

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

**Charakterisierung prognostisch unterschiedlicher  
Subtypen in muzinösen Ovarialkarzinomen und  
muzinösen Borderlinetumoren durch den Faktor  
L1-CAM**

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

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

**vorgelegt von  
Wiedenhöfer, Rebekka**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. A. E. Staebler  
2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer  
3. Berichterstatter: Professorin Dr. B. Schmalfeldt

Tag der Disputation: 12.03.2024

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
<b>1 Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Ovarialkarzinome	8
1.1.1 Epidemiologie	8
1.1.2 Einteilung der epithelialen Ovarialkarzinome (EOC)	8
1.1.3 Therapie der epithelialen Ovarialkarzinome	9
1.2 Muzinöse Ovarialneoplasien	11
1.2.1 Epidemiologie	11
1.2.2 Makroskopie von sekundären muzinöser Ovarialtumoren, MBOT und MOC	11
1.2.3 Mikroskopie von MBOT, MOC und sekundären muzinösen Ovarialtumoren	12
1.2.4 Grading	15
1.2.5 Pathogenese und Molekularbiologie	16
1.2.6 Verwendung von immunhistochemischen Markern bei MBOT und MOC	18
1.2.7 Therapie bei MOC und MBOT	21
1.3 L1-CAM – ein neuer Tumormarker für MOC?	21
1.3.1 Allgemeine Funktion und Biochemie	21
1.3.2 L1-CAM – ein Tumorantigen	22
1.3.3 Signalwege	23
1.3.4 L1-CAM und EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition)	24
1.3.5 Regulation von L1-CAM	25
1.4 Ziele dieser Arbeit	27
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1 Die Kollektive	28
2.2 Tumormaterial und Review	29
2.3 Erstellung eines Tissue-Micro-Arrays (TMA)	30
2.4 Immunhistochemie (IHC)	32
2.4.1 Immunhistochemische Färbungen mit dem Detektionskit OptiView DAB	32
2.4.2 Ablauf der IHC	33
2.4.3 Auswertung der IHC	36
2.5 Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH)	39
2.6 Ethikvotum und Statistik	40

3	Ergebnisse	41
3.1	Größe der Studiengruppe	41
3.2	Immunhistochemische Überprüfung der MOC und MBOT auf den Tissue Microarrays (TMAs)	43
3.3	Verteilung der klinisch pathologischen Parameter	46
3.3.1	Zusammenhang klinisch-pathologischer Parameter mit dem Gesamtüberleben	48
3.4	L1-CAM Cut-Off	49
3.5	L1-CAM Expression in MOC und deren Zusammenhang mit anderen klinisch-pathologischen Parametern	50
3.6	Zusammenhang von L1-CAM mit dem Rezidivstatus	52
3.6.1	L1-CAM bei FIGO I Tumoren	56
3.7	L1-CAM als Progressionsindikator bei MBOT (zusammen mit p53 und HER2)	58
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	61
4	Diskussion	62
4.1	Relevanz der Klassifizierung	62
4.2	Relevanz von L1-CAM bei MOC	64
4.3	L1-CAM in Zusammenhang mit Tumorprogression	66
4.4	Limitationen dieser Arbeit	68
4.5	Aussichten	70
4.6	Schlussfolgerung	71
5	Zusammenfassung	72
6	Literaturverzeichnis	74
7	Erklärung zum Eigenanteil	82
8	Veröffentlichungen	84
9	Danksagung	85

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikroskopie eines MBOT, HE Färbung, Vergrößerung 10x, Fall W610.....	13
Abbildung 2: Expansiv-wachsendes MOC, HE Färbung, Vergrößerung 10x, Fall W815.....	14
Abbildung 3: Infiltrativ wachsendes MOC, HE Färbung, Vergrößerung 10x, Fall W430.....	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Pathogenese des MOC über ein Teratom.....	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Pathogenese des MOC in einem Brennertumor .....	17
Abbildung 6: Immunhistochemischer Algorithmus mit vier Markern nach Köbel et al.(45) (Adaptiert aus S3-Leitlinien (9)).....	20
Abbildung 7: Zusammenstellung der beschriebenen L1-CAM Signalwege: (Abbildung durch Autorin auf BioRender.com erstellt).....	24
Abbildung 8: Regulation von L1-CAM, entnommen aus Altevogt et al., 2016, L1-CAM in human cancer <sup>58</sup> .....	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung des OptiView Detektionskits (Abbildung durch Autorin auf BioRender.com erstellt).....	33
Abbildung 10: L1-CAM Score, adaptiert aus Wiedenhoefler et al. <sup>75</sup> .....	38
Abbildung 11: A) Immunhistochemische Auswertung der Marker L1-CAM, p53, HER2, CK7, CK20, CDX2 und p16 für MOC; B) Ergebnisse des muzinösen Pfads des Algorithmus von Köbel et al. bei den untersuchten MOC, adaptiert aus Wiedenhoefler et al. <sup>75</sup> .....	44
Abbildung 12: Immunhistochemische Auswertung der 16 reinen MBOT und der 20 MBOT-Anteile, welche benachbart zu MOC lokalisiert waren, für L1-CAM, p53, HER2, CK7, CK20, CDX2, p16.....	45
Abbildung 13: Überlebensanalyse abhängig vom FIGO Stadium.....	48
Abbildung 14: L1-CAM in den beiden verschiedenen Wuchsmustern, adaptiert aus Wiedenhoefler et al. <sup>75</sup> .....	51
Abbildung 15: ERBB2 Amplifikation in MOC durch FISH. (A) Tumorzellen ohne Amplifikation, (B) mit Amplifikation von einem Verhältnis >2,0 zur grünen Referenzsonde .....	51
Abbildung 16: a) TTP, b) Progressionsfreies Überleben, jeweils in Abhängigkeit von L1-CAM, übernommen aus Wiedenhoefler et al. <sup>75</sup> .....	55

Abbildung 17: TTP in Abhängigkeit von L1-CAM für FIGO IA-C, übernommen aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup> .....	57
Abbildung 18: Reiner MBOT, MBOT mit benachbartem Karzinom, MOC (Übernommen aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup> ) .....	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung von EOC (adaptiert aus S3 Leitlinien <sup>9</sup> ).....	10
Tabelle 2: Immunhistochemische Marker zur Differentialdiagnose einer muzinösen Neoplasie im Ovar (adaptiert aus S3 Leitlinien Version 4.01 – November 2019, S. 53 <sup>9</sup> ) .....	19
Tabelle 3: Informationen zu den verwendeten Antikörpern, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup> .....	35
Tabelle 4: Auswertungsscores der IHC .....	37
Tabelle 5: Ausschlussgründe aus dem MOC Kollektivs .....	42
Tabelle 6. Klinisch pathologische Daten und verschiedenen Cut-Offs, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup> .....	47
Tabelle 7: Klinisch-pathologische Daten im Zusammenhang mit dem Rezidivstatus, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup> .....	53
Tabelle 8: Daten der rezidierten MOC, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup> ..	54
Tabelle 9: Subgruppenanalyse FIGOIA-C, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup>	56
Tabelle 10: Tumormarker bei MBOT, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup> .....	59

## Abkürzungsverzeichnis

ASCO.....	American Society of Clinical Oncology
CAR-T-Zellen .....	Chimeric Antigen Receptor T-Zellen
<i>CDKN2A</i> .....	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A Gen
CK20 .....	Cytokeratin 20
CK7 .....	Cytokeratin 7
DAB.....	Diaminobenzidin
EMT .....	Epithelial to Mesenchymal Transition
EOC .....	Epitheliales Ovarialkarzinom von engl. Epithelial Ovarian Carcinoma
ER .....	Östrogen Rezeptoren
<i>ERBB2</i> .....	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; auch HER2
ERK.....	Extracellular Regulated Kinases
FISH.....	Fluorescence In Situ Hybridization
GI-Trakt.....	Gastrointestinaltrakt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Wasserstoffperoxid
HE .....	Hämatoxylin-Eosin
HER2 .....	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HGSC.....	High Grade Seröses Karzinom

HPV.....	Humane Papillomaviren
HQ.....	Hydroxy-Qino-Xaline
HRP .....	Horseradish-Peroxidase
ICCR .....	International Collaboration of Cancer Reporting
IHC.....	Immunhistochemie
IL1 $\beta$ .....	Interleukin 1 beta
ISG15.....	Interferon Stimulated Gene 15
L1-CAM.....	L1 Cell Adhesion Molecule
LAMN .....	Low Grade muzinöse Neoplasien der Appendix von engl. Low Grade Appendiceal Mucinous Neoplasm
MBOT.....	Muzinöser Borderlinetumor
MOC.....	Muzinöses Ovarialkarzinom von engl. Mucinous Ovarian Carcinoma
nf $\kappa$ B.....	nuclear factor kappa B
<i>PIK3CA</i> ..	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha Gen
PR.....	Progesteron Rezeptor
pRb .....	Retinoblastom-Protein
<i>RNF43</i> .....	Ring Finger Protein 43 Gen
STIC.....	Seröses Tubares Intraepitheliales Karzinom
TMA .....	Tissue-Micro-Array
WT1 .....	Wilms Tumorsuppressorgen



# 1 Einleitung

## 1.1 Ovarialkarzinome

### 1.1.1 Epidemiologie

Ovarialkarzinome sind die gynäkologischen Tumore mit der schlechtesten Prognose und der höchsten Letalität. 2016 erkrankten in Deutschland 7350 Frauen an einem Ovarialkarzinom und 5468 starben 2016 daran. Das 5-Jahresüberleben lag laut Robert-Koch-Institut im Durchschnitt bei 43% mit erheblichen Unterschieden zwischen den Krankheitsstadien <sup>1</sup>.

Epitheliale Ovarialkarzinome (EOC) stellen ca. 90% aller malignen Ovarialtumore dar. Keimstrangstromatumore und Keimzelltumore machen die restlichen 10% aus <sup>2</sup>. Die EOC umfassen eine sehr heterogene Gruppe aus verschiedenen histologischen Subtypen.

### 1.1.2 Einteilung der epithelialen Ovarialkarzinome (EOC)

Anhand ihrer Pathogenese lassen sich EOC in zwei verschiedene Gruppen einteilen <sup>3</sup>:

Typ I Tumore machen etwa 25% aller EOC aus. In diese Gruppe zählen klarzellige Karzinome, endometrioiden Karzinome, low grade seröse Karzinome, muzinöse Ovarialkarzinome (MOC) und maligne Brennertumoren. Typ I Tumore zeichnen sich durch ein schrittweises Entstehen aus benignen Vorstufen aus. Sofern diese Tumoren auf das Organ begrenzt sind, zeigen sie eine verhältnismäßig gute Prognose, wohingegen das Gesamtüberleben in fortgeschrittenen Stadien nach wie vor schlecht ist <sup>4</sup>.

Typ II Tumore machen etwa 75% aller EOC aus und sind verantwortlich für 90% aller Todesfälle der EOC. Zu den Typ II Tumoren zählen vornehmlich high grade seröse Ovarialkarzinome. Auch undifferenzierte Karzinome und Karzinosarkome fallen in diese Gruppe. Typ II Tumore werden meistens im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und sind hochaggressiv. Die derzeit favorisierte Entstehungstheorie zu high grade serösen Karzinomen (HGSC) postuliert Vorstufen im Fimbrientrichter-tragenden Teil der Tube durch Mutation im *TP53* Gen. In der Folge entsteht dort das sogenannte seröse tubale

intraepitheliale Karzinom (STIC) und bei Fortschreiten das HGSC. Aufgrund nach wie vor fehlender Symptome und Screening-Modalitäten, bleiben diese Tumore lange Zeit unentdeckt und werden im peritoneal metastasierten Stadium auffällig <sup>3,5,6</sup>.

Neben den unterschiedlichen Pathogenesen und der Histologie unterscheiden sich die Histotypen ebenfalls in ihrer Prognose, ihren genetischen Risikofaktoren, ihrem Mutationsspektrum und letztlich in ihrem Therapieansprechen <sup>2,7,8</sup>.

### **1.1.3 Therapie der epithelialen Ovarialkarzinome**

Bis heute besteht die Therapie von EOC unabhängig vom Histotyp aus einer Primär-Operation mit ausgiebigem Staging des Bauchraumes und optimalem Debulking sowie einer anschließenden Chemotherapie <sup>9</sup>. Allgemein sind bei allen Subgruppen das Tumorstadium und der postoperative Tumorrest wesentliche prognostische Faktoren <sup>10,11</sup>. Die FIGO-Stadieneinteilung aus den S3-Leitlinien ist in Tabelle 1 abgebildet <sup>9</sup>.

Die Chemotherapie bei frühen Ovarialkarzinomen unabhängig vom Histotyp (FIGO IA-C) besteht aus Carboplatin, während sie bei fortgeschrittenen Karzinomen zusätzlich Paclitaxel und gegebenenfalls Bevacizumab, einen Angiogenesehemmer, enthält. Die Ausnahme bilden frühe Karzinome mit FIGO IA Klassifikation und G1 Grading, die keine Chemotherapie erhalten, sofern das komplette operative Staging abgeschlossen ist. Patientinnen mit Karzinomen mit FIGO IA G2 sowie mit FIGO IB G1/2, kann eine platinhaltige Chemotherapie angeboten werden, wie gemeinsame Analysen der ICON1- und ACTION-Studie gezeigt haben <sup>9,12</sup>. Bei fortgeschrittenen Karzinomen zeigt sich im Hinblick auf ihr Therapieansprechen ein erheblicher Unterschied zwischen den verschiedenen Histotypen. Insbesondere die Gruppe der MOC, die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen soll, ist im fortgeschrittenen Stadium oft Chemotherapie-resistent <sup>13</sup>.

Tabelle 1: Stadieneinteilung von EOC (adaptiert aus S3 Leitlinien<sup>9)</sup>)

Tabelle 1. Stadieneinteilung von epithelialen Ovarialkarzinomen				
TNM		FIGO		Anatomische Definition
T1	T1a	IA		Auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt
	T1b	IB		Auf beide Ovarien begrenzt, Kapsel intakt
	T1c	IC		Auf ein oder beide Ovarien begrenzt mit Kapselruptur oder malignen Zellen in Aszites oder Spülzytologie
T2	T2a	IIA		Ausbreitung auf Uterus/Tuben/Ovarien
	T2b	IIB		Ausbreitung auf intraperitoneale Strukturen des kleinen Beckens (extragenitale Organe)
T3	T3a	IIIA	IIIA1	Mikroskopische Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens
			IIIA2	Ausschließlich retroperitoneale Lymphknotenmetastasen (N1) Peritoneum mit oder ohne N1
	T3b	IIIB		Makroskopische Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens ≤2cm mit oder ohne N1
T3c	IIIC		Makroskopische Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens ≥ 2cm einschließlich Leber- und Milzkapsel mit oder ohne N1	
M1	M1a	IVA		Fernmetastasen: Pleuraerguss mit positiver Zytologie
	M1b	IVB		Extraabdominelle Fernmetastasen einschließlich extraabdominelle Lymphknotenmetastasen, sowie parenchymale Metastasen der Leber/Milz

## **1.2 Muzinöse Ovarialneoplasien**

### **1.2.1 Epidemiologie**

Die muzinösen Ovarialneoplasien umfassen muzinöse Kystadenome, atypisch proliferierende muzinöse Tumore, auch muzinöse Borderlinetumore (MBOT) genannt, sowie muzinöse Ovarialkarzinome (MOC) <sup>14</sup>. Als Risikofaktor wird bei MOC in Gegensatz zu anderen Histotypen nur Tabakkonsum erwähnt <sup>8</sup>. Nachdem bis in die 90er Jahre angenommen worden ist, dass der Anteil der MOC von allen epithelialen Ovarialkarzinomen bei durchschnittlich 12% liege, wurde dieser Anteil mittlerweile auf 2-3% reduziert. Das lag sowohl an neuen Kriterien, die präziser zwischen MBOT und MOC unterschieden, als auch an klinischen und pathologischen Fortschritten, die eine Differenzierung zwischen primären MOC und Metastasen ermöglichten <sup>15-17</sup>. Eine morphologische Unterscheidung kann weiterhin in vielen Fällen eine Herausforderung darstellen. Extraovarielle Primärtumoren sind hier meist Tumore des Gastrointestinaltraktes, des Pankreas, der Zervix, des Endometriums oder der Brust <sup>18</sup>. Man geht davon aus, dass etwa 4% aller Frauen mit einem gastrointestinalen Tumor im Laufe ihrer Erkrankung Metastasen am Ovar haben <sup>19-21</sup>.

### **1.2.2 Makroskopie von sekundären muzinöser Ovarialtumoren, MBOT und MOC**

#### **1.2.2.1 Sekundäre muzinöse Ovarialtumore**

Zur intraoperativen Einschätzung werden bilaterale Tumore sowie unilaterale Tumore <10cm zunächst als Metastase gewertet und nur unilaterale Tumore >10cm gelten als primär muzinöser Tumor. Nach diesem Algorithmus lassen sich intraoperativ bereits 90% der Tumore richtig klassifizieren <sup>15</sup>. Im Gegensatz dazu sind Metastasen eher kleinere, oft bilaterale Tumore, die, sofern makroskopisch nicht schon sichtbar, meist auf mikroskopischer Ebene Knötchenbildung auf der Oberfläche aufweisen <sup>22</sup>. Insbesondere ein makroskopisch schleimiges multinoduläres Aussehen scheint spezifisch für Low Grade Schleimhautneoplasien der Appendix vermiformis (LAMN) zu sein <sup>23</sup>. Mittlerweile steht ebenfalls fest, dass Ovarialtumoren mit dem klinischen

Symptom des Pseudomyxoma peritonei, einer massiven Schleimbildung im Bauchraum, fast immer sekundäre Tumore sind <sup>24</sup>.

### **1.2.2.2 MBOT und MOC**

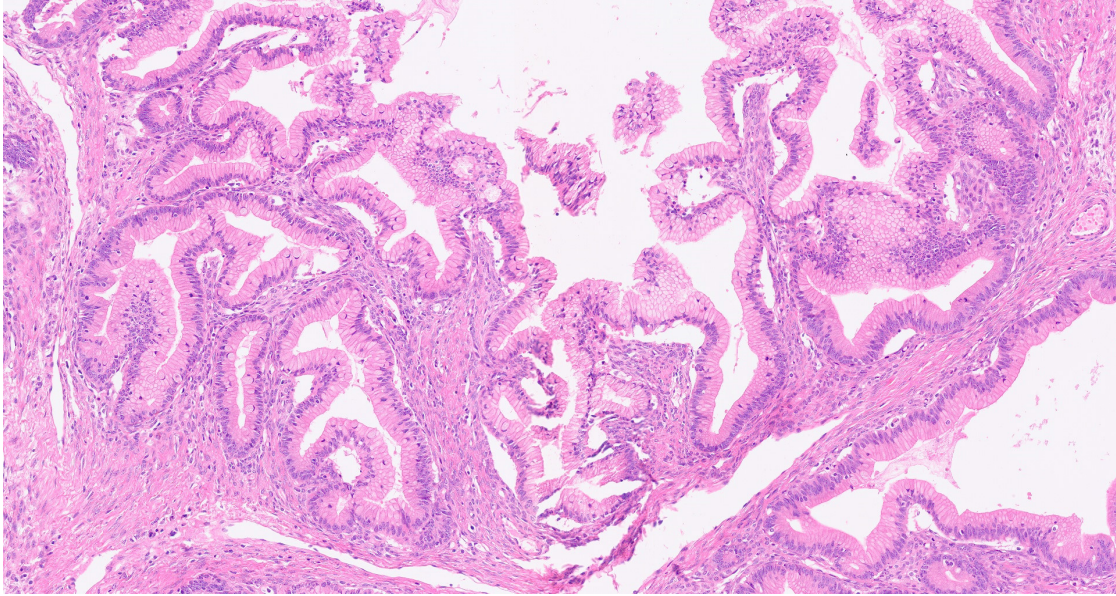
Makroskopisch sind MBOT und MOC multizystische und meist einseitige Tumore mit einer Durchschnittsgröße von 18-22cm. Auch nekrotische Anteile können makroskopisch zu finden sein <sup>14</sup>. Solide und zystische Anteile sind gleichmäßig im Tumor verteilt. Die Oberfläche der Tumore ist im Gegensatz zu vielen sekundären Ovarialtumoren meist glatt und ohne Knötchenbildung <sup>22</sup>.

