64. Martinet, L., et al., *Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses*. Int J Cancer, 2010. **126**(9): p. 2143-52.
65. Krempski, J., et al., *Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 6905-13.
66. Robins, H.S., et al., *Digital genomic quantification of tumor-infiltrating lymphocytes*. Sci Transl Med, 2013. **5**(214): p. 214.
67. Thompson, M.S. and S.C. Mok, *Immunopathogenesis of ovarian cancer*. Minerva Med, 2009. **100**(5): p. 357-70.
68. Milne, K., et al., *Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6412.
69. Tomsova, M., et al., *Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol, 2008. **108**(2): p. 415-20.
70. Hwang, W.T., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis*. Gynecol Oncol, 2012. **124**(2): p. 192-8.
71. Cerf-Bensussan, N., et al., *A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes*. Eur J Immunol, 1987. **17**(9): p. 1279-85.
72. Kruschwitz, M., et al., *Ber-ACT8: new monoclonal antibody to the mucosa lymphocyte antigen*. J Clin Pathol, 1991. **44**(8): p. 636-45.
73. Lohmeyer, J., et al., *Expression of mucosa-related integrin alphaEbeta7 on alveolar T cells in interstitial lung diseases*. Clin Exp Immunol, 1999. **116**(2): p. 340-6.
74. Webb, J.R., et al., *Profound elevation of CD8+ T cells expressing the intraepithelial lymphocyte marker CD103 (alphaE/beta7 Integrin) in high-grade serous ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2010. **118**(3): p. 228-36.
75. Milne, K., et al., *Absolute lymphocyte count is associated with survival in ovarian cancer independent of tumor-infiltrating lymphocytes*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 33.
76. George, S.H., A. Milea, and P.A. Shaw, *Proliferation in the normal FTE is a hallmark of the follicular phase, not BRCA mutation status*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(22): p. 6199-207.
77. Soslow, R.A., et al., *Morphologic patterns associated with BRCA1 and BRCA2 genotype in ovarian carcinoma*. Mod Pathol, 2012. **25**(4): p. 625-36.
78. Howitt, B.E., et al., *Evidence for a dualistic model of high-grade serous carcinoma: BRCA mutation status, histology, and tubal intraepithelial carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2015. **39**(3): p. 287-93.
79. Guesdon, J.L., T. Ternynck, and S. Avrameas, *The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques*. J Histochem Cytochem, 1979. **27**(8): p. 1131-9.
80. Binnig, G., *Definiens: Tissue Studio™ 2.1.1. User Guide*. . 2011: Definiens AG: München, Germany. p. p. 77-103.
81. Norquist, B.M., et al., *The molecular pathogenesis of hereditary ovarian carcinoma: alterations in the tubal epithelium of women with BRCA1 and BRCA2 mutations*. Cancer, 2010. **116**(22): p. 5261-71.

82. Vang, R., et al., *Validation of an algorithm for the diagnosis of serous tubal intraepithelial carcinoma*. Int J Gynecol Pathol, 2012. **31**(3): p. 243-53.
83. Visvanathan, K., et al., *Diagnosis of serous tubal intraepithelial carcinoma based on morphologic and immunohistochemical features: a reproducibility study*. Am J Surg Pathol, 2011. **35**(12): p. 1766-75.
84. Ducie, J., et al., *Molecular analysis of high-grade serous ovarian carcinoma with and without associated serous tubal intra-epithelial carcinoma*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 990.
85. Dabbs, D.J., et al., *Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile*. Mod Pathol, 2006. **19**(11): p. 1506-11.
86. Stanton, S.E., S. Adams, and M.L. Disis, *Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review*. JAMA Oncol, 2016. **2**(10): p. 1354-1360.
87. Hendry, S., et al., *Relationship of the Breast Ductal Carcinoma In Situ Immune Microenvironment with Clinicopathological and Genetic Features*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(17): p. 5210-5217.
88. Wolf, I.H., et al., *Treatment of lentigo maligna (melanoma in situ) with the immune response modifier imiquimod*. Arch Dermatol, 2005. **141**(4): p. 510-4.
89. Pothuri, B., et al., *Genetic analysis of the early natural history of epithelial ovarian carcinoma*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. 10358.
90. Kim, J., et al., *The ovary is an alternative site of origin for high-grade serous ovarian cancer in mice*. Endocrinology, 2015. **156**(6): p. 1975-81.
91. Guan, B., et al., *Roles of deletion of Arid1a, a tumor suppressor, in mouse ovarian tumorigenesis*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(7): p. 146.
92. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
93. Webb, J.R., K. Milne, and B.H. Nelson, *PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(8): p. 926-35.
94. Taube, J.M., et al., *Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape*. Sci Transl Med, 2012. **4**(127): p. 127-37.
95. Ohigashi, Y., et al., *Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(8): p. 2947-53.
96. Wu, C., et al., *Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance*. Acta Histochem, 2006. **108**(1): p. 19-24.
97. Ghebeh, H., et al., *The B7-H1 (PD-L1) T Lymphocyte-Inhibitory Molecule Is Expressed in Breast Cancer Patients with Infiltrating Ductal Carcinoma: Correlation with Important High-Risk Prognostic Factors*. Neoplasia (New York, N.Y.), 2006. **8**(3): p. 190-198.
98. Hino, R., et al., *Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma*. Cancer, 2010. **116**(7): p. 1757-66.
99. Mittendorf, E.A., et al., *PD-L1 expression in triple-negative breast cancer*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(4): p. 361-70.
100. Beckers, R.K., et al., *Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome*. Histopathology, 2016. **69**(1): p. 25-34.
101. Bosmuller, H., et al., *Intratumoral lymphocyte density in serous ovarian carcinoma is superior to ERCC1 expression for predicting response to platinum-based therapy*. Virchows Arch, 2011. **459**(2): p. 183-91.
102. Ardighieri, L., et al., *Characterization of the Immune Cell Repertoire in the Normal Fallopian Tube*. International journal of gynecological pathology :