### **1.2.3 Mikroskopie von MBOT, MOC und sekundären muzinösen Ovarialtumoren**

Allgemein zeigen muzinöse Neoplasien mikroskopisch ein schleimproduzierendes Epithel eines intestinalen oder gastralen Phänotyps mit Becherzellen <sup>9</sup>.

#### **1.2.3.1 MBOT**

Sowohl muzinöse Kystadenome als auch MBOT sind keine invasiven Tumore. Anhand der Komplexität ihres Wachsmusters lassen sie sich mikroskopisch voneinander differenzieren. Ein MBOT liegt vor, wenn mehr als 10% der Zellen des Tumors eine Atypie zeigen, aber kein invasives Wachstum des Tumors vorliegt. Mikroskopische Zeichen der Atypie eines MBOT sind stratifiziertes und proliferierendes muzinös-intestinales Epithel an den Zystenwänden, Epithelknospungen, sowie intraglanduläre villöse und papilläre Epithelformationen. Trotz teilweiser starker intraglandulärer Verzweigungen sind einzelne Drüsen voneinander abgrenzbar. Die Kernatypie ist mild bis moderat mit vereinzelt Mitosen in den Krypten. Bei hoher Kernatypie, aber fehlendem invasivem Wachstum handelt es sich um einen MBOT mit intraepitheliale Karzinom. Liegt ein invasiver Herd mit einer maximalen Größe von 5mm vor, so wird von einer Mikroinvasion gesprochen <sup>14</sup>.



*Abbildung 1: Mikroskopie eines MBOT, HE Färbung, Vergrößerung 10x, Fall W610*

### 1.2.3.2 MOC

Muzinöse Kystadenome und MBOT gelten als Vorstufen eines MOC, welches sich langsam schrittweise entwickelt <sup>25</sup>. Bei dem invasiven Verhalten lassen sich zwei Wachsmuster voneinander unterscheiden, das infiltrative, stromainvasive sowie das expansive Wachsmuster. Dabei ist das infiltrative Wachsmuster mit einer schlechteren Prognose assoziiert als das Expansive <sup>26</sup>. Letzteres ist charakterisiert durch massive, labyrinthartige, konfluierende oder kribriforme Drüsenproliferate, die sehr dicht aneinander liegen und nicht mehr voneinander abgrenzbar sind. Trotz fehlender Infiltration des Stromas und damit ausbleibender desmoplastischer Stromareaktion spricht man auch hier von Invasion. Oft finden sich benachbart Borderline-Komponenten des Tumors, die dann in das Karzinom übergehen <sup>14</sup>.

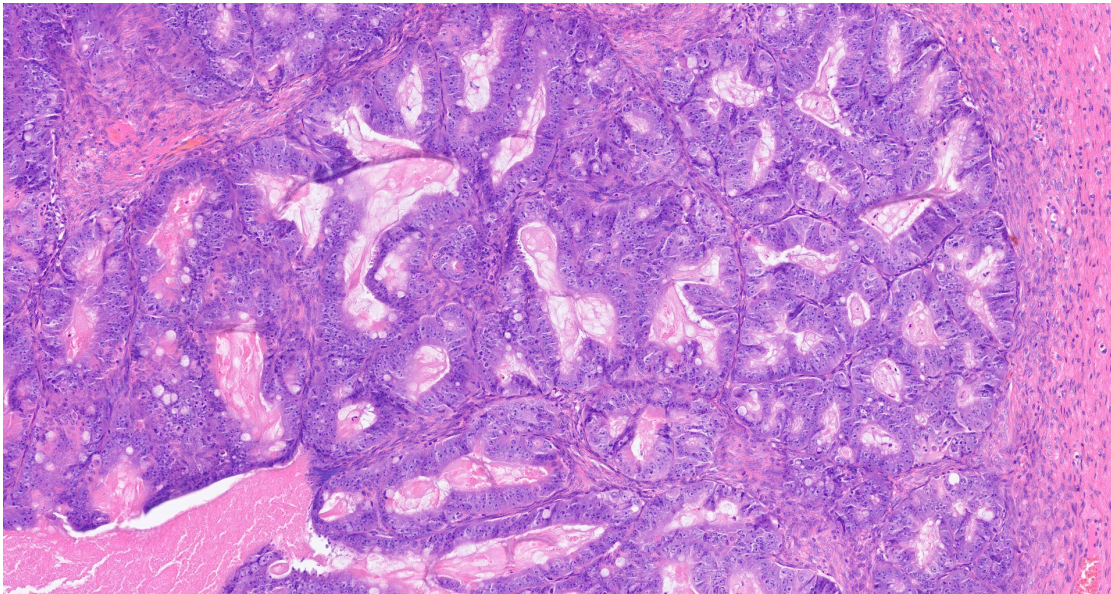


Abbildung 2: Expansiv-wachsendes MOC, HE Färbung, Vergrößerung 10x, Fall W815

Ein infiltratives Wachsmuster liegt vor, wenn maligne muzinöse Epithelzellen im Stroma in Form von einzelnen Zellen, Zellnestern oder fingerartigen Papillen, die sich in das Stroma bohren, zu finden sind <sup>27</sup>. Oft zieht sich das Stroma von

der Papille beim Färben zurück, wodurch zwischen dem Papillenepithel und dem Stroma eine charakteristische Leere entsteht. Mit dem infiltrativem Wuchsmuster verbunden ist eine desmoplastische Stromareaktion des Gewebes<sup>27</sup>.

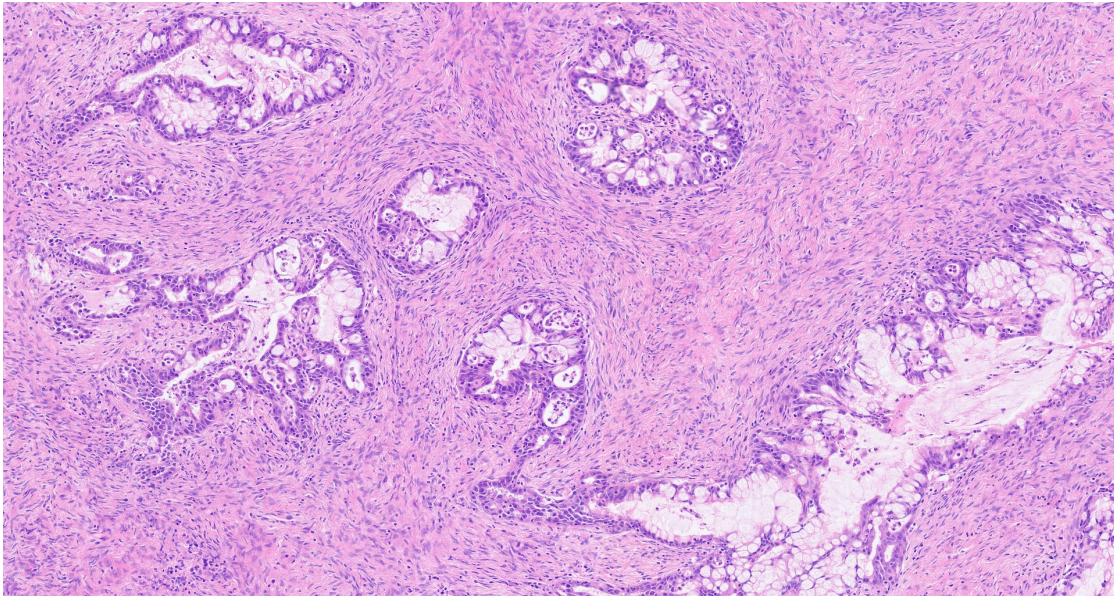


Abbildung 3: Infiltrativ wachsendes MOC, HE Färbung, Vergrößerung 10x, Fall W430

### 1.2.3.3 Sekundäre muzinöse Ovarialtumoren

Im Allgemeinen findet sich das infiltrative Wuchsmuster auch häufiger bei sekundären Ovarialtumoren. Außerdem sind Siegelzellen, Invasion einzelner Tumorzellen, Gefäßinvasion, mikroskopische Knötchenbildung und Schleim auf der Oberfläche des Tumors ebenfalls mikroskopische Zeichen, die auf einen Sekundärtumor hinweisen<sup>22</sup>.

### 1.2.4 Grading

Das Grading der MOC erfolgt hauptsächlich anhand der Kernatypie<sup>14</sup>. Es gibt jedoch derzeit kein etabliertes Gradingssystem für MOC. Nach S3-Leitlinien und Empfehlungen der ICCR (International Collaboration of Cancer Reporting) sollen MOC in Anlehnung an das Endometriumkarzinom eingeteilt werden. Allerdings wird kritisiert, dass bei diesem Grading nicht der Typ des



Wuchsmusters berücksichtigt wird, welcher in vielen Studien einen prognostischen Einfluss zeigte<sup>9,28-30</sup>.

### 1.2.5 Pathogenese und Molekularbiologie

Im menschlichen Körper gibt es drei verschiedene muzinöse Epithelien: im Magen, im Darm und in der Endozervix. Jedoch kommt davon keines physiologisch im Ovar vor<sup>31</sup>. Bezüglich des Ursprungs und der Pathogenese des MOC werden verschiedene Theorien diskutiert:

Zum einen wird die Entstehung aus Stammzellen eines Teratoms für möglich gehalten, insbesondere wenn Patientinnen gleichzeitig ein Teratom aufweisen (Abbildung 4). In diesen Fällen wurde eine komplette oder kaum abweichende Homozygotie zwischen MOC und assoziiertem Teratom nachgewiesen. Jedoch werden Teratome neben MOC nur selten gefunden, sodass es weitere Entstehungswege geben muss<sup>32</sup>.

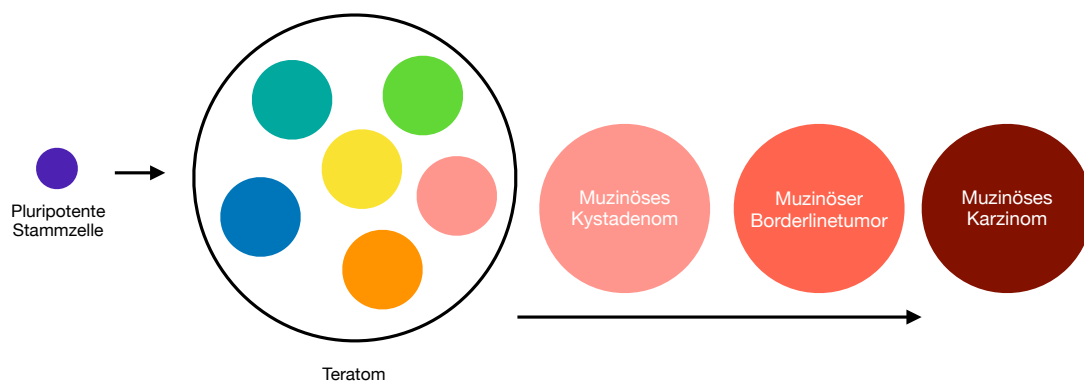


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Pathogenese des MOC über ein Teratom

Möglicherweise liegt ein anderer Ursprung der Pathogenese in einem transitionalzelligen Tumor (Brenner Tumor). Durch starke Proliferation muzinösen Epithels innerhalb eines Brennertumors kann sich dort ein muzinöses Kystadenom entwickeln, welches in der Folge den Brennertumor verdrängt (Abbildung 5). Dadurch lässt sich der primäre Brennertumor oft nicht mehr in einem MOC nachweisen<sup>3,33-35</sup>. Brennertumore wiederum entstehen

aus transitionalzelligen Zellnestern (Walthard Zellnester), welche am Übergang zwischen Tubenepithel und dem Mesothel des Ovars lokalisiert sind <sup>33</sup>. Wang et al. <sup>34</sup> unterstützen diese Theorie, indem sie in acht von zehn MOC mit assoziiertem Brenkertumor eine Klonalität beider Komponenten zeigen konnten.

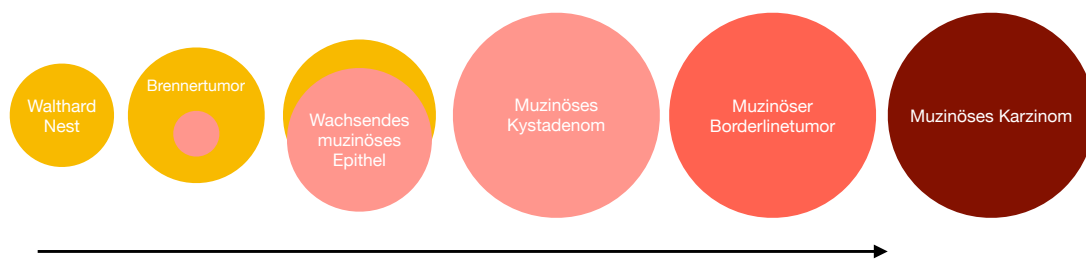


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Pathogenese des MOC in einem Brenkertumor

Allgemein geht man bei der Pathogenese der MOC von einer schrittweisen Progression aus. Dabei geht ein Karzinom aus einem Borderline Tumor hervor, welcher wiederum aus einem Adenom entsteht <sup>25</sup>. Die Untersuchung der genetischen Signatur stützt diese Theorie. Die häufigsten genetischen Veränderungen in einem MOC sind Mutationen oder copy number loss von *CDKN2A*, Mutationen von *KRAS*, *TP53* und *ERBB2*. Außerdem werden Mutationen in *RNF43*, *BRAF* und *PIK3CA* beobachtet. Dabei findet man bereits im MBOT Mutationen für *KRAS*, *BRAF* oder *CDKN2A* <sup>25</sup>. Cheasley et al. <sup>25</sup> finden deutlich mehr *TP53* Mutationen in MOC im Vergleich zu MBOT. Auch HER2 Überexpressionen werden häufiger in MOC als in MBOT beobachtet <sup>36</sup>. Gegenüber MBOT haben MOC deutlich mehr copy number alterations, was bei steigender Alterationsanzahl mit einer schlechteren Krankheitsprognose assoziiert ist. Spezielle Alterationen, die mit einem Übergang von einem MBOT in ein MOC assoziiert sind, liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 und 17 <sup>25</sup>.

Trotz des sehr heterogenen Mutationsspektrums der MOC, unterscheidet sich dieses Spektrum signifikant von dem anderer Karzinome, die morphologisch oft schwer von MOC zu differenzieren sind. Beispiele dafür sind das kolorektale Karzinom, das high grade seröse Ovarialkarzinom, das endometrioides Ovarialkarzinom oder das Magenkarzinom. Nur zum muzinösen Pankreaskarzinom konnte bislang kein signifikanter genetischer Unterschied festgestellt werden. Eine mögliche gleiche Tumorentität gilt trotzdem als sehr unwahrscheinlich, da das 5-Jahres-Überleben eines Pankreaskarzinoms deutlich unter dem eines MOC liegt<sup>25,37</sup>.

### **1.2.6 Verwendung von immunhistochemischen Markern bei MBOT und MOC**

#### **1.2.6.1 Marker zum Ausschluss extraovarieller Primarien**

Zunächst muss bei der Diagnose eines MBOT oder eines MOC differentialdiagnostisch immer an einen extraovariellen Primarius gedacht werden. Insbesondere Tumore im oberen und im unteren Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt), einschließlich des Appendix vermiformis (insbesondere LAMN), sowie Tumore der Zervix und des Endometriums müssen abgeklärt werden. Immunhistochemische Färbungen für CDX2, CK7, CK20, SATB2 und p16 werden in den Leitlinien zur Diagnosestellung dazu empfohlen<sup>9,38</sup>. Das typische Expressionsmuster ist für die jeweiligen Tumore in Tabelle 2 dargestellt. Bei muzinösen Tumoren zeigt sich meist eine diffuse Expression von CK7. Die CK20 Expression ist hingegen nicht so diffus und teilweise eher fokal. Durch das Verhältnis von CK7/CK20 lassen sich dadurch MOC von den Tumoren des unteren GI-Traktes gut unterscheiden<sup>38,39</sup>. CDX2, ein intestinaler Marker<sup>40</sup>, wird in ca. 50% der MOC exprimiert, wobei sich eine starke Expression nur bei einem Viertel der Patientinnen zeigt<sup>22</sup>. Intestinale Tumore sind oft CDX2 positiv, während gynäkologische Tumore, wie auch die anderen Histotypen von EOC, CDX2 negativ sind<sup>41</sup>. Noch spezifischer als CDX2 gilt der Marker SATB2 für Tumore des unteren GI-Traktes. Während SATB2 nur bei 8% der MOC exprimiert wird, zeigen 75% der kolorektalen Tumore und 87% der Appendixumoren eine diffuse Positivität<sup>22</sup>. MOC, die mit einem Teratom

assoziiert sind, können jedoch auch eine sehr ähnliche Expression wie Tumore des unteren GI-Traktes aufweisen. Deswegen sind die einzelnen Marker immer in Zusammenschau und mit der jeweiligen Krankengeschichte zu bewerten <sup>42</sup>.

Die p16 Expression in MOC ist eher fokal bis heterogen. Bei diffuser (>75% der Zellen) und starker Expression von p16 sollte unbedingt der HPV-Status der Patientin erfasst werden, um ein metastasiertes Zervixkarzinom auszuschließen. Humane Papillomaviren (HPV) erhöhen die p16 Expression stark, indem sie pRb inaktivieren. Dadurch werden Transkriptionsfaktoren wie E2F ungebremst aktiviert, wodurch p16 hochreguliert wird <sup>9,43,44</sup>.

*Tabelle 2: Immunhistochemische Marker zur Differentialdiagnose einer muzinösen Neoplasie im Ovar (adaptiert aus S3 Leitlinien Version 4.01 – November 2019, S. 53 <sup>9</sup>)*

<b>Tabelle 2. Immunhistochemisches Panel zur Differentialdiagnose bei muzinösen Neoplasien</b>					
<b>Primärtumor</b>	<b>CK7</b>	<b>CK20</b>	<b>CDX2</b>	<b>p16</b>	<b>SATB2</b>
<b>Ovar</b>	+	(+)	+	+/-	-
<b>Zervix</b>	+	(+)	(+)	+	-
<b>Dickdarm</b>	(+)	+	+	-	+
<b>Oberer GI-Trakt</b>	+	+	+	-	(+)

### **1.2.6.2 Typische muzinöse Expressionsmuster**

Um die Reproduzierbarkeit der histologischen Diagnose generell bei EOC zu verbessern, entwickelten Köbel et al. <sup>45</sup> in einem großen Kollektiv (n=1762) einen immunhistochemischen Algorithmus. Bei Verwendung der vier immunhistochemischen Marker WT1, p53, Napsin-A und PR wurden 88% der EOC richtig in ihre Subgruppen klassifiziert. Da trotzdem eine Irrtumswahrscheinlichkeit von etwa 10% besteht, sollte dieser Algorithmus nicht allein für die Diagnosestellung verwendet werden, kann diese aber insbesondere in morphologisch unklaren Fällen unterstützen. Der Algorithmus ist in Abbildung 6 dargestellt <sup>45</sup>.

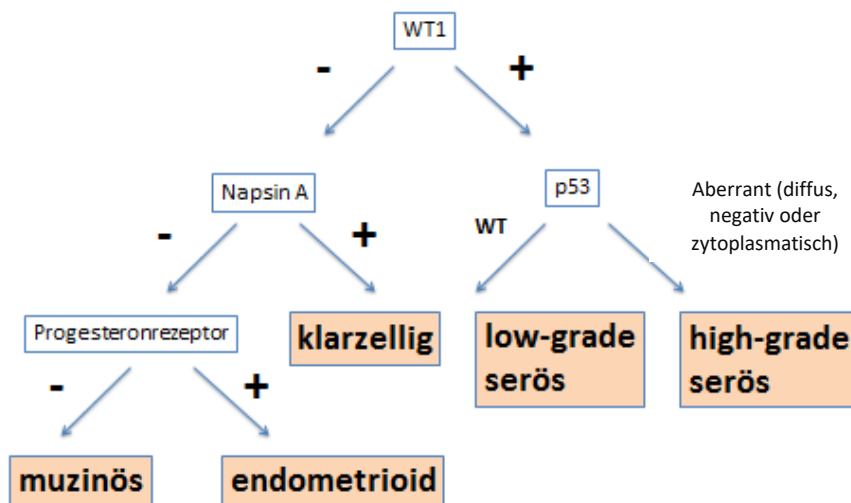


Abbildung 6: Immunhistochemischer Algorithmus mit vier Markern nach Köbel et al.(45) (Adaptiert aus S3-Leitlinien (9))

MOC sind typischerweise WT1 negativ <sup>45</sup>. WT1 ist ein sehr spezifischer und sensitiver Marker für seröse epitheliale Neoplasien <sup>46</sup>. Ebenso zeigen MOC keine Expression von Napsin-A, eine Aspartatprotease, die im Zusammenhang mit der immunhistochemischen Klassifizierung von EOC ein sehr sensibler und spezifischer Marker für klarzellige Ovarialkarzinome ist <sup>45,47</sup>. Ferner exprimieren sie keine typischen Marker des „Müllerschen“ Epithels, wie z.B. Östrogen- (ER) und Progesteron-Rezeptoren (PR). Damit lassen sie sich von endometrioiden Ovarialkarzinomen unterscheiden, die manchmal hinsichtlich der Architektur und der Zytologie den MOC sehr ähnlich sind und eine starke Hormonrezeptorpositivität aufweisen <sup>45,48</sup>. Hingegen sind 50% der Tumore positiv für PAX8, einen typischen Müllerschen Marker <sup>3,49</sup>. Diese Positivität erklärt man sich durch die Pathogenese über die Brennertumore, die wiederum aus transitionalzelligen Zellnestern (Walthardnester) entstehen. Da diese sich zwischen dem Mesothel des Ovars und dem PAX8 positiven Tubenepithel befinden, geht man in diesen Zellnestern teilweise von einer überlappenden PAX8 Expression aus <sup>3</sup>.

Ferner, werden in 50% der MOC p53 Aberrationen beobachtet <sup>45</sup>. Etwa 19% der MOC zeigen eine HER2 Überexpression <sup>50</sup>.

### **1.2.7 Therapie bei MOC und MBOT**

Je nach FIGO Stadium wird die Therapie wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben durchgeführt. Im Rahmen des operativen Stagings ist bei Schnellschnittdiagnose eines MOC zunächst keine Lymphadenektomie notwendig. Denn in vielen Studien zeigte sich, dass MOC insbesondere vom expansiv wachsendem Typ selten Lymphknotenmetastasen setzen <sup>9</sup>. Beim infiltrativ wachsenden MOC werden hingegen häufiger betroffene Lymphknoten gefunden, weswegen eine Lymphadenektomie bei diesem Wuchsmuster angemessen ist <sup>26,30</sup>.

Für Borderlinetumore wird aktuell nur eine chirurgische Resektion mit genauem Staging des Bauchraumes empfohlen. Ein Vorteil einer systemischen Therapie konnte bislang nicht festgestellt werden. Insbesondere bei MBOT muss ein extraovarieller Primarius ausgeschlossen werden. Dazu wird empfohlen, gegebenenfalls eine Appendektomie durchzuführen, da Metastasen eines Appendixkarzinoms oft im Ovar einem MBOT ähneln <sup>9</sup>.

## **1.3 L1-CAM – ein neuer Tumormarker für MOC?**

### **1.3.1 Allgemeine Funktion und Biochemie**

L1 Cell Adhesion Molecule (L1-CAM) ist ein neuronales Zelladhäsionsmolekül, welches an Zellmigration, Zelladhäsion, Faszikulation und Nervenwachstum beteiligt ist <sup>51,52</sup>. Das *L1-CAM* Gen ist auf Xq28 lokalisiert <sup>53</sup>. Das 200-220kD große Protein besteht aus einem extrazellulären Teil, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Schwanz, welcher mit Proteinen des Zytoskeletts interagieren kann. Der extrazelluläre Teil besteht aus sechs Immunglobulin – ähnlichen Domänen und fünf Fibronectin Typ III Wiederholungen <sup>54</sup>. Mit dem extrazellulären Teil kann L1-CAM mit verschiedenen Liganden interagieren <sup>54,55</sup>. Diese Interaktionen können entweder cis (mit einem Rezeptor der gleichen Zellmembran) oder trans (mit

einem Rezeptor auf einer anderen Zellmembran) stattfinden. Außerdem können heterogene Bindungen mit anderen Proteinen, z.B. Integrinen, oder homogene Bindungen mit anderen L1-CAM eingegangen werden. Dadurch werden unterschiedliche zelluläre Signalwege ausgelöst<sup>56</sup>. Der Abbau von L1-CAM erfolgt über ADAM10 (Disintegrin/Metalloprotease) (Abbildung 7a), wodurch die extrazelluläre Domäne von der Plasmamembran proteolytisch abgespalten wird. Sowohl die abgespaltene extrazelluläre Domäne als auch die von Presenilin/ $\gamma$ Sekretase weiter abgespaltene intrazelluläre Domäne dienen dann als Liganden für weitere extra- und intrazelluläre Prozesse: die lose extrazelluläre Domäne trägt zur Zellmigration bei (Abbildung 7b), während die intrazelluläre Domäne L1-CAM abhängige Gene sowie die Expression von L1-CAM reguliert (Abbildung 7c)<sup>56</sup>.

### **1.3.2 L1-CAM – ein Tumorantigen**

Es konnte nachgewiesen werden, dass einige solide Tumoren ebenfalls L1-CAM exprimieren. Dabei können L1-CAM positive Färbungen nicht nur bei Karzinomen, die aus dem Neuroektoderm entstehen (z.B. kleinzelliges Lungenkarzinom, Melanom, Phäochromozytom, Tumore des Nervensystems), vorkommen, sondern auch bei nicht neuroendokrinen Karzinomen, wie z.B. dem klarzelligem Blasenkarzinom<sup>57,58</sup>. Generell können bei fast allen Histotypen der EOC L1-CAM positive Tumore gefunden werden. Nur bei MOC ist die Studienlage nicht eindeutig<sup>57,59</sup>.

Auffällig ist, dass Karzinome, die L1-CAM exprimieren, meist mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. L1-CAM positive Karzinome scheinen apoptoseresistenter und chemoresistenter als L1-CAM negative Karzinome zu sein<sup>60,61</sup>. Ferner korrelieren sie mit einem invasiveren Verhalten, mehr Zellmotilität, einem stärkeren Tumorwachstum und vermehrten Metastasen, gegenüber L1-CAM negativen Karzinomen<sup>57,58,62,63</sup>. Dementsprechend ist bei kolorektalen Karzinomen die Expression von L1-CAM immunhistochemisch besonders an den invasiven Fronten der Karzinome zu finden<sup>62</sup>. In einer Studie mit serösen Ovarialkarzinomen scheint ebenfalls das Tumorstadium und das Grading mit der L1-CAM Expression zu korrelieren<sup>63</sup>.

### **1.3.3 Signalwege**

In diesem Kapitel soll ein Überblick über den aktuellen Wissensstand der L1-CAM Signalwege in Tumoren gegeben werden. Grundsätzlich gibt es zwei Arten, durch die die Signalkaskade von L1-CAM ausgelöst werden kann. Zum einen durch das bereits erwähnte Abspalten von L1-CAM von der Zellmembran: dabei gelangt die zytoplasmatische Domäne in den Zellkern, wo sie neben der Regulation der L1-CAM Expression auch Zielgene von L1-CAM reguliert (Abbildung 7c) <sup>56</sup>. Zum anderen können Signalwege durch das Binden von L1-CAM mit Integrinen ausgelöst werden (Abbildung 7d). Bei dieser Bindung sind unterschiedliche Signalwege bekannt. Eine Folge dieser Bindung ist der Anstieg von Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) (Abbildung 7e). IL $\beta$  führt durch para- oder autokrine Aktivierung von IL1 $\beta$ -Rezeptor letztendlich zu einem Anstieg von nf $\kappa$ B <sup>64,65</sup>. Ein weiterer Signalweg führt ebenfalls zu einem Anstieg von nf $\kappa$ B: Dabei liegen L1-CAM, I $\kappa$ B und Ezrin als Komplexe in der Zellmembran vor. Bei Bindung eines Integrins wird I $\kappa$ B phosphoryliert, wodurch nf $\kappa$ B frei wird (Abbildung 7f). Bei dieser Phosphorylierung ist die Bindung von Ezrin an L1-CAM zwingend notwendig <sup>66</sup>. Das durch beide Wege steigende freie nf $\kappa$ B kann dann seine Zielgene induzieren, die das Tumorverhalten beeinflussen (Abbildung 7g). Eines dieser Zielgene ist ISG15 (Interferon Stimulated Gene 15). Es wird davon ausgegangen, dass ISG15 eine wesentliche Rolle bei der Motilität, Proliferation und Metastasierung eines Tumors spielt <sup>67</sup>. Ferner kann durch die Bindung von L1-CAM mit Integrinen der ERK1/2 Signalweg aktiviert werden (Abbildung 7h). Der ERK1/2 Signalweg seinerseits trägt ebenfalls zu den oben genannten Beobachtungen bei <sup>68,69</sup>.



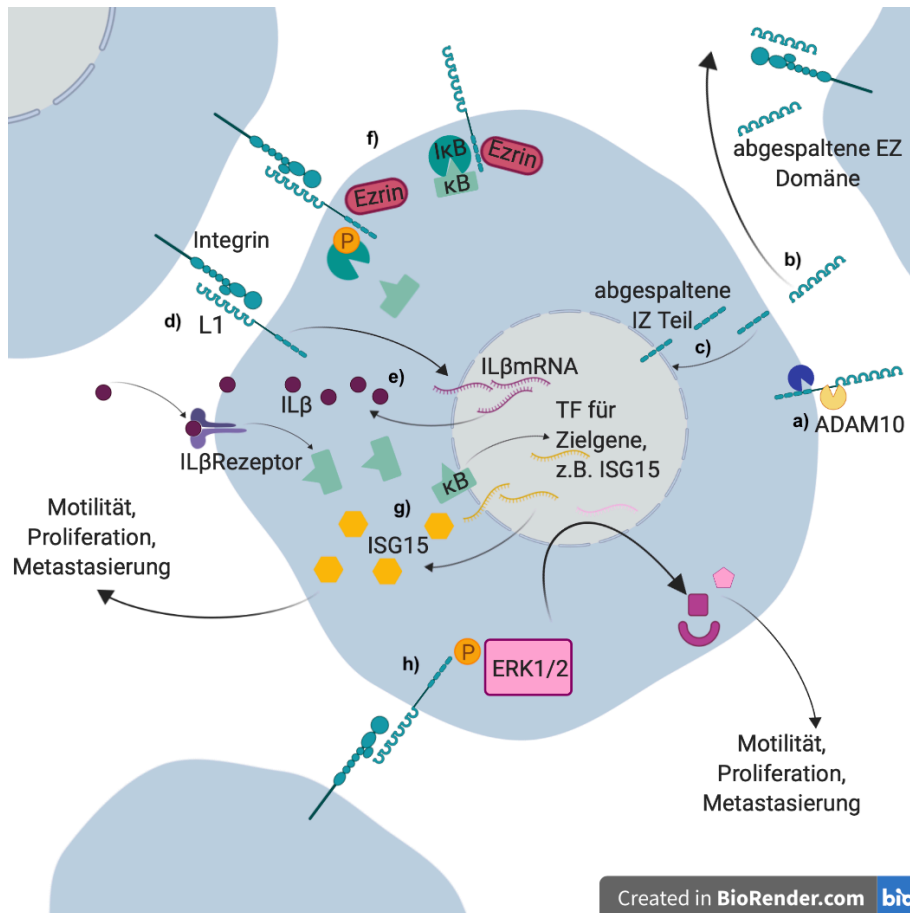


Abbildung 7: Zusammenstellung der beschriebenen L1-CAM Signalwege: (Abbildung durch Autorin auf BioRender.com erstellt)

a) Spaltung von L1-CAM durch die Metalloprotease ADAM10, b) abgespaltene Extrazellulärdomäne, die zur Zellmigration beiträgt, c) abgespaltener intrazellulärer Teil, der die Expression von L1-CAM reguliert und Zielgene induziert, d) Bindung von L1-CAM mit Integrinen, e) durch die Integrinbindung induzierte IL1 $\beta$  Expression und damit Induktion des IL1 $\beta$ -Rezeptors, welcher *nfκB* induziert, f) L1-CAM-Ezrin Signalweg, der ebenfalls zu steigendem freien *nfκB* führt, g) *nfκB* als Transkriptionsfaktor insbesondere für ISG15, welches zu Zellmotilität, Proliferation und Metastasierung führt, h) durch L1-CAM-Integrin-Bindung induzierter ERK1/2 Signalweg

### 1.3.4 L1-CAM und EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition)

Die L1-CAM Expression in Tumorzellen wird auch im Zusammenhang mit EMT diskutiert<sup>54,60</sup>. EMT ist ein Prozess, der für die Embryonalentwicklung von mehrzelligen Lebewesen unabdingbar ist. Durch diesen Mechanismus verlieren Epithelzellen ihre Polarität, können migrieren und sich dann an anderer Stelle entweder als mesenchymale Zellen niederlassen oder wieder in Epithelzellen (Mesenchymal to Epithelial Transition) umwandeln<sup>70</sup>. So können auch Karzinomzellen diesen Prozess durchlaufen und dadurch ihren epithelialen

Charakter verlieren<sup>70</sup>. Vor allem nimmt dabei die Expression von E-Cadherin (Zelladhäsionsmolekül/-marker) ab, und die Expression von Vimentin (ein mesenchymaler Marker) zu<sup>70</sup>. Bei L1-CAM positiven Karzinomzellen wurden solche Expressionsmuster ebenfalls gehäuft beobachtet<sup>54,60</sup>.

### **1.3.5 Regulation von L1-CAM**

Die L1-CAM Expression wird durch  $\beta$ Catenin<sup>62</sup>, den Transkriptionsfaktor SLUG<sup>71</sup>, sowie den abgespaltenen zytoplasmatischen Teil von L1-CAM<sup>56</sup> hochreguliert. In Zusammenhang mit einer verminderten L1-CAM Expression wurden hingegen verstärkt exprimiert folgende Transkriptionsfaktoren gefunden: Androgenrezeptoren in Brustkrebszellen<sup>72</sup>, NRSF/REST, ein neuronaler silencer, im kleinzelligen Lungenkarzinom<sup>58</sup> und PAX8 im Nierenzellkarzinom<sup>73</sup>. Außerdem wurden zahlreiche microRNAs entdeckt, die die Expression von L1-CAM ebenfalls vermindern<sup>58</sup>. Darüber hinaus korreliert der Methylierungsstatus des L1-CAM Promotors mit der Expression des Gens. Dabei wird durch Hypomethylierung des L1-CAM Promotors vermehrt L1-CAM exprimiert<sup>74</sup>.

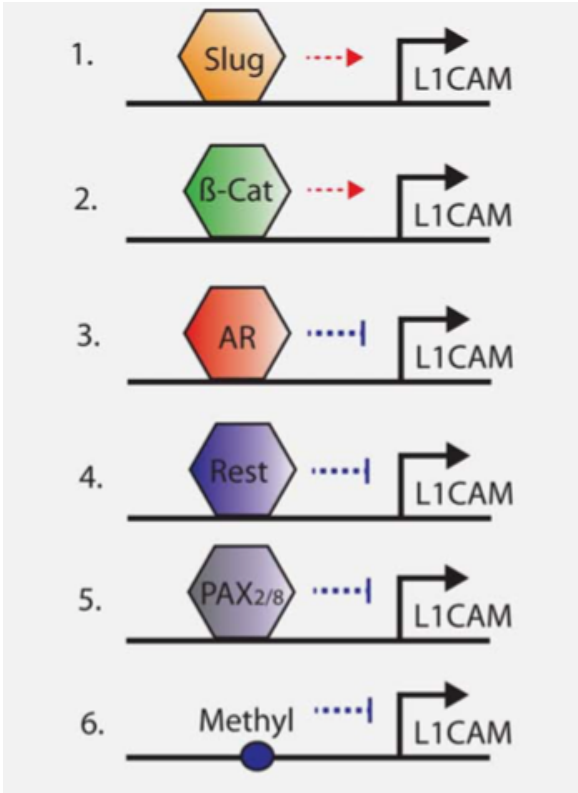


Abbildung 8: Regulation von L1-CAM, entnommen aus Altevogt et al., 2016, L1-CAM in human cancer <sup>58</sup>

#### **1.4 Ziele dieser Arbeit**

Die Prognose von MOC ist bisher maßgeblich vom Tumorstadium abhängig. In dieser Arbeit wollen wir der Frage nachgehen, ob es bei MOC zusätzlich immunhistochemische Tumormarker gibt, welche mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert sind.

Besonders wollen wir uns auf den Einsatz von L1-CAM konzentrieren, der bei Tumoren mit ähnlichen molekularen Signalwegen, wie z.B. beim kolorektalen Karzinom oder anderen epithelialen Tumoren des weiblichen Genitaltrakts bereits mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Qualitative Studien an von Experten überprüften und reklassifizierten MOC-Kollektiven mit ausreichenden klinischen Follow-up-Daten zur L1-CAM Expression fehlen bislang.

Deswegen soll in dieser Studie zunächst ein validiertes und immunhistochemisch reklassifiziertes Kollektiv aus MOC erstellt werden, welches im Anschluss hinsichtlich L1-CAM Expression analysiert werden soll. Darüber hinaus soll auch die Expression von bereits diskutierten Risikomarkern, wie p53 und HER2, im Zusammenhang mit L1-CAM untersucht werden.

Außerdem wollen wir herausfinden, ob sich ungünstige Tumormarker bereits in der Vorstufe des MOC, dem MBOT, finden lassen. Dazu sollen benachbarte Borderline-Komponenten der Karzinome mit einem validierten Kollektiv aus reinen MBOT verglichen werden, um mögliche Rollen von L1-CAM, p53 und HER2 in der Tumorprogression zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Die Kollektive

Aufgrund der Seltenheit und der damit verbundenen sehr geringen Anzahl von MOC wurde diese Studie mit Tumormaterial von Patientinnen aus zwei verschiedenen Krankenhäusern (Universitätsfrauenklinik Tübingen und Frauenklinik der Universität München) durchgeführt <sup>75</sup>.

Am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen wurde vorhandenes Material von 56 Patientinnen, die laut REDCap Datenbank der Universitätsfrauenklinik Tübingen zwischen 2000 und 2016 an einem MOC erkrankt waren, von einer spezialisierten Gynäkopathologin (Prof. Dr. med. Annette Staebler, im Folgenden A.S. genannt) und mir (Rebekka Wiedenhöfer, im Folgenden R.W. genannt) mit vorhandenen HE Schnitten hinsichtlich der histologischen Diagnose überprüft. Die REDCap Datenbank der Universitätsfrauenklinik Tübingen erfasst pseudonymisiert alle Patientinnen des Krebszentrums Tübingen mit vorhandenen Verlaufsdaten.