official journal of the International Society of Gynecological Pathologists, 2014.
33(6): p. 581-591.

A Anhang

A.1 TNM und FIGO-Klassifikation der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms

TNM	FIGO	Definition
TX		Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
T0		Kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor auf die Ovarien oder Tuben beschränkt
T1a	IA	auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1b	IB	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1c	IC	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte:
T1c1	IC1	iatrogene Kapsel- (Serosa-)ruptur
T1c2	IC2	präoperative Kapsel- (Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
T1c3	IC3	maligne Zellen im Ascites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien

TNM	FIGO	Definition
T2b	IIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1		nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Metastasen \leq 10 mm
N1b	IIIAii	Metastasen $>$ 10 mm
T3a jedes N	IIIA2	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b jedes N	IIIB	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens \leq 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c jedes N	IIIC	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens $>$ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
M1a	IVA	Pleuraerguß mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

Erklärung zum Eigenanteil

Svetlana Wenz: Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit unter wissenschaftlicher Leitung von Frau PD Dr. med. Annette Staebler im Universitätsklinikum der Eberhard-Karls Universität Tübingen, im Institut für Pathologie und Neuropathologie durchgeführt habe. Dabei erfolgte Studiendesign, Rekrutierung des Archivmaterials, Sichten der histologischen Schnitte, Zusammenstellung der histologischen Schnitte, die Auswertung immunhistochemischer Färbungen mithilfe der digitalen Bildanalyse. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Dr. med. Sophie Heüveldop: Bereitstellung der histologischen Schnitte mit HE, p53 und Mib-1 Färbungen für Patientinnenkollektiv.

Karen Greif und Christine Beschorner: Unterstützung bei der technischen Umsetzung der histologischen Schnitte und immunhistochemischen Färbungen.

Biologin Dr. rer. nat. Maike Nieser: Unterstützung bei der Durchführung der statistischen Analyse und Erstellung von Grafiken.

Biologe Dr. rer. nat. Jan Spelvelage: Unterstützung bei der digitalen Bildanalyse.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir mit Rat und Tat bei dieser Arbeit geholfen und beigestanden haben.

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

Zu außerordentlichem Dank bin ich PD Dr. med. Annette Staebler für ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion und Unterstützung meiner Arbeit. Jede Zeit war sie bereite Ansprechpartnerin, die mir in jeder Phase dieser Dissertation auch als freundliche Ratgeberin zur Seite stand.

Biologen Jan Spelvelage und Maike Nieser bin ich sehr dankbar für den Beistand bei der Daten- und Bildanalyse.

Karen Greif und Christine Beschorner bin ich sehr dankbar für ihre Unterstützung bei der technischen Umsetzung meiner Arbeit.

Meiner Familie danke ich für Liebe, Geduld, Ermutigung und Rückhalt.

Ihnen allen gebührt mein herzlicher Dank.