Um das Kollektiv zu erweitern, wurden 24 MOC der Universitätsklinik München, die zwischen 1985 und 2015 primär diagnostiziert wurden, in Tübingen durch A.S. und R.W. auf die Verwendbarkeit in dieser Studie geprüft. Im Vorfeld wurde das Kollektiv im Rahmen anderer Studien in München immunhistochemisch mit den Markern CK7, CK20, CDX2, PAX8, und SATB2 untersucht, um Sekundärmalignome auszuschließen <sup>76</sup>. Diese Daten wurden in Tübingen nicht nochmal verifiziert. Pro Fall aus München lagen uns jeweils 3 Leerschnitte vor, die wir immunhistochemisch mit p53, HER2 und L1-CAM färbten <sup>75</sup>.

Außerdem wurde ein Vergleichskollektiv aus 16 reinen MBOT erstellt. Diese Diagnose wurde bei den Patientinnen zwischen 2000 und 2016 an der Universitätsklinik Tübingen gestellt. Im Gegensatz zur Studiengruppe der MOC handelt es sich beim Kollektiv der reinen MBOT jedoch nicht um eine konsekutive Stichprobe <sup>75</sup>.

## **2.2 Tumormaterial und Review**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde vorhandenes Tumormaterial an 2,5µm bis maximal 5µm dicken Hämatoxylin-Eosin (HE) – Schnitten begutachtet und anschließend von einer Pathologin mit Zusatzausbildung in der Gynäkopathologie (A.S.) histomorphologisch überprüft. Dabei wurde zwischen muzinösem Borderlinetumor und muzinösem Karzinom unterschieden, wie in Kapitel 1.2.3 bereits beschrieben, und das Wachstumsmuster der Karzinome dokumentiert.

Bei allen Karzinomen wurde zusätzlich nach benachbarten MBOT-Anteilen gesucht, deren Expressionen im Verlauf mit den reinen MBOT verglichen wurden <sup>75</sup>.

### **2.3 Erstellung eines Tissue-Micro-Arrays (TMA)**

Das verwendete Tumormaterial des aus Tübingen stammenden Kollektivs wurde anhand eines TMAs weitergehend untersucht. Das Gewebe für die TMA-Erstellung stammte ausschließlich von Patientinnen, deren Tumorblöcke in der Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen archiviert wurden.

Für die Konstruktion eines TMAs wurden zunächst pro Fall möglichst die zwei Schnitte ausgewählt, auf denen das Tumor- oder Karzinomareal am besten erkennbar war. Anschließend wurde von den dazugehörigen Paraffinblöcken erneut ein 2,5µm dicker HE-Schnitt angefertigt, um zu überprüfen, ob das gewünschte Areal im aktuellen Anschnitt des Paraffinblockes weiter zu sehen war. Danach wurde das Areal auf dem zuletzt angefertigten HE-Schnitt markiert. Diese Schritte erfolgten alle mit Bestätigung der Pathologin A.S.

Anschließend wurde mit einem halbautomatisierten Gewebearray Instrument (Beecher Instruments Sun Prairie, WI, USA) ein TMA erstellt. Dabei wurde zunächst aus einem leeren Paraffinblock, dem Empfängerblock, eine 3mm lange Stanze mit einem Außendurchmesser von 0,6mm entnommen und verworfen. Dann wurde aus einem zuvor gewählten Tumorblock bei Zimmertemperatur eine 3mm lange Stanze mit einem Innendurchmesser von 0,6mm aus dem auf dem HE-Schnitt markierten Areal entnommen und in das Stanzloch im Empfängerblock gesetzt. Dieser Prozess wurde für alle Tumorproben durchgeführt. Nach dem Stanzen wurden die TMAs bei 56°C für 20 min erwärmt und anschließend für 30min bei 4°C gekühlt. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Gewebsstanzen sich fest mit dem Paraffinblock verbinden.

Aus den zwei ausgewählten Tumorblöcken eines Falles wurden jeweils drei Stanzen aus möglichst unterschiedlichen Bereichen des markierten Areals entnommen. Bei Fällen, bei denen nur ein Block für die TMA Erstellung infrage kam, wurde das markierte Areal sechs Mal gestanzt. Zusätzlich enthielt jeder TMA dieser Arbeit zwei 1mm breite und 3mm lange Stanzen von normalem Zervix Gewebe als Kontrollgewebe.

Für jeden TMA wurde standardmäßig ein Replika-TMA erstellt. Dafür wurden die oben genannten Schritte wiederholt. Dabei wurden die Gewebestanden möglichst aus einem Bereich nahe der Stanzlöcher des TMAs entnommen. Dadurch kann der Replika-TMA als ungefähre Kopie des TMAs angesehen werden und bei Verbrauch des originalen TMAs diesen bei weiteren Studien ersetzen.

Um die verschiedenen Stufen bei der Entstehung eines MOC immunhistochemisch zu beschreiben und zu vergleichen, wurden drei TMAs angefertigt. Der erste TMA (TMA1) enthielt Stenzen aller Tübinger MOC Patientinnen, im zweiten TMA (TMA2) wurden die an das Karzinomareal angrenzenden MBOT dieser Patientinnen zusammengestellt. Der dritte TMA (TMA3) beinhaltete alle reinen MBOT.



## 2.4 Immunhistochemie (IHC)

### 2.4.1 *Immunhistochemische Färbungen mit dem Detektionskit OptiView DAB*

Immunhistochemische Färbungen basieren auf Antigen-Antikörper Bindungen. Dabei können Proteine durch spezifische Antikörper gebunden und mittels Farbreaktion im Gewebe dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde mit dem OptiView IHC DAB Detektionskit (Ventana: 760-700) gearbeitet, welches von der Firma Ventana hergestellt wurde (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA).

Nach Vorbehandlung des Gewebes und Blockade der endogenen Peroxidase mit 3%-igem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), bindet zunächst ein spezifischer Primärantikörper an das darzustellende Antigen. Die jeweiligen Inkubationszeiten sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Bei den Primärantikörpern handelt es sich um spezifische Maus- oder Kaninchenantikörper der Klasse IgG oder IgM. Anschließend binden Sekundärantikörper (Ziege) an die Primärantikörper. Dabei wird ein Sekundärantikörper mit 12-15 Haptenen (Hydroxy-Qino-Xaline = HQ) konjugiert. HQ kommt im Menschen nicht vor, sodass eine spezifische Bindung eines Tertiärantikörpers gewährleistet ist. Dieser Tertiärantikörper (monoklonaler Maus-Antikörper) ist wiederum mit sieben Meerrettich-Peroxidase Enzymen (HRP von engl. Horseradish-Peroxidase) konjugiert und bindet spezifisch an ein Hapten des Sekundärantikörpers. Die Inkubationszeit von Sekundär- und Tertiärantikörper betrug in dieser Arbeit jeweils 8min. Durch Hinzufügen von  $H_2O_2$ , Kupfer und Diaminobenzidin (DAB), wird dann  $H_2O_2$  durch HRP zu  $H_2O$  reduziert und DAB oxidiert, welches sich dann als brauner Farbstoff niederschlägt. Diese Technologie führt zu einer erheblichen Verstärkung des Farbsignals durch die Multiplikation von Haptenen und HRPs.

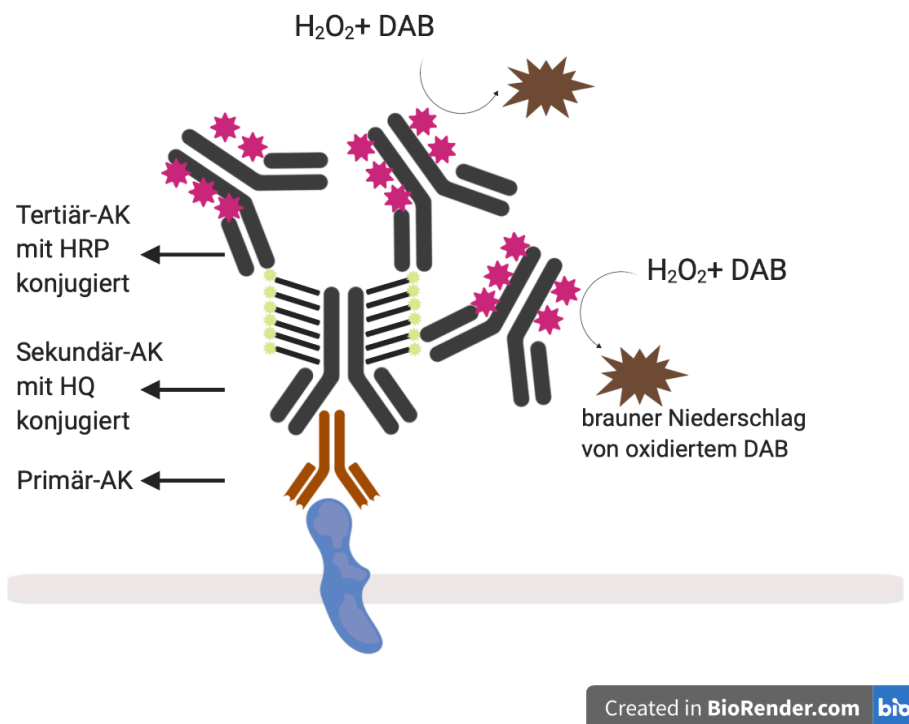


Abbildung 9: Schematische Darstellung des OptiView Detektionskits (Abbildung durch Autorin auf BioRender.com erstellt)

### 2.4.2 Ablauf der IHC

Zunächst wurden 2,5µm dicke Schnitte der TMA Blöcke oder der Tumorblöcke an einem Mikrotom (Firma: Microm HM 355S) angefertigt und auf TOMO Objektträger (Bestellnummer: TOM-1190) aufgezogen. Diese wurden über Nacht bei 37°C getrocknet und anschließend im Kühlschrank bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Zur immunhistochemischen Färbung wurde abhängig vom Färbeprotokoll das vollautomatische Immunfärbesystem Ventana Benchmark XT oder Ventana Benchmark Ultra verwendet (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Eine genauere Auflistung der verschiedenen Färbeprotokolle erfolgt in Tabelle 3, wobei alle Färbeprotokolle in der Pathologie der Universitätsklinik Tübingen nach Herstellerangaben validiert worden sind.

Nachdem die Gewebeschnitte für 4min bei 60°C gebacken worden sind, um die Haftung an den Objektträgern zu verbessern, wurden die Schnitte durch milde

Hitze und eine Detergenzlösung (EZ-Prep, Ventana: 950-102) mithilfe eines Wirbelmixers entparaffiniert. Danach folgte die Demaskierung der Antigene durch Erhitzen der Gewebe in einer Tris-basierter Pufferlösung, (CC1 Ventana: 950-124). Kovalente Bindungen, die durch die Formalinfixierung entstanden waren, wurden in diesem Schritt hydrolysiert, sodass die Proteine wieder renaturiert vorlagen und als Antigene von Antikörpern erkannt werden konnten. Ein anderes Verfahren (bei CK7 und CK20 verwendet) zur Demaskierung war die Spaltung von Proteinen durch Proteasen, um die darzustellenden Epitope freizulegen. Bei CK7 und CK20 wurde dafür Pronase verwendet, eine Protease mit hoher Aktivität (Protease 1, Ventana: 760-2018). Nach Inhibition der endogenen Peroxidase, erfolgte die Inkubation mit 100µL des Primärantikörpers, wobei je nach Antikörper unterschiedliche Konzentrationen des Antikörpers verwendet wurden (Tabelle 3). Als Verdünnungsreagenz wurde Antibody Diluent der Firma Zytomed-Systems (ZUC025-500) verwendet, welches den Antikörper gleichzeitig mikrobiologisch und chemisch stabilisiert und unspezifische Bindungen des Antikörpers minimiert. Die Inkubationszeiten sind in Tabelle 3 gelistet. Anschließend wurde das bereits beschriebene OptiView DAB Detektionskit (Ventana: 760-700) benutzt, um die Antigen-Antikörper-Komplexe farblich zu lokalisieren. Danach wurden die Schnitte mit Hämatoxylin (Ventana: 760-2021) und Blueing Reagent (Ventana: 760-2037) gegengefärbt. Im gesamten Prozess wurde als Waschpuffer und Inkubationslösung der Reaction Buffer (Ventana: 950-300) verwendet. Um eine Austrocknung der Schnitte während der IHC zu vermeiden und eine stabile wässrige Umgebung während der Reaktionen zu gewährleisten, trennte ein Ölfilm (Liquid Cover Slip Ventana: 650-010) das benötigte wässrige Milieu auf den Schnitten von der Luft.

Schließlich wurden die Schnitte zuerst mit Spülmittel und Leitungswasser und dann mit destilliertem Wasser gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (70% - 80% - 96% - 100% - Xylol) und mit Cytoseal (Cytoseal XYL, Fa Thermo Scientific #8312-4) und einem Deckglas eingedeckt.

Tabelle 3: Informationen zu den verwendeten Antikörpern, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup>

Tabelle 3. Informationen zu den verwendeten Antikörpern mit jeweiligen Färbeprotokollen								
Marker	Antikörper	Hersteller	Bestellnummer	Verwendete Verdünnung	Benchmark	Vorbehandlung	Inhibition der endogenen Peroxidase	Inkubationszeit des Primärantikörpers
<b>CK7</b>	Monoklonal Maus Anti-Human CK7, IgG, Klon: OV-TL 12/30	Dako, Dänemark	M7018	1:2000	Ultra	Pronase, 8min	Nein	32min
<b>CK20</b>	Monoklonal Maus Anti-Human CK20, IgG, Klon: Ks20.8	Dako, Dänemark	M7019	1:400	Ultra	Pronase, 8min	Nein	32min
<b>CDX2</b>	Monoklonal Kaninchen Anti-Human CDX2, IgG, Klon: EPR2764Y	Zytomed Systems, Deutschland	RBK019	1:100	Ultra	CC1, 64min	Ja	32min
<b>P16</b>	Monoklonal Maus Anti-P16 <sup>INK4A</sup>	Ventana Medical Systems, USA	825-4713	rtu	Ultra	CC1, 64min	Ja	32min
<b>WT1</b>	Monoklonal Maus Anti-WT1, Klon 6F-H2	Dako, Dänemark	M3561	1:250	XT	CC1, 64min	Ja	32min
<b>p53</b>	Monoklonal Maus Ani-p53, IgG, Klon: Do-7	Leica Biosystems, UK	NCL-p53-DO7	1:400	XT	CC1, 64min	Ja	32min
<b>Napsin-A</b>	Maus Monoklonal Anti-Napsin-A, IgG, Klon: KCG1.1	Diagnostic Biosystems, USA	Mob 463	1:200	XT	CC1, 64min	Ja	32min
<b>PR</b>	Monoklonal Kaninchen Anti-PR	Ventana Medical Systems, USA	790-2223	rtu	Ultra	CC1, 64min	Ja	32min
<b>ER</b>	Monoklonal Kaninchen Anti-ER	Ventana Medical Systems, USA	790-4324	rtu	Ultra	CC1, 64min	Ja	32min
<b>HER2</b>	Monoklonal Kaninchen Anti-Her2/neu Klon 4B5	Ventana Medical Systems, USA	790-2991	rtu	XT	CC1, 64min	Ja	32min
<b>L1-CAM</b>	Monoklonal Maus Anti-Human L1-CAM, IgG, Klon: 14.10	Biolegend, USA	Sig-3911	1:40	XT	CC1, 64min	Ja	20min

rtu = ready to use

### **2.4.3 Auswertung der IHC**

Die Auswertung der IHC erfolgte anhand semiquantitativer Scores. Die exakten Scores für jede Färbung sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Scores wurden pro Fall vergeben.

Insgesamt wurden alle Fälle auf einem TMA bewertet, bei denen mindestens eine Stanze auswertbar war. War dies nicht der Fall, so wurden anschließend Ganzschnittfärbungen des betroffenen Falls durchgeführt und diese bewertet. Die Färbungen der Fälle aus München (L1-CAM, HER2, p53) wurden ebenfalls am Ganzschnitt evaluiert.

Die L1-CAM Färbung wurde nach Screening der Tübinger Fälle am TMA bei den MOC ebenfalls final am Ganzschnitt ausgewertet. Wie in Abbildung 10 gezeigt, wurde bei der L1-CAM Färbung zwischen Negativität (Score 0), Einzelzellpositivität (Score 1), Zellclusterpositivität (Score 2) und Positivität von  $\geq 10\%$  der Zellen (Score 3) unterschieden. Bei p53 wurde zwischen aberrant (starke oder keine nukleäre Positivität) und Wildtyp unterschieden. Die HER2 Evaluation erfolgte nach den ASCO Guidelines (American Society of Clinical Oncology) <sup>77</sup>, wobei zwischen HER2 Negativität (Score 0 und Score 1+), unklarem Befund (Score 2+) und starker HER2 Positivität (Score 3+) unterschieden wurde. Bei unklarem und positivem immunhistochemischem HER2 Befund wurde eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung angeschlossen <sup>75</sup>.

Die Auswertung aller IHC wurde von zwei unabhängigen Gutachterinnen (R.W., A.S.) durchgeführt, wovon eine der beiden Gutachterinnen (A.S.) eine erfahrene Gynäkopathologin ist.

Tabelle 4: Auswertungsscores der IHC

Tabelle 4. Auswertungsscores der IHC		
Marker	Score	Färbung
<b>CK7, CK20, Napsin-A</b>	0 → negativ (0%) 1 → fokal (<10%) 2 → heterogen (10-80%) 3 → stark (>80%)	zytoplasmatisch
	} positiv	
<b>CDX2</b>	0 → negativ (0%) 1 → fokal (<10%) 2 → heterogen (10-80%) 3 → stark (>80%)	nukleär
	} positiv	
<b>P16</b>	0 → negativ (0%) 1 → fokal (<10%) 2 → heterogen (10-80%) 3 → stark (>80%)	nukleär/zytoplasmatisch
	} positiv	
<b>WT1</b>	0 → negativ 1 → >10% positiv	nukleär
<b>p53</b>	1 → fokal/heterogen → Wildtyp 0 → aberrant (negativ oder stark positiv)	nukleär/zytoplasmatisch
<b>PR</b>	0 → negativ (0%) 1 → fokal (<10%) 2 → heterogen (10-80%) 3 → stark (>80%)	nukleär
	} positiv	
<b>HER2</b>	0 → negativ (0%) 1+ → schwache, unvollständige Membranfärbung 2+ → schwache komplette Membranfärbung in >10% der Zellen 3+ → starke komplette Membranfärbung in >10% der Zellen	membranös
<b>L1-CAM</b>	0 → negativ (0%) 1 → Einzelzellen positiv (<10%) 2 → Zellcluster von mind. 5 Zellen positiv (<10%) 3 → positiv (≥10%)	membranös

# L1-CAM Score

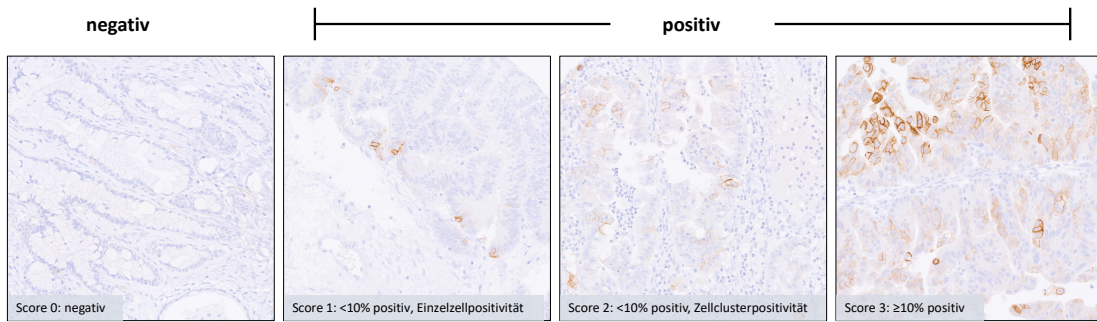


Abbildung 10: L1-CAM Score, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup>.

## 2.5 Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH)

Bei allen Tübinger MOC mit unklarem oder positiven immunhistochemischem HER2 Befund wurde eine FISH angeschlossen. Von den Münchener Fällen war dafür kein Material zur Verfügung.

Um den HER2/*ERBB2*-Amplifikationsstatus auf chromosomaler Ebene zu ermitteln, verwendeten wir wie von Pham et al.<sup>78</sup> bereits beschrieben, eine FISH-Analyse mit der ZytoLight CEN17/SPEC *ERBB2* Dual Color Sonde. Eine Sonde, die mit einem orangefarbenen Fluorochrom markiert war, war speziell auf die für HER2 kodierende chromosomale Region 17q12-q21.1 gerichtet, um die *ERBB2*-Kopienzahl zu bestimmen. Eine zweite mit grünem Fluorochrom markierte Sonde diente als Referenzsonde, indem sie spezifisch auf die Zentromerregion des Alpha-Satelliten von Chromosom 17 (D17Z1) band. Die Sonden wurden mit den Chromosomen auf den TMAs bei 75 °C für 5 Minuten denaturiert und dann über Nacht bei 37 °C hybridisiert, gefolgt von drei Waschvorgängen. Der *ERBB2*-Amplifikationsstatus wurde durch Vergleich der Anzahl der orangefarbenen Signale (*ERBB2*) mit der Anzahl der grünen Signale (Referenz) bestimmt. Ein mittleres Verhältnis von *ERBB2* zur Referenzsonde von mindestens 2:1 wurde als amplifiziert angesehen. Die Analyse wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioimager.M2 Zeiss) durchgeführt, das mit drei geeigneten Filtern (Dapi 49 G365 FT395 BP445/50; Spectrum green F46-003 ET-Set YFP; Spectrum orange 43HE BP550/25 FT570 BP605/70), einer ladungsgekoppelten Kamera und der AxioVision Software Rel 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) ausgestattet war. Für jeden Fall wurden alle Kerne innerhalb einer Stanze ausgewertet. Mindestens 60 Kerne wurden von einer erfahrenen Pathologin (Dr. med. Anna Katharina Fischer-Straub) ausgezählt, um den Amplifikationsstatus zu bewerten (Abbildung 15)<sup>78</sup>.



## **2.6 Ethikvotum und Statistik**

Die statistische Auswertung dieser Studie erfolgte mit der SPSS Software Version 25. Die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Tumormarkern untereinander mit der Tumorprogression und anderen klinisch-pathologischen Parametern wurden mit Fishers Exakt Test oder dem t-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Überlebensanalysen für das progressionsfreie Überleben und die Time-To-Progression wurden mit Hilfe einer Kaplan-Meier-Kurve und dem Log-Rank-Test (Mantel-Cox) berechnet. Da verschiedene Parameter an der gleichen Stichprobe ausgewertet wurden, ist die Holm-Korrektur mit der R Software Version 4.1.0 durchgeführt worden, um einer Alphafehler-Kumulierung entgegenzuwirken. Ein signifikanter Unterschied wurde bei  $p \leq 0,05$  angenommen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt (Projektnummer: 645/2012/302) <sup>75</sup>.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Größe der Studiengruppe**

Insgesamt wurde Material von 80 Patientinnen (56 aus Tübingen und 24 aus München) mit potenziellen MOC für diese Studie evaluiert. Nach einem histologischen Review von A.S. und R.W. wurden 39 Patientinnen in die Studie eingeschlossen <sup>75</sup>. Ausschlussgründe sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Von den anfangs 56 Patientinnen der Tübinger RedCap Datenbank wurden 24 Patientinnen mit einem MOC in die Studie eingeschlossen. Bei 20 dieser Patientinnen konnten MBOT-Regionen im Tumor neben den Karzinomregionen identifiziert und untersucht werden <sup>75</sup>.

Von den 24 MOC der Universitätsklinik München wurden 15 Patientinnen in die Studie aufgenommen <sup>75</sup>. 9 Patientinnen wurden wegen ungenügendem Karzinomanteil auf den zugesandten Einzelschnitten (n=4) und wegen fraglichem Primärtumor (n=5) ausgeschlossen (Tabelle 5).

In das Vergleichskollektiv aus reinen MBOT wurden nach dem Review von A.S. und R.W. von 21 Fällen 16 reine MBOT eingeschlossen. Fünf Patientinnen zeigten eine seromuzinöse Differenzierung und wurden deswegen ausgeschlossen.

Tabelle 5: Ausschlussgründe aus dem MOC Kollektivs

<b>Tabelle 5. Ausschlussgründe</b>	
<b>Anzahl der Patientinnen</b>	<b>Ausschlussgrund</b>
17 (nTübingen= 13, nMünchen= 4)	Kein oder zu wenig Material vom Primärtumor
12 (nTübingen= 7, nMünchen= 5)	anderes Primärmalignom wahrscheinlich/ungeklärter Primärtumor
12(nTübingen= 12, nMünchen= 0)	Reklassifizierung durch A.S. <ul style="list-style-type: none"> <li>- Muzinöses Kystadenom (n=1)</li> <li>- Muzinöser Borderlinetumor (n=4)</li> <li>- Endometrioides Ovariakarzinom mit seromuzinöser Morphologie (n=3)</li> <li>- FATWO (Wolff'scher Adnextumor) (n=1)</li> <li>- Low grade seröses Karzinom (n=1)</li> <li>- Endometrioides Ovariakarzinom (n=2)</li> </ul>

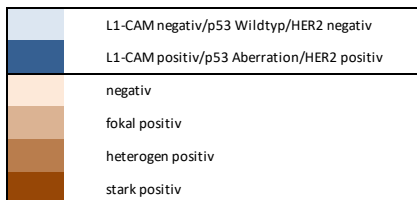
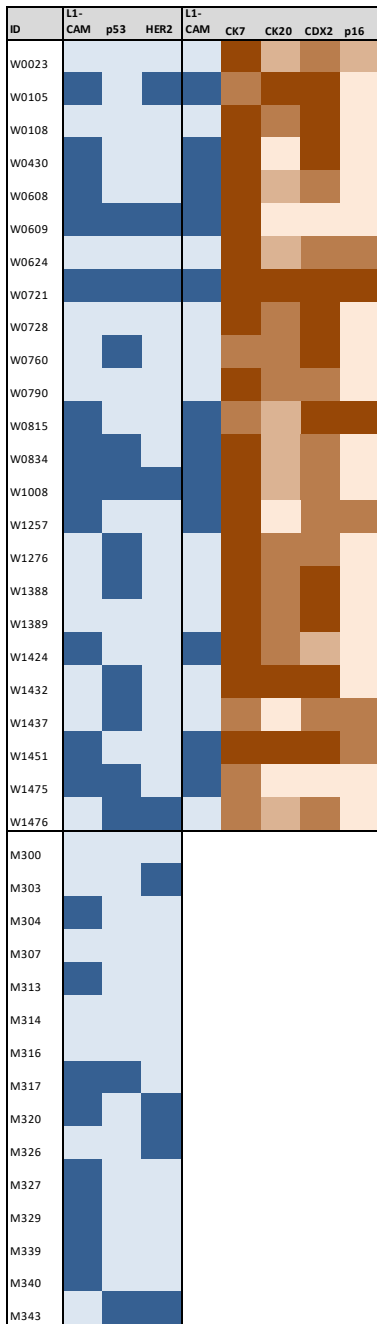
### **3.2 Immunhistochemische Überprüfung der MOC und MBOT auf den Tissue Microarrays (TMAs)**

Um extraovarielle Primarien auszuschließen, wurden die TMAs mit den Markern CK7, CK20, CDX2 und p16 gefärbt. Die Auswertung der Marker im MOC Kollektiv findet sich in Abbildung 11. Alle untersuchten MOC waren CK7 positiv. Mit Ausnahme von einem Fall war die CK7/CK20 Ratio  $\geq 1$ . Die CDX2 Expression reichte von negativ bis stark positiv (Abbildung 11). Die p16 Expression war in zwei Fällen stark positiv (W0721 und W0815), sodass hier eine HPV-Analyse folgte. In beiden Fällen konnte keine HPV-Infektion nachgewiesen werden, sodass es keinen Anhalt für ein primär endozervikales Karzinom gab <sup>75</sup>.

Außerdem wurde das von Köbel et al. <sup>45</sup> empfohlene Immun-Panel auf dem TMA an den MOC und MBOT angewendet, um den Histotyp der Tumore zu überprüfen. Abbildung 6 zeigt, dass MOC in diesem Algorithmus in genannter Reihenfolge WT1 negativ, Napsin-A negativ und PR negativ sind. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Expression dieser Marker für die untersuchten MOC dargestellt. Alle 24 MOC waren WT1 negativ und Napsin-A negativ. 19/24 MOC waren PR negativ. Fünf Fälle zeigten eine PR-Positivität von  $< 1\%$ , und ein Fall wies eine PR-Positivität von über 10% der Tumorzellen auf. Da alle Fälle morphologisch eindeutig MOC waren, blieben sie in der Kohorte <sup>75</sup>.

Die Auswertungsergebnisse des Panels von CK7, CK20, CDX2 und p16 an den reinen MBOT sowie an den MOC-benachbarten MBOT-Regionen zeigt Abbildung 12. Mit Ausnahme eines reinen MBOT waren ebenfalls alle MBOT CK7 positiv. Der Borderlinetumor mit CK7 Negativität zeigte eine heterogene CK20 Expression. Da dieses Expressionsmuster untypisch für primäre MOC ist, wurde dieser MBOT aus der Studie ausgeschlossen ( $n_{\text{MBOT}}=15$ ). Alle reinen MBOT waren ebenfalls WT1 negativ und zeigten keine starke Napsin-A oder PR Positivität <sup>75</sup>.

MOC  
A)



B)

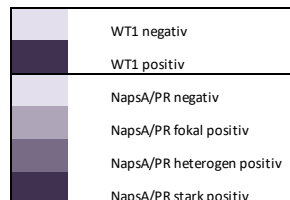
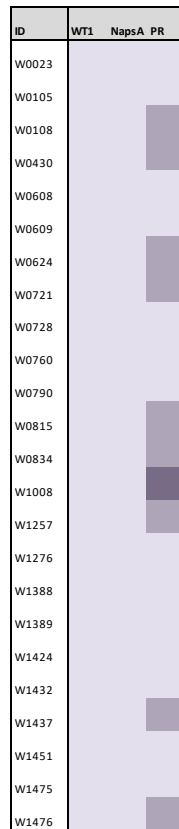


Abbildung 11: A) Immunhistochemische Auswertung der Marker L1-CAM, p53, HER2, CK7, CK20, CDX2 und p16 für MOC; B) Ergebnisse des muzinösen Pfads des Algorithmus von Köbel et al. bei den untersuchten MOC, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup>

**Reine MBOT**

ID	L1-CAM			L1-CAM				
	p53	HER2		CK7	CK20	CDX2	p16	
43*40								
W0034								
W0214								
W0246								
W0329								
W0333								
W0415								
48*89								
W0610								
W0211								
W0407								
W0563								
W0685								
W0828								
W1075								
W1228								

	L1-CAM negativ/p53 Wildtyp/HER2 negativ
	L1-CAM positiv/p53 Aberration/HER2 positiv
	negativ
	fokal positiv
	heterogen positiv
	stark positiv

**MBOT Anteile benachbart zu MOC**

ID	L1-CAM			L1-CAM				
	p53	HER2		CK7	CK20	CDX2	p16	
W0108								
W0624								
W0728								
W0760								
W0790								
W1257								
W1276								
W1388								
W1389								
W1432								
W1437								
W1451								
W1475								
W1476								
W0105								
W0815								
W0609								
W0721								
W0834								
W1008								

Abbildung 12: Immunhistochemische Auswertung der 16 reinen MBOT und der 20 MBOT-Anteile, welche benachbart zu MOC lokalisiert waren, für L1-CAM, p53, HER2, CK7, CK20, CDX2, p16

### **3.3 Verteilung der klinisch pathologischen Parameter**

Bei den 39 untersuchten Patientinnen mit MOC lag das mediane Alter bei 53 Jahren (Standardabweichung=16,95 Jahre; Spannweite=65 Jahre). Insgesamt war bei 27 Patientinnen ein FIGO I Stadium zu finden, zwei Patientinnen hatten ein FIGO II und zehn Patientinnen ein FIGO III Stadium. Im Grading hatten 17 Patientinnen einen G1 Tumor, 20 waren G2 und zwei Patientinnen wiesen ein G3 auf. Dabei wurde vor allem anhand der Kernatypie durch A.S. gradet. Etwa dreiviertel der untersuchten Patientinnen hatten einen rein expansiv wachsenden und 25,6% einen infiltrativ wachsenden Tumor. Etwa ein Drittel der Patientinnen war zum Zeitpunkt der Follow-Up Untersuchung bereits gestorben. Bei sieben Patientinnen konnte ein Rezidiv beobachtet werden. Die absolute und relative Verteilung aller oben beschriebenen Merkmale ist in Tabelle 6 genau dargestellt <sup>75</sup>.

Tabelle 6. Klinisch pathologische Daten und verschiedenen Cut-Offs, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup>

Tabelle 6. Klinisch pathologische Daten und L1-CAM mit verschiedenen Cut-Offs							
	Gesamt	L1-CAM			L1-CAM Score $\geq 3$		
		Negativ	Jegliche Positivität	P Wert	L1-CAM <10%	L1-CAM $\geq 10\%$	P Wert
<b>Anzahl der Patientinnen</b>	39	19 (48.7%)	20 (51.3%)		31 (79.5%)	8 (20.5%)	
<b>Alter bei Diagnose</b>							
<b>Mittelwert</b>	51.87 ( $\pm$ 16.95)	54.26 ( $\pm 16.94$ )	49.6 ( $\pm 17.08$ )	1.000	52.87 ( $\pm 17.42$ )	48.0 ( $\pm 15.42$ )	1.000
<b>Median</b>	53	42	56		68	41	
<b>FIGO IA</b>							
<b>FIGO IA</b>	19 (48.7%)	8 (42.2%)	11 (55%)	1.000	15 (48.4%)	4 (50%)	1.000
<b>FIGO IB-FIGO III</b>	20 (51.3%)	11 (57.9%)	9 (45%)		16 (51.6%)	4 (50%)	
<b>FIGO Stadium</b>							
<b>FIGO I</b>	27 (69.2%)	15 (78.9%)	12 (60%)	1.000	23 (74.2%)	4 (50%)	0.144
<b>FIGO II</b>	2 (5.1%)	0 (0%)	2 (10%)		0 (0%)	2 (25%)	
<b>FIGO III</b>	10 (25.6%)	4 (21.1%)	6 (30%)		8 (25.8%)	2 (25%)	
<b>Grading</b>							
<b>G1</b>	17 (43.6%)	9 (47.4%)	8 (40%)	1.000	16 (51.6%)	1 (12.5%)	0.777
<b>G2</b>	20 (51.3%)	10 (52.6%)	10 (50%)		14 (45.2%)	6 (75%)	
<b>G3</b>	2 (5.1%)	0 (0%)	2 (10%)		1 (3.2%)	1 (12.5%)	
<b>Wuchsmuster</b>							
<b>Expansiv</b>	29 (74.4%)	14 (73.7%)	15 (75%)	1.000	25 (80.6%)	4 (50%)	0.616
<b>Infiltrativ</b>	10 (25.6%)	5 (26.3%)	5 (25%)		6 (19.4%)	4 (50%)	
<b>p53</b>							
<b>Aberrant</b>	13 (33.3%)	7 (36.8%)	6 (30%)	1.000	12 (38.7%)	1 (12.5%)	0.966
<b>Wildtyp</b>	26 (66.7%)	12 (63.2%)	14 (70%)		19 (61.3%)	7 (87.5%)	
<b>HER2</b>							
<b>Negativ/ unklar</b>	30 (76.9%)	15 (78.9%)	15 (75%)	1.000	23 (74.2%)	7 (87.5%)	1.000
<b>Positiv</b>	9 (23.1%)	4 (21.1%)	5 (25%)		8 (25.8%)	1 (12.5%)	
<b>Vitalstatus</b>							
<b>Verstorben</b>	14 (35.9%)	6 (31.6%)	8 (40%)	1.000	11 (35.5%)	3 (37.5%)	1.000
<b>Lebend</b>	25 (64.1%)	13 (68.4%)	12 (60%)		20 (64.5%)	5 (62.5)	
<b>Rezidivstatus</b>							
<b>Kein Rezidiv</b>	32 (82.1%)	19 (100%)	13 (65%)	0.036	26 (83.9%)	6 (75%)	1.000
<b>Rezidiv</b>	7 (17.9%)	0 (0%)	7 (35%)		5 (16.1%)	2 (25%)	



### 3.3.1 Zusammenhang klinisch-pathologischer Parameter mit dem Gesamtüberleben

Wie bereits bekannt, zeigte sich auch in dieser Studiengruppe ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem FIGO Stadium und dem Vitalstatus ( $p=0.016$ ). Dieses Ergebnis spiegelt sich im Gesamtüberleben wider (Abbildung 13) ( $p<0.001$ ). Außerdem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Grading und dem Vitalstatus ( $p=0.038$ ). Das infiltrative Wuchsmuster, welches ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert wird, zeigte in dieser Studie jedoch keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben.

Weder die L1-CAM Expression noch die p53 Aberration oder die HER2 Überexpression zeigten einen signifikanten Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben <sup>75</sup>.

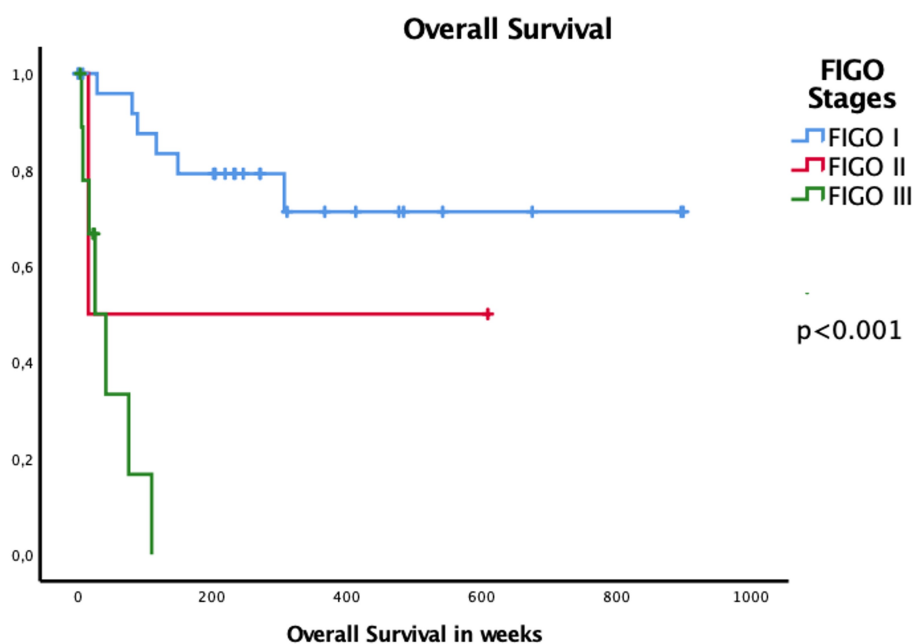


Abbildung 13: Überlebensanalyse abhängig vom FIGO Stadium

### **3.4 L1-CAM Cut-Off**

Die L1-CAM Positivität wurde in dieser Doktorarbeit ab einer Einzelzellpositivität definiert. In Tabelle 6 wird die Signifikanz der Ergebnisse bei verschiedenen Cut-Offs für die L1-CAM Positivität dargestellt. Hier zeigte sich, dass Ergebnisse nur signifikant waren, wenn entweder zwischen jeglicher Positivität (ab Score 1) und Negativität (Score 0) unterschieden wurde oder zwischen Score 0/1 und Score 2/3. Wegen der höheren Sensitivität des Markers und der einfacheren und damit auch objektiveren Bewertung der Expression, wurde im Folgenden nur noch zwischen L1-CAM Negativität (Score 0) und jeglicher Positivität (ab Score 1) unterschieden. Bilder der Scores finden sich in Abbildung 10<sup>75</sup>.

### 3.5 L1-CAM Expression in MOC und deren Zusammenhang mit anderen klinisch-pathologischen Parametern

Innerhalb der Kohorte exprimierten 20 von 39 Patientinnen mit einem MOC mindestens eine fokale L1-CAM Positivität der Tumorzellen. Davon präsentierten fünf MOC L1-CAM eine Einzelzellpositivität (Score 1), sieben MOC zeigten Zellclusterpositivität (Score 2) und bei acht Patientinnen waren mindestens 10% der Zellen L1-CAM positiv (Score 3). Relative und absolute Angaben finden sich in Tabelle 6 <sup>75</sup>.

Es wurde kein Zusammenhang zwischen der L1-CAM Expression und dem Grading oder dem FIGO-Stadium festgestellt. Auch konnte kein Zusammenhang mit dem Wachstumsmuster beobachtet werden. Beispielhaft ist in Abbildung 14 die L1-CAM Positivität sowohl im infiltrativ als auch im expansiv wachsenden Typ dargestellt <sup>75</sup>.

Ferner zeigte sich auch kein Zusammenhang von der L1-CAM Expression mit der p53 Aberration oder der immunhistochemischen HER2 Überexpression (Tabelle 6) <sup>75</sup>.

Von 9 MOC mit verfügbarem Tumormaterial und einem HER2 Score  $\geq 2+$  wurde anschließend eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) am TMA durchgeführt, um den Genamplifikationsstatus des *ERBB2* Gens zu überprüfen. Dabei waren 3/5 HER2 3+ positive MOC final amplifiziert, alle HER2 2+ Karzinome waren nicht amplifiziert. Ein Zusammenhang des Amplifikationsstatus und der L1-CAM Expression zeigte sich nicht. Abbildung 15 zeigt beispielhaft Ergebnisse aus der HER2 FISH-Analyse. In A ist ein Beispiel eines nicht amplifizierten Tumors und in B das eines HER2 amplifizierten Tumors, mit deutlich vermehrtem Auftreten der orangenen Sonde im Vergleich zur grünen Referenzsonde, zu sehen. Wegen ungenügendem Tumormaterial konnte die FISH-Analyse nicht für die HER2 positiven Fälle aus München gemacht werden <sup>75</sup>.

Auch bei klinischen Parametern wie dem Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung oder der Gesamtüberlebenszeit gab es keinen Unterschied zwischen L1-CAM negativen und L1-CAM positiven MOC (Tabelle 6) <sup>75</sup>.

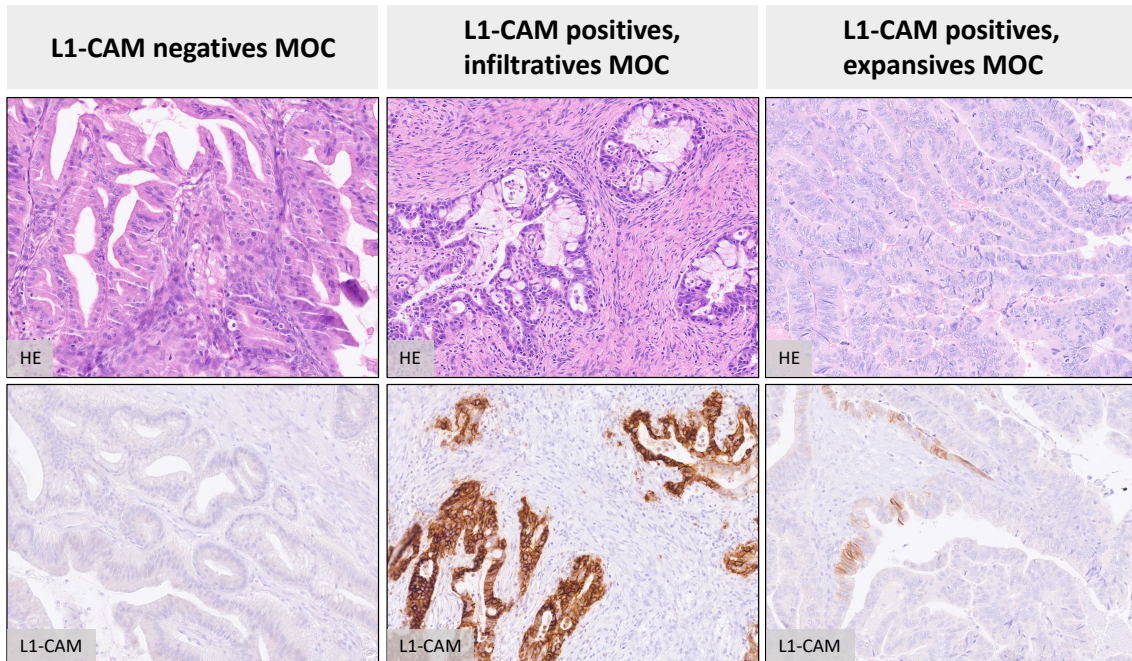


Abbildung 14: L1-CAM in den beiden verschiedenen Wuchsmustern, adaptiert aus Wiedenhoefer et al. <sup>75</sup>

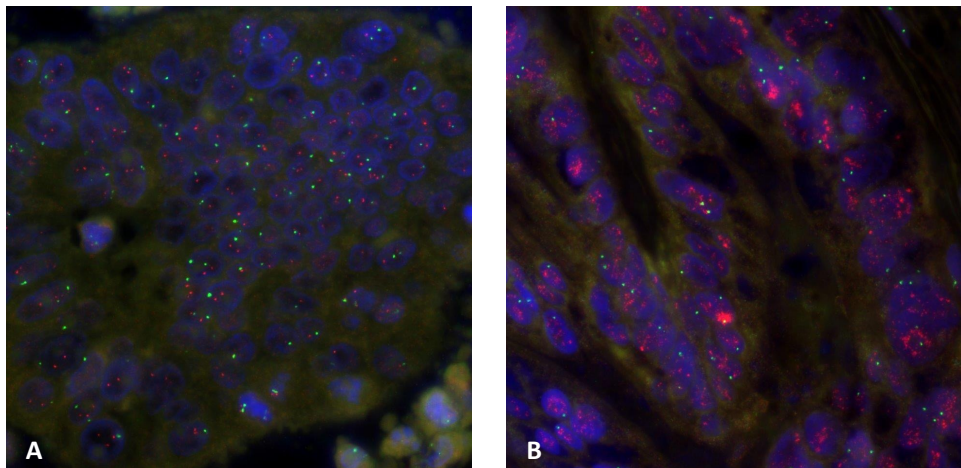


Abbildung 15: ERBB2 Amplifikation in MOC durch FISH. (A) Tumorzellen ohne Amplifikation, (B) mit Amplifikation von einem Verhältnis  $>2,0$  zur grünen Referenzsonde

### 3.6 Zusammenhang von L1-CAM mit dem Rezidivstatus

Ein signifikanter Zusammenhang wurde zwischen der L1-CAM Expression und dem Auftreten eines Rezidivs ( $p=0.032$ ) beobachtet (Tabelle 7). Keines der L1-CAM negativen MOC rezidierte, während bei 7/20 (35%) L1-CAM positiven MOC ein Rezidiv beobachtet wurde. Damit zeigt die L1-CAM Positivität eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 59.4% bezüglich des Auftretens eines Rezidivs <sup>75</sup>.

Hingegen hingen Alter bei Diagnose, FIGO-Stadium, Grading, Wachstumsmuster, aberrante Expression von p53 oder HER2 Überexpression nicht signifikant mit dem Vorkommen eines Rezidivs zusammen (Tabelle 7) <sup>75</sup>.

Die klinischen und pathologischen Details der rezidierten MOC sind in Tabelle 8 zusammengefasst <sup>75</sup>.

Basierend auf diesen Ergebnissen zeigte sich, dass die L1-CAM Expression einen signifikanten prognostischen Einfluss auf die Time-To-Progression (TTP) hat ( $p=0.028$ ) (Abbildung 16a). Die TTP ist als Zeit definiert, die zwischen Erstdiagnose und Tumorrezidiv vergeht, wobei der Tod einer Patientin auf die TTP keinen Einfluss hat. Beim progressionsfreien Überleben (PFÜ) hingegen wird die Zeit zwischen Erstdiagnose und Rezidiv oder Tod einer Patientin berechnet. Beim progressionsfreien Überleben (PFÜ) war kein signifikanter Unterschied zwischen L1-CAM positiven und negativen MOC festzustellen (Abbildung 16b). Dies lag daran, dass auch bei L1-CAM negativen Patienten Todesfälle auftraten, was als Endpunkt des PFÜ berechnet wurde <sup>75</sup>.

Tabelle 7: Klinisch-pathologische Daten im Zusammenhang mit dem Rezidivstatus, adaptiert aus Wiedenhofer et al.<sup>75</sup>

<b>Tabelle 7. Klinisch-pathologische Daten und Rezidivstatus</b>				
	<b>Gesamt</b>	<b>Kein Rezidiv</b>	<b>Rezidiv</b>	<b>P Wert</b>
<b>Anzahl der Patientinnen</b>	39 (100%)	32 (82.1%)	7 (17.9%)	
<b>Alter bei Diagnose</b>				
<b>Mittelwert</b>	51.87 (±16.95)	51.75 (±16.65)	52.43 (±19.68)	1.000
<b>Median</b>	53	53	56	
<b>FIGO IA</b>				
<b>FIGO IA</b>	19 (48.7%)	17 (89.5%)	2 (10.5%)	1.000
<b>FIGO IB-III</b>	20 (51.3%)	15 (75%)	5 (25%)	
<b>FIGO Stadium</b>				
<b>FIGO I</b>	27 (69.2%)	24 (88.9%)	3 (11.1%)	1.000
<b>FIGO II</b>	2 (5.1%)	1 (50%)	1 (50%)	
<b>FIGO III</b>	10 (25.6%)	7 (70%)	3 (30%)	
<b>Grading</b>				
<b>G1</b>	17 (43.6%)	14 (82.4%)	3 (17.6%)	1.000
<b>G2</b>	20 (51.3%)	17 (85%)	3 (15%)	
<b>G3</b>	2 (5.1%)	1 (50%)	1 (50%)	
<b>Wuchsmuster</b>				
<b>Expansiv</b>	29 (74.4%)	23 (79.3%)	6 (20.7%)	1.000
<b>Infiltrativ</b>	10 (25.6%)	9 (90%)	1 (10%)	
<b>p53</b>				
<b>Aberrant</b>	13 (33.3%)	9 (69.2%)	4 (30.8%)	0.980
<b>Wildtyp</b>	26 (66.7%)	23 (88.5%)	3 (11.5%)	
<b>HER2</b>				
<b>Negativ/unklar</b>	30 (76.9%)	26 (86.7%)	4 (13.3%)	1.000
<b>Positiv</b>	9 (23.1%)	6 (66.7)	3 (33.3%)	
<b>L1-CAM</b>				
<b>Negativ</b>	19 (48.7%)	19 (100%)	0 (0%)	0.032
<b>Positiv</b>	20 (51.3%)	13 (65%)	7 (35%)	

Tabelle 8: Daten der rezidierten MOC, adaptiert aus Wiedenhoefler et al. <sup>75</sup>

Tabelle 8: Daten der rezidierten MOC												
ID	TTP in Wochen	Vital-status	Alter	Tumorgröße in cm	Größe des invasiven Areals in mm	Wuchsmuster	Grading	FIGO	L1-CAM	HER2	p53	Ort des Rezidivs
W0430	62	Lebt	46	n/a	n/a	Destr.	G1	IA	≥10%	1+	wt	Rechte Beckenwand
W0609	68	Tot	44	21	18	Exp.	G1	IIIC	Einzelzellen	3+	abr	Rechte Beckenwand mit infiltriertem Rektum, Harnblase und paraaortalen Lymphknoten
W0721	73	Tot	16	10	100	Exp.	G2	IC	Zellcluster	3+	abr	Perihepatisch, Magen, rechter Unterbauch, Peritonealkarzinose
W0834	22	Tot	76	23	8	Exp.	G1	IIIB	Zellcluster	2+	abr	Multifokal hepatisch metastasiert, und Progression der Peritonealkarzinose
W1008	79	Tot	68	25	15	Exp.	G2	IA	Zellcluster	3+	abr	Hepatisch, Peritonealkarzinose
M304	120	Lebt	56	n/a	n/a	Exp.	G2	IIA	≥10%	0	wt	n/a
M329	47	Tot	61	n/a	n/a	Exp.	G3	IIIC	Zellcluster	1+	wt	n/a

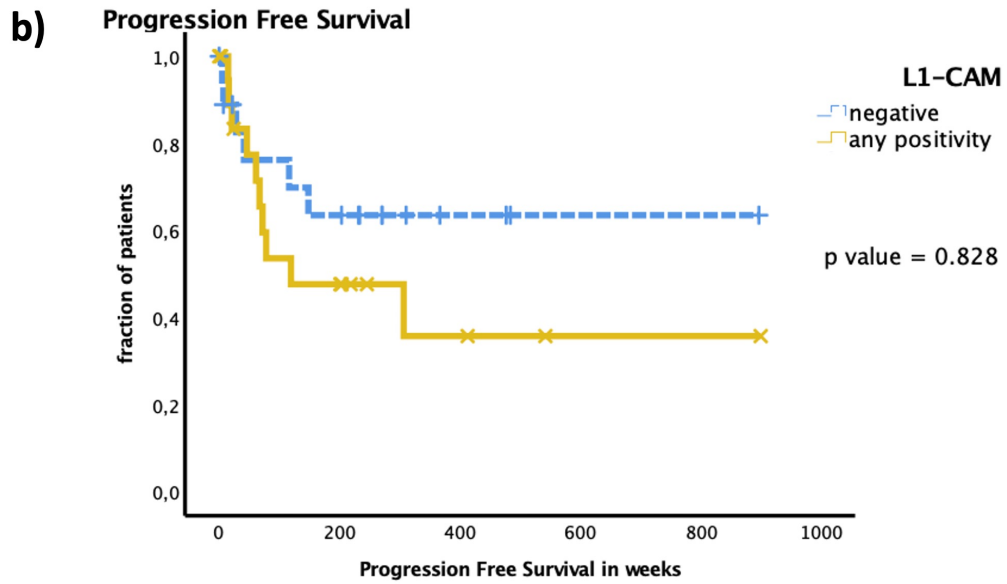
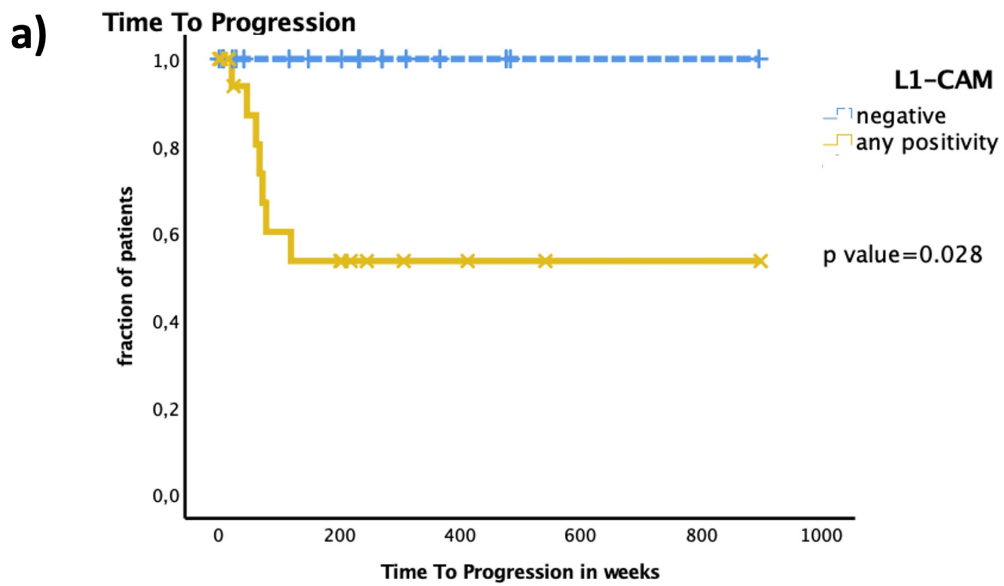


Abbildung 16: a) TTP, b) Progressionsfreies Überleben, jeweils in Abhängigkeit von L1-CAM, übernommen aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup>



### 3.6.1 L1-CAM bei FIGO I Tumoren

Auch in der Subgruppe der FIGO IA-C Tumoren war nur die L1-CAM Expression der einzige Parameter, der einen Trend mit dem Auftreten eines Rezidivs aufwies ( $p=0.45$ ). Die Rezidivrate der  $n=15$  L1-CAM negativen Patientinnen lag bei 0%, während 3/12 (25%) der L1-CAM positiven FIGO IA-C Tumore rezidierten (Tabelle 9). In Abbildung 17 wird der Trend in der TTP dieser Subgruppe dargestellt <sup>75</sup>.

Tabelle 9: Subgruppenanalyse FIGOIA-C, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup>

Tabelle 9. Subgruppe FIGO I: Klinisch-pathologische Daten im Zusammenhang mit dem Rezidivstatus				
	Gesamt	Kein Rezidiv	Rezidiv	P Wert
<b>Anzahl der Patientinnen</b>	27 (100%)	24 (88.9%)	3 (11.1%)	
<b>Alter bei Diagnose</b>				
<b>Mittelwert</b>	49.26	50 (+/-15.64)	43.3 (+/-26.10)	1.00
<b>Median</b>	51 (+/-16.54)	51	46	
<b>Grading</b>				
<b>G1</b>	15 (55.6%)	14 (93.3%)	1 (6.7%)	1.00
<b>G2</b>	12 (44.4%)	10 (83.3%)	2 (16.7%)	
<b>Wuchsmuster</b>				
<b>Expansiv</b>	25 (92.6%)	23 (92%)	2 (8%)	1.00
<b>Infiltrativ</b>	2 (7.4%)	1 (50%)	1 (50%)	
<b>p53</b>				
<b>Aberrant</b>	10 (37%)	8 (80%)	2 (20%)	1.00
<b>Wildtyp</b>	17 (63%)	16 (94.1%)	1 (5.9%)	
<b>HER2</b>				
<b>Negativ/unklar</b>	19 (70.4%)	18 (94.7%)	1 (5.3%)	1.00
<b>Positiv</b>	8 (29.6%)	6 (75%)	2 (25%)	
<b>L1-CAM</b>				
<b>Negativ</b>	15 (55.6%)	15 (100%)	0 (0%)	0.45
<b>Positiv</b>	12 (44.4%)	9 (75%)	3 (25%)	

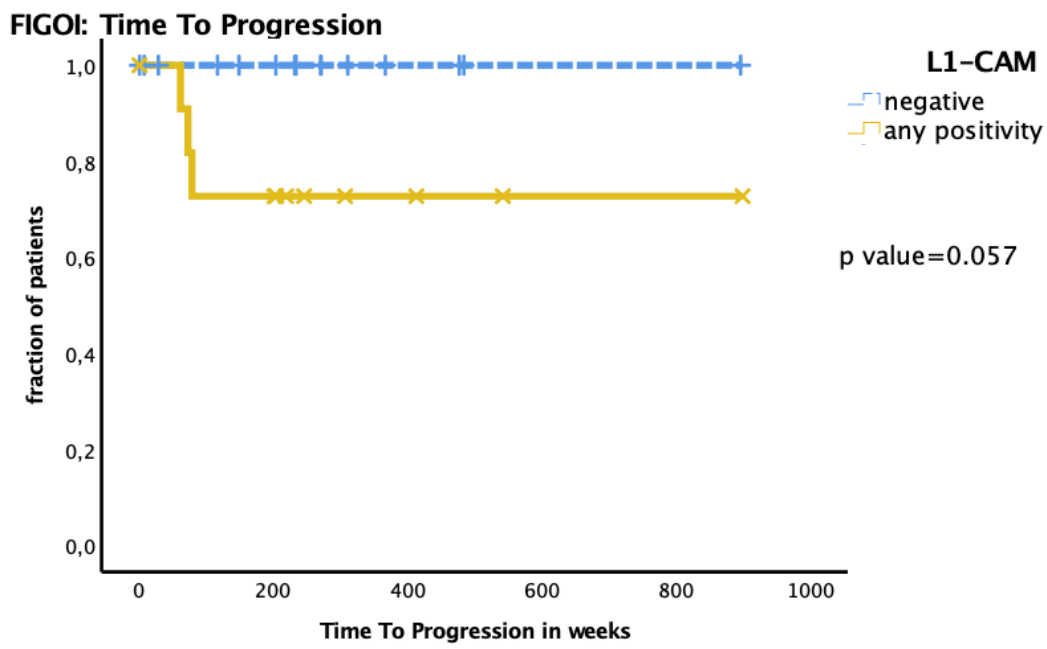


Abbildung 17: TTP in Abhängigkeit von L1-CAM für FIGO IA-C, übernommen aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup>

### 3.7 L1-CAM als Progressionsindikator bei MBOT (zusammen mit p53 und HER2)

Eine L1-CAM Expression wurde in MBOT bei wenigen Fällen mit angrenzendem Karzinom gefunden, aber nie in MBOT ohne Karzinom (3/21, 14,3%, und 0/16, 0%, nicht signifikant, Tabelle 10) <sup>75</sup>.

MBOT mit benachbartem Karzinom wiesen deutlich häufiger eine aberrante p53 Expression auf (16/21, 65%,  $p=0.048$ ) als reine MBOT (3/16, 20%) (Tabelle 10). Wie auch die L1-CAM Expression, wurde eine HER2 Überexpression nur in MBOT-Regionen in Assoziation mit MOC beobachtet (4/21, 19%). Wenn p53, HER2 und L1-CAM als „Risikomarker“ kombiniert wurden, wiesen 70% der MBOT mit assoziiertem Karzinom eine Expression von mindestens einer dieser spezifischen molekularen Veränderungen auf, verglichen mit nur 20% der reinen MBOT ( $p=0.024$ ). Abbildung 18 zeigt Beispiele für die HE-, HER2-, p53- und L1-CAM Färbung eines reinen MBOT, einer benachbarten MBOT-Region eines MOC und eines MOC, nebeneinander dargestellt: Der MBOT mit assoziiertem Karzinom (Fall W0815) zeigte eine diffuse, deutliche L1-CAM Positivität. Das muzinöse Karzinom (Fall W0721) war dreifach positiv mit aberranter p53 Expression, durch FISH bestätigter HER2 Überexpression und leichter L1-CAM Positivität, während der MBOT ohne bekanntes Karzinom (Fall W0610) keine dieser molekularen Veränderungen aufwies <sup>75</sup>.

Tabelle 10: Tumormarker bei MBOT, adaptiert aus Wiedenhofer et al. <sup>75</sup>

<b>Tabelle 10. Muzinöse Borderline Tumore: Potenzielle Progressionsmarker</b>				
	<b>Total</b>	<b>MBOT ohne MOC</b>	<b>MBOT mit assoziiertem MOC</b>	<b>P Wert</b>
<b>Anzahl der Patientinnen</b>	35 (100%)	15 (42.9%)	20 (57.1%)	
<b>L1-CAM</b>				0.244
<b>Negativ</b>	32 (91.4%)	15 (100%)	17 (85%)	
<b>Positiv</b>	3 (8.6%)	0 (0%)	3 (15%)	
<b>HER2</b>				0.238
<b>Negativ/unklar</b>	31 (88.6%)	15 (100%)	16 (80%)	
<b>Positiv</b>	4 (11.4%)	0 (0%)	4 (20%)	
<b>p53</b>				0.048
<b>Wildtyp</b>	19 (54.3%)	12 (80%)	7 (35%)	
<b>Aberrant</b>	16 (45.7%)	3 (20%)	13 (65%)	
<b>Risikomarker</b>				0.024
<b>Kein Risikomarker</b>	18 (51.4%)	12 (80%)	6 (30%)	
<b>Mindestens ein Risikomarker</b>	17 (48.6%)	3 (20%)	14 (70%)	

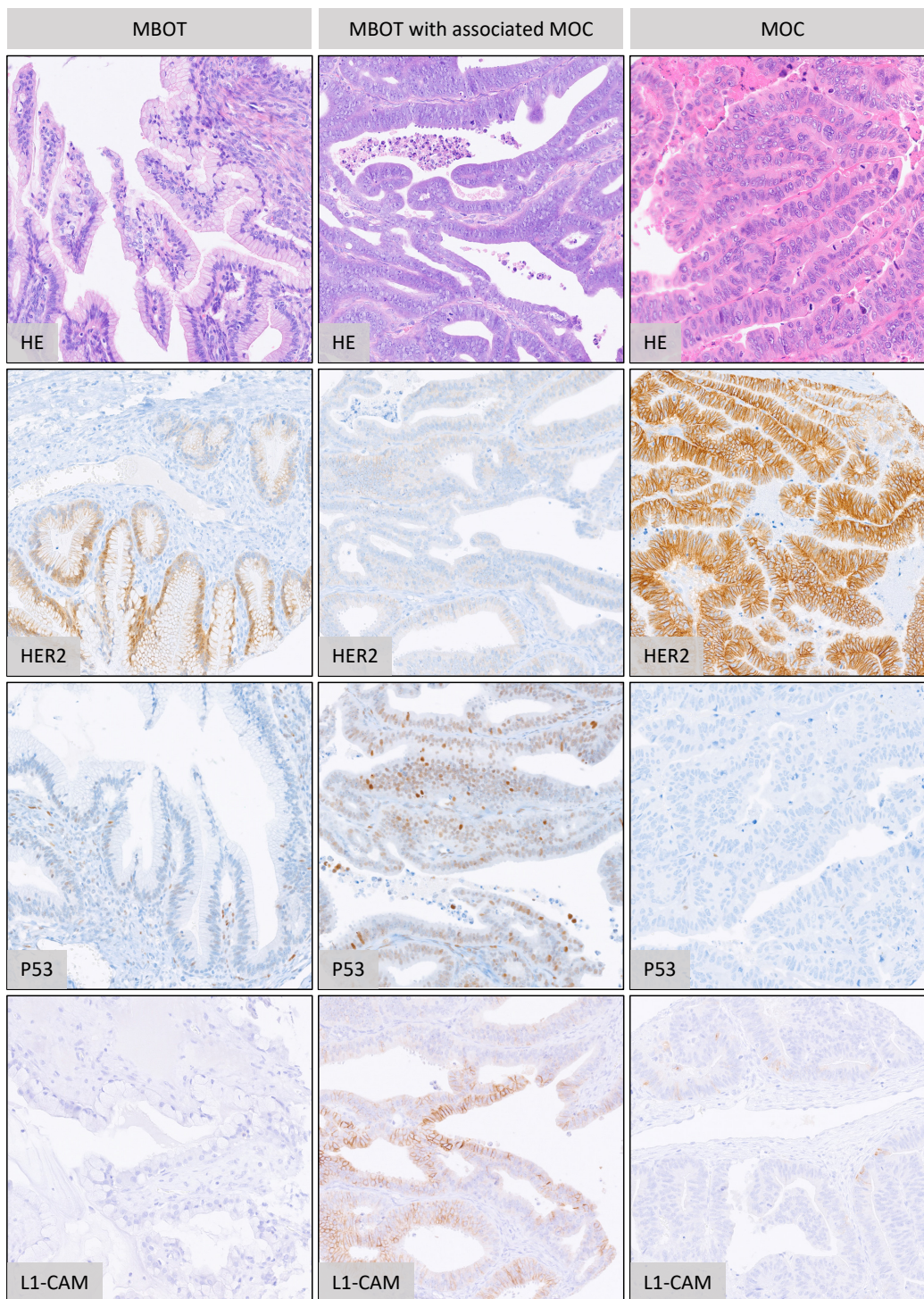


Abbildung 18: Reiner MBOT, MBOT mit benachbartem Karzinom, MOC (Übernommen aus Wiedenhoefler et al. <sup>75</sup>)

Links ist ein reiner MBOT zu sehen, mittig eine MBOT-Region eines MOC und rechts ein MOC. Der MBOT mit assoziiertem Karzinom (Fall W0815) zeigte eine diffuse L1-CAM Positivität. Das muzinöse Karzinom (Fall W0721) ist dreifach positiv mit aberranter p53 Expression, durch FISH bestätigter HER2 Überexpression und leichter L1-CAM Positivität, während der MBOT ohne bekanntes Karzinom (Fall W0610) keine dieser molekularen Veränderungen zeigt.

### **3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse**

In dieser Studie untersuchten wir erstmalig an einem gut charakterisierten Kollektiv aus MOC und MBOT die Expression des Tumormarkers L1-CAM, der bei vorausgegangenen Studien an Karzinomen des weiblichen Genitaltrakts oder dem Kolonkarzinom bereits vielversprechende klinische Relevanz gezeigt hat. Zunächst konnten wir zeigen, dass dieser Marker in mehr als der Hälfte der untersuchten MOC-Fälle in zumindest Einzelzellen exprimiert wird. Darüber hinaus stellten wir fest, dass die L1-CAM Expression signifikant mit dem Risiko eines klinischen Rezidivs assoziiert ist, aber keine Korrelation mit anderen klinisch-pathologischen Parametern aufweist <sup>75</sup>.

Schließlich konnten wir zeigen, dass bestimmte molekulare Veränderungen (L1-CAM Expression, HER2 Überexpression oder aberrante p53 Expression) signifikant häufiger bei MBOT-Regionen mit assoziiertem MOC zu beobachten waren als in reinen MBOT. <sup>75</sup>.

## 4 Diskussion

### 4.1 Relevanz der Klassifizierung

Muzinöse Ovarialkarzinome gehören mit 2-3% zu einer weniger häufigen Tumorentität dieses Organs. Aufgrund der geringen Fallzahl und der Vielzahl an Differenzialdiagnosen sind frühere Studien zu MOC oft durch Einbeziehung fehldiagnostizierter metastasierter Adenokarzinome anderer Primarien verzerrt<sup>14,15,22</sup>. Daher wurde in unserer Studie eine gründliche Überprüfung der Histologie, des Phänotyps und der klinischen Daten durchgeführt, um eine reine MOC-Kohorte zu generieren und falsche Schlussfolgerungen zu minimieren. Wie auch in den S3-Leitlinien empfohlen, wurde in dieser Studie ein Panel aus CK7, CK20, CDX2 und p16 für die Tübinger Fälle (n=24) verwendet, um die Diagnose von primären MOC zu verifizieren<sup>9</sup>. Jedoch sind Sensitivität und Spezifität dieses Panels eingeschränkt<sup>39</sup>, sodass eine morphologische Begutachtung in jedem Fall unabdingbar ist. Insbesondere bei MOC mit Teratomursprung, welche etwa 3-8% der MOC ausmachen, ist zu beachten, dass das Verhältnis der Expression von CK7/CK20 oft ausgeglichen ist<sup>14,42</sup>, und somit eine ähnliche bzw. eine stärkere Expression von CK20 zu CK7 nicht unbedingt ein Ausschlussgrund für die MOC Diagnose darstellt. Daher verblieben trotz eines eher untypischen CK7/CK20-Verhältnis auch muzinöse Tumore in der Tübinger Kohorte, nachdem sie von A.S. gescreent und bei erneuter Durchsicht aufgrund ihrer Morphologie als MOC klassifiziert wurden. Im Gegensatz dazu wurde ein MBOT, dessen muzinöser Charakter schon bei morphologischer Begutachtung unsicher war, wegen seines untypischen CK7/CK20-Verhältnis ausgeschlossen. Die Münchener Fälle waren im Rahmen von anderen Studien in München bereits mit CK7, CK20, SATB2 und CDX2 immunhistochemisch untersucht worden<sup>76</sup>. Diese Daten wurden in Tübingen jedoch nicht nochmals verifiziert<sup>75</sup>.

Auch die Differenzierung zwischen den verschiedenen Histotypen der EOC stellt Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung eines MOC dar. Daher wurde neben dem morphologischen Review das von Köbel et al.<sup>45</sup> empfohlene immunhistochemische Klassifizierungspanel an den vorhandenen TMAs

angewendet, um unsere Fälle von anderen Histotypen bestmöglich und sicher zu unterscheiden. WT1 und Napsin-A sind in unserem Kollektiv, wie bei Köbel et al. negativ (Abbildung 6, Abbildung 11). Jedoch beobachteten wir MOC Fälle, die gemäß Köbel et al. PR positiv waren. Köbel et al. definierten die PR-Positivität schon ab  $\geq 1\%$  der Tumorzellen, was einer fokalen Positivität in unserer Studie entspricht. Damit würden 10 MOC nach dem Algorithmus als endometrioides Ovarialkarzinome definiert werden. Die Wahrscheinlichkeit der Verwechslung dieser beiden Histotypen scheint gegeben, wie kürzlich in einer Studie berichtet wurde <sup>79</sup>. Jedoch stellt sich die Frage, ob eine PR-Positivität von  $\geq 1\%$  spezifisch genug ist, da auch bei MOC von geringer PR-Positivität berichtet wird <sup>80</sup>. In Bezug auf die immunhistochemischen Algorithmen ist zudem fraglich, ob diese der morphologischen Klassifikation überlegen sind oder, wie meist empfohlen, erst bei Unklarheit der Morphologie eingesetzt werden sollten. Folglich wurden nach erneuter Durchsicht der leicht PR positiven MOC hiervon Ganzschnitte angefertigt, welche dann hinsichtlich des PR-Status erneut begutachtet wurden. Nach dieser Analyse wurde final entschieden, diese Tumoren trotz geringer PR-Expression als MOC zu werten, da die Morphologie eindeutig schien <sup>75</sup>.



## 4.2 Relevanz von L1-CAM bei MOC

Hinsichtlich der L1-CAM Expression bei MOC stimmen unsere Ergebnisse mit einigen, aber nicht mit allen bisherigen Studien überein. Ähnlich wie Hao Hong et al.<sup>59</sup> konnten wir zeigen, dass es auch bei den MOC eine Gruppe L1-CAM positiver Tumore gibt. Im Gegensatz dazu haben Huszar et al.<sup>57</sup> bei MOC keine L1-CAM Positivität gefunden. Diese Diskrepanz kann darauf zurückzuführen sein, dass bei Huszar et al.<sup>57</sup> L1-CAM Positivität erst ab >10% definiert wurde und außerdem nur 20 MOC untersucht worden sind. In unserer Studie stieg die Sensitivität des Markers aufgrund des niedrigen Cut-Off-Wertes für L1-CAM (jegliche Positivität) und war durch die fast doppelt so große Stichprobe (n=39) repräsentativer.

Darüber hinaus konnten wir eine signifikante Assoziation zwischen der L1-CAM Expression und einem Tumorrezidiv feststellen ( $p=0.032$ ). Keiner der L1-CAM negativen Tumoren (n=19) rezidierte, während bei 7/20 L1-CAM positiven Tumoren ein Rezidiv beobachtet wurde. Einen signifikanten Unterschied im progressionsfreien Überleben zwischen L1-CAM positiven und negativen Tumoren zeigt sich in unserer Studie nicht, da auch L1-CAM negative Patientinnen verstorben waren, was in das progressionsfreie Überleben miteinberechnet wurde. Unklar blieb jedoch, an welcher Ursache die Patientinnen jeweils final verstorben waren, sodass auch andere Todesursachen die Krankheitsverläufe von L1-CAM negativen und positiven Patientinnen beeinflussen könnten. Im Gegenteil dazu ist die Time-To-Progression, in die nur Rezidiv-Ereignisse eingerechnet werden, zwischen L1-CAM negativen und positiven Patientinnen in unserer Studie deutlich unterschiedlich ( $p=0.028$ ). Hierbei ist das pathologisch gesicherte Rezidiv sehr spezifisch für eine Tumorprogression. Jedoch besteht die Wahrscheinlichkeit, dass es Patientinnen gibt, die wegen Tumorprogression an ihrem MOC verstorben sind, ohne zuvor ein Rezidiv diagnostiziert bekommen zu haben und dadurch in der Time-To-Progression vernachlässigt wurden<sup>75</sup>.

Auch in der Subgruppenanalyse der FIGO IA-C Tumoren zeigte sich der Trend in der TTP (Abbildung 17). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Studie mit serösen Ovarialkarzinomen gezeigt, in der das Vorkommen L1-CAM positiver

Zellen im Aszites mit einem schlechteren progressionsfreien Überleben assoziiert war <sup>75,81</sup>.

Während die L1-CAM Positivität bei serösen Ovarialkarzinomen mit dem Tumorstadium korreliert <sup>63,81</sup>, zeigt die L1-CAM Expression in unserer Studie keinen Zusammenhang mit dem Tumorstadium, dem Wachstumsmuster (Abbildung 14) und anderen klinisch-pathologischen Parametern ( $p > 0,05$ ). Somit war die L1-CAM Expression der einzige signifikante Marker für ein Rezidiv, mit einer Sensitivität von 100% in unserer Kohorte ( $p = 0.032$ ) <sup>75</sup>.

### 4.3 L1-CAM in Zusammenhang mit Tumorprogression

Bei der Auswertung von L1-CAM in MBOT beobachteten wir einen Zusammenhang zwischen der L1-CAM Expression und der Tumorprogression. In unserer Studie waren alle MBOT mit L1-CAM Positivität Tumore, die bereits an anderer Stelle in ein MOC übergegangen und somit fortgeschritten waren. Umgekehrt enthielt die Gruppe der L1-CAM negativen MBOT kein bekanntes benachbartes Karzinom. Trotz seiner hohen Spezifität für das Fortschreiten des Tumors, war die Sensitivität dieses Markers aufgrund der großen Anzahl von L1-CAM negativen invasiven Fällen gering. Dennoch sollte die L1-CAM Expression bei MBOT Anlass geben, den Tumor genauer auf ein mögliches invasives Karzinom hin zu untersuchen <sup>75</sup>.

Bei der Untersuchung von L1-CAM zusammen mit p53 und HER2 zeigte sich, dass MBOT mit benachbartem MOC häufiger mindestens eine der drei molekularen Veränderungen (L1-CAM Positivität, aberrante Expression von p53 oder HER2 Überexpression) aufwies als reine MBOT ( $p=0.024$ ) <sup>75</sup>.

Die aberrante Expression von p53 wurde bereits als möglicher Faktor bei der Progression von MBOT zu MOC diskutiert <sup>25</sup>. Cheasley et al. <sup>25</sup> fanden in MOC bei 64% eine *TP53* Mutation im Vergleich zu nur 18% bei MBOT. Unsere Ergebnisse unterstützen diese Behauptung, da schon die Rate von p53-Aberrationen bei MBOT mit benachbarten MOC signifikant höher war als bei reinen MBOT ( $p=0.048$ ). Die insgesamt hohe Rate aberranter p53 in den MBOT unserer Kohorte (45,7%) ist nicht repräsentativ, da die Gesamtstichprobe nicht konsekutiv war und MBOT-Regionen mit benachbarten MOC überrepräsentiert waren <sup>75</sup>.

Wenn nur die reinen MBOT betrachtet wurden, zeigten 20% (3/15) eine p53 Aberration, was mit der p53 Aberrationsrate von MBOT in der Studie von Cheasley et al. <sup>25</sup> vergleichbar ist <sup>75</sup>.

Die *ERBB2*-Amplifikation scheint ein spätes Event in der Pathogenese der MOC zu sein, da es selten in Studien bei MBOT beobachtet wurde <sup>36</sup>. Gleichermäßen zeigt sich in dieser Studie immunhistochemisch nur bei MBOT-Regionen mit assoziiertem MOC eine HER2 Positivität. Klinisch relevant könnte

der *ERBB2*-Amplifikationsstatus bei MOC insbesondere in Hinblick auf zielgerichtete Therapien, wie Trastuzumab, sein. Studien diesbezüglich fehlen derzeit, da nicht genug Patientinnen rekrutiert werden konnten. Zudem wird die Effektivität solcher Therapien durch die intratumorale Heterogenität und das geringe Immuninfiltrat bei MOC kritisch gesehen <sup>82</sup>.

#### 4.4 Limitationen dieser Arbeit

Insgesamt besteht die Einschränkung unserer Studie vor allem in der geringen Anzahl der Fälle. Daher sollten unsere Ergebnisse in einer größeren Kohorte kontrolliert und validiert werden. Die histologische Diagnose sollte zuvor morphologisch und mithilfe eines einheitlichen immunhistochemischen Panels überprüft werden <sup>75</sup>. SATB2 sollte dabei, wie auch in den S3 Leitlinien empfohlen, mit verwendet werden, da dieser Marker insbesondere für untere GI Tumoren spezifischer ist als CDX2 <sup>22,83,84</sup>.

Ein weiterer Kritikpunkt an dieser Studie stellt das begrenzt zur Verfügung gestellte Tumormaterial aus München dar. HER2 FISH-Analysen waren daher an Münchner Fällen nicht durchführbar. Weitere Leerschnitte aus München hätten uns die Möglichkeit gegeben, mittels FISH-Analyse die HER2 Amplifikationsrate zu bestimmen und dadurch das gesamte Kollektiv bezüglich des HER2 Status mit einer valideren Methodik auszuwerten. Um bei der Auswertung und Berechnung der Ergebnisse ein insgesamt einheitliches Testverfahren in der ganzen Kohorte anwenden zu können, wurden daher die HER2-Ergebnisse der Immunhistochemie verwendet.

Darüber hinaus würden Genexpressionsdaten aus unserer Kohorte helfen, unsere Ergebnisse zu validieren und die Unterschiede zwischen L1-CAM negativen und -positiven Tumoren auf molekulargenetischer Ebene zu bewerten. Ferner könnten mittels bekannter Mutationsspektren der MOC verbliebene andere Primärtumore bzw. Metastasen oder Histotypen aus der Kohorte gefiltert werden <sup>25 75</sup>.

Zuletzt sollte auf den Stichprobenfehler dieser Arbeit eingegangen werden, den wir durch das Beschränken der immunhistochemischen Untersuchungen an den zwei besten Tumorschnitte pro Fall, sowie der Auswertung vieler Färbungen allein am TMA, in Kauf genommen haben. Jedoch entspricht das der pathologischen Routine, bei der meistens auch nur ein oder zwei Schnitte eines Tumors immunhistochemisch untersucht werden. Obwohl die Auswertung am TMA nochmals eine Stichprobe der bereits ausgewählten Tumorareale darstellt, ergeben sich auch einige Vorteile bei der Nutzung dieses Verfahrens,

bei dem bis zu 1000 Gewebeproben auf einem Empfängerblock zusammengestellt werden können <sup>85</sup>. Dadurch sind bei den Antikörperfärbungen die Ergebnisse zwischen den verschiedenen Gewebeproben auf dem TMA gut und direkt lokal vergleichbar. Darüber hinaus bleibt für möglicherweise notwendige, anschließende Ganzschnittfärbungen der Tumorblock weitestgehend unverändert, sodass wichtige Färbungen am Ganzschnitt wiederholt werden können <sup>75</sup>.

#### 4.5 Aussichten

Da die L1-CAM Expression in Karzinomen anderer Organe ebenfalls mit erhöhter Zellmigration, Invasion, Tumorwachstum, Metastasierung und Chemotherapieresistenz in Verbindung gebracht wird, könnte L1-CAM in Zukunft als spezifisches Antigen für therapeutische Strategien in der Immunonkologie dienen <sup>58</sup>. Studien am Mausmodell mit Anwendung von gezielten Antikörpertherapien gegen L1-CAM an Ovarialkarzinomen legen nahe, dass die gezielte Bekämpfung L1-CAM positiver Zellen zu einer geringeren Tumorprogression und verminderter Aszitesbildung führt <sup>86,87</sup>. Ähnliche Ergebnisse wurden mit CAR-T-Zellen (Chimeric Antigen Receptor T-Zellen: gentechnisch veränderte T-Zellen mit synthetischen antigenspezifischen Rezeptoren) mit einem für das L1-CAM-Epitop CE7 spezifischen Rezeptor erzielt <sup>59</sup>. In vitro konnte eine Lyse der L1-CAM positiven Ovarialkarzinomzellkulturen bei Zugabe dieser CAR-T-Zellen beobachtet werden <sup>59</sup>. Es wird davon ausgegangen, dass auch Antikörper-Drug-Konjugate bei L1-CAM zukünftig eine therapeutische Möglichkeit bieten könnten <sup>58</sup>, indem selektiv L1-CAM positive Zellen durch den Antikörper erkannt und mit der zytotoxischen Komponente des Konjugats angegriffen werden können <sup>75</sup>.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass L1-CAM positive Tumore unter den MOC einen aggressiveren Tumortyp mit höherer Rezidivneigung darstellen und von diesen neuen Therapiestrategien profitieren könnten <sup>75</sup>.

#### **4.6 Schlussfolgerung**

Vor allem zeigt diese Studie, dass sich L1-CAM auch bei MOC teilweise als Prognosefaktor eignet. Mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 59.4% bietet der Marker in unserer Studie die Möglichkeit, Patientinnen ohne Rezidivrisiko herauszufiltern. Aufgrund der hohen Falsch-Positiv-Rate von 65% sollte L1-CAM jedoch nicht verwendet werden, um eine Prognose über das Auftreten eines Rezidivs zu stellen <sup>75</sup>.

Bei MBOT können die Risikomarker L1-CAM, HER2 und p53 Indikatoren dafür sein, dass möglicherweise an einer Stelle bereits ein invasives Wachstum vorliegt oder der Tumor kurz davor ist in ein Karzinom überzugehen. Daher können diese Marker in der pathologischen Routine bei der Entscheidung helfen, ob ein MBOT noch genauer auf ein MOC untersucht werden sollte <sup>75</sup>.



## 5 Zusammenfassung

**Zielsetzung:** Muzinöse Ovarialkarzinome (MOC) stellen einen seltenen Histotyp primärer Ovarialkarzinome dar. Sie gehören zu den Typ I epithelialen Ovarialkarzinomen, welche sich schrittweise aus benignen Kystadenomen, über Borderlinetumore zu Karzinomen entwickeln. Zu den häufigen pathogenetischen molekularen Veränderungen gehören Mutationen in *KRAS*, *TP53* und *ERBB2*. Eine prognostische Bedeutung dieser Marker konnte bislang nicht festgestellt werden. Man geht jedoch davon aus, dass Mutationen in *TP53* und *ERBB2* eher spät im Verlauf der Pathogenese auftreten, da sie häufiger bei MOC als bei muzinösen Borderline-Tumoren (MBOT) beobachtet werden. L1-CAM, ein neuronales Zelladhäsionsmolekül, hat bereits bei anderen epithelialen Tumoren des weiblichen Genitaltrakts und Tumoren mit ähnlichen pathogenetischen Veränderungen, wie dem Kolonkarzinom, prognostische Relevanz gezeigt. In dieser Arbeit wollten wir herausfinden, ob sich die L1-CAM Expression bei MOC als Prognosemarker eignet. Dieser Marker wurde bisher noch nicht an einem gut klassifizierten Kollektiv aus MOC überprüft. Darüber hinaus wollten wir die L1-CAM Expression in MBOT mit und ohne angrenzendes MOC untersuchen, um eine mögliche Rolle von L1-CAM in der Pathogenese und Progression von MOC zu identifizieren und diese im Zusammenhang mit bereits bekannten Progressionsmarkern (p53 und HER2) diskutieren.

**Methoden:** Wir erstellten ein Kollektiv aus 39 gut charakterisierten, morphologisch und immunhistochemisch überprüften MOC. Wir untersuchten diese Kohorte mittels Immunhistochemie an Tissue Microarrays und Ganzschnitten und verglichen die Expression mit vorliegenden klinisch-pathologischen Daten. Die L1-CAM Positivität wurde als jegliche (auch Einzelzell-) Positivität definiert. Außerdem erstellten wir ein Kollektiv aus 16 reinen MBOT. Wir verglichen diese mit 20 an MOC angrenzenden MBOT-Regionen hinsichtlich der L1-CAM Expression und der bereits für Tumorprogression bekannten molekularen Alterationen, der p53 Aberration und der HER2 Überexpression.

**Ergebnisse:** Die L1-CAM Expression in MOC war signifikant mit einem Rezidiv assoziiert. In 7/20 positiven Fällen kam es zu einem Rezidiv gegenüber 0/19 L1-CAM negativen Fällen ( $p=0.032$ ), mit einem signifikanten Unterschied in der Time-To-Progression ( $p=0.028$ ). Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen der L1-CAM Expression und den untersuchten klinisch-pathologischen Daten (Alter bei Diagnose, Vitalstatus, Tumorstadium, Wuchsmuster, Grading, p53 Aberration, HER2 Überexpression) feststellen. Im Kollektiv der MBOT beobachteten wir, dass alle 3 L1-CAM positiven MBOT an anderer Stelle bereits invasiv wuchsen (nicht signifikant). Ferner konnten wir im Vergleich zu den reinen MBOT eine signifikante Zunahme der p53 Aberrationsrate bei den MBOT-Regionen mit benachbartem Karzinom feststellen ( $p=0.048$ ). Durch Hinzunahme von L1-CAM Positivität und HER2 Überexpression konnte eine Sensitivität von 70% (14/20) erreicht werden, eine MOC-benachbarte MBOT-Region im Kollektiv der MBOT zu erkennen.

**Schlussfolgerung:** Die Expression des Tumormarkers L1-CAM anhand von mindestens Einzelzellpositivität wird bei MOC häufig (51%) beobachtet und zeigt einen Zusammenhang mit einem Tumorrezidiv. Durch eine gute Sensitivität (100%), aber eine geringe Spezifität (59,4%) des Markers bezüglich eines Rezidivrisikos eignet er sich mäßig, um MOC mit hohem Rezidivrisiko zu erkennen. Jedoch kann das Fehlen von L1-CAM zur Identifizierung von Fällen mit einem geringen Rezidivrisiko dienen. Darüber hinaus ist das Vorhandensein spezifischer molekularer Veränderungen (L1-CAM, p53, HER2) in MBOT mit bereits vorliegendem benachbartem Karzinom assoziiert und diese können potenzielle Pfade in der Tumorprogression definieren. Klinisch und pathologisch können diese Marker bei der Entscheidung helfen, ob man in einem MBOT noch genauer nach einem bereits invasiven MOC suchen sollte.

## 6 Literaturverzeichnis

1. e.V. RK-IudGdeKiD. Krebs in Deutschland 2015/2016, ICD-10. 2019.
2. Coburn SB, Bray F, Sherman ME, Trabert B. International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype. *Int J Cancer*. 2017;140(11):2451-2460.
3. Kurman RJ, Shih Ie M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol*. 2016;186(4):733-747.
4. Peres LC, Cushing-Haugen KL, Köbel M, et al. Invasive Epithelial Ovarian Cancer Survival by Histotype and Disease Stage. *J Natl Cancer Inst*. 2019;111(1):60-68.
5. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 10:x16-x21.
6. Labidi-Galy SI, Papp E, Hallberg D, et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat Commun*. 2017;8(1):1093.
7. Gilks CB, Prat J. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum Pathol*. 2009;40(9):1213-1223.
8. Gates MA, Rosner BA, Hecht JL, Tworoger SS. Risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic subtype. *Am J Epidemiol*. 2010;171(1):45-53.
9. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. 2019.
10. Staebler A, Mayr D. Update der S3-Leitlinie für maligne Ovarialtumoren 2016. *Der Pathologe*. 2017;38(4):331-344.
11. Trimbos B, Timmers P, Pecorelli S, et al. Surgical staging and treatment of early ovarian cancer: long-term analysis from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(13):982-987.
12. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, et al. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(2):113-125.
13. Bamias A, Sotiropoulou M, Zagouri F, et al. Prognostic evaluation of tumour type and other histopathological characteristics in advanced epithelial ovarian cancer, treated with surgery and paclitaxel/carboplatin chemotherapy: cell type is the most useful prognostic factor. *Eur J Cancer*. 2012;48(10):1476-1483.

14. Seidman JD, Ronnett BM, Shih I-M, Cho KR, Kurman RJ. Epithelial Tumors of the Ovary. In: *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. 2019:841-966.
15. Seidman JD, Kurman RJ, Ronnett BM. Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(7):985-993.
16. Perren TJ. Mucinous epithelial ovarian carcinoma. *Ann Oncol*. 2016;27 Suppl 1:i53-i57.
17. Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Haiba M, Boice CR, Kurman RJ, Ronnett BM. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *Int J Gynecol Pathol*. 2004;23(1):41-44.
18. Babaier A, Ghatage P. Mucinous Cancer of the Ovary: Overview and Current Status. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(1):52.
19. Birnkrant A, Sampson J, Sugarbaker PH. Ovarian metastasis from colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1986;29(11):767-771.
20. Burt CV. Prophylactic oophorectomy with resection of the large bowel for cancer. *Am J Surg*. 1951;82(5):571-577.
21. Cutait R, Lesser ML, Enker WE. Prophylactic oophorectomy in surgery for large-bowel cancer. *Dis Colon Rectum*. 1983;26(1):6-11.
22. Dundr P, Singh N, Nožičková B, Němejcová K, Bártů M, Stružinská I. Primary mucinous ovarian tumors vs. ovarian metastases from gastrointestinal tract, pancreas and biliary tree: a review of current problematics. *Diagn Pathol*. 2021;16(1):20.
23. Yoshida H, Tanaka H, Tsukada T, et al. Gross mucinous multinodular appearance aids in the identification of ovarian metastases in low-grade appendiceal mucinous neoplasms during intraoperative consultation. *Ann Diagn Pathol*. 2021;50:151641.
24. Ronnett BM, Shmookler BM, Sugarbaker PH, Kurman RJ. Pseudomyxoma peritonei: new concepts in diagnosis, origin, nomenclature, and relationship to mucinous borderline (low malignant potential) tumors of the ovary. *Anat Pathol*. 1997;2:197-226.
25. Cheasley D, Wakefield MJ, Ryland GL, et al. The molecular origin and taxonomy of mucinous ovarian carcinoma. *Nat Commun*. 2019;10(1):3935.
26. Muyldermans K, Moerman P, Amant F, Leunen K, Neven P, Vergote I. Primary invasive mucinous ovarian carcinoma of the intestinal type:

- importance of the expansile versus infiltrative type in predicting recurrence and lymph node metastases. *Eur J Cancer*. 2013;49(7):1600-1608.
27. Lee KR, Scully RE. Mucinous tumors of the ovary: a clinicopathologic study of 196 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas, including an evaluation of 11 cases with 'pseudomyxoma peritonei'. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(11):1447-1464.
  28. Busca A, Nofech-Mozes S, Olkhov-Mitsel E, et al. Histological grading of ovarian mucinous carcinoma - an outcome-based analysis of traditional and novel systems. *Histopathology*. 2020;77(1):26-34.
  29. Genestie C, Auguste A, Al Battal M, et al. Histological classification of mucinous ovarian tumors: inter-observer reproducibility, clinical relevance, and role of genetic biomarkers. *Virchows Arch*. 2021;478(5):885-891.
  30. Huin M, Lorenzini J, Arbion F, et al. Presentation and Prognosis of Primary Expansile and Infiltrative Mucinous Carcinomas of the Ovary. *J Clin Med*. 2022;11(20):6120.
  31. Kelemen LE, Kobel M. Mucinous carcinomas of the ovary and colorectum: different organ, same dilemma. *Lancet Oncol*. 2011;12(11):1071-1080.
  32. Wang Y, Schwartz LE, Anderson D, et al. Molecular analysis of ovarian mucinous carcinoma reveals different cell of origins. *Oncotarget*. 2015;6(26):22949-22958.
  33. Seidman JD, Khedmati F. Exploring the histogenesis of ovarian mucinous and transitional cell (Brenner) neoplasms and their relationship with Walthard cell nests: a study of 120 tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(11):1753-1760.
  34. Wang Y, Wu RC, Shwartz LE, et al. Clonality analysis of combined Brenner and mucinous tumours of the ovary reveals their monoclonal origin. *J Pathol*. 2015;237(2):146-151.
  35. Simons M, Simmer F, Bulten J, et al. Two types of primary mucinous ovarian tumors can be distinguished based on their origin. *Mod Pathol*. 2020;33(4):722-733.
  36. Mackenzie R, Kommos S, Winterhoff BJ, et al. Targeted deep sequencing of mucinous ovarian tumors reveals multiple overlapping RAS-pathway activating mutations in borderline and cancerous neoplasms. *BMC Cancer*. 2015;15:415.

37. Mueller JJ, Schlappe BA, Kumar R, et al. Massively parallel sequencing analysis of mucinous ovarian carcinomas: genomic profiling and differential diagnoses. *Gynecol Oncol*. 2018;150(1):127-135.
38. Bassiouny D, Ismiil N, Dubé V, et al. Comprehensive Clinicopathologic and Updated Immunohistochemical Characterization of Primary Ovarian Mucinous Carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2018;26(4):306-317.
39. Vang R, Gown AM, Barry TS, et al. Cytokeratins 7 and 20 in primary and secondary mucinous tumors of the ovary: analysis of coordinate immunohistochemical expression profiles and staining distribution in 179 cases. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(9):1130-1139.
40. Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, et al. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2004;17(11):1392-1399.
41. Groisman GM, Meir A, Sabo E. The value of Cdx2 immunostaining in differentiating primary ovarian carcinomas from colonic carcinomas metastatic to the ovaries. *Int J Gynecol Pathol*. 2004;23(1):52-57.
42. Vang R, Gown AM, Zhao C, et al. Ovarian mucinous tumors associated with mature cystic teratomas: morphologic and immunohistochemical analysis identifies a subset of potential teratomatous origin that shares features of lower gastrointestinal tract mucinous tumors more commonly encountered as secondary tumors in the ovary. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(6):854-869.
43. Vang R, Gown AM, Farinola M, et al. p16 expression in primary ovarian mucinous and endometrioid tumors and metastatic adenocarcinomas in the ovary: utility for identification of metastatic HPV-related endocervical adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(5):653-663.
44. Li J, Poi MJ, Tsai MD. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry*. 2011;50(25):5566-5582.
45. Kobel M, Rahimi K, Rambau PF, et al. An Immunohistochemical Algorithm for Ovarian Carcinoma Typing. *Int J Gynecol Pathol*. 2016;35(5):430-441.
46. Hwang H, Quenneville L, Yaziji H, Gown AM. Wilms tumor gene product: sensitive and contextually specific marker of serous carcinomas of ovarian surface epithelial origin. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12(2):122-126.
47. Kandalaft PL, Gown AM, Isacson C. The lung-restricted marker napsin A is highly expressed in clear cell carcinomas of the ovary. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(6):830-836.

48. Vang R, Gown AM, Barry TS, Wheeler DT, Ronnett BM. Immunohistochemistry for estrogen and progesterone receptors in the distinction of primary and metastatic mucinous tumors in the ovary: an analysis of 124 cases. *Mod Pathol*. 2006;19(1):97-105.
49. Heidarpour M, Tavanafar Z. Diagnostic utility of PAX8 in differentiation of mullerian from non-mullerian tumors. *Adv Biomed Res*. 2014;3:96.
50. Anglesio MS, Kommos S, Tolcher MC, et al. Molecular characterization of mucinous ovarian tumours supports a stratified treatment approach with HER2 targeting in 19% of carcinomas. *J Pathol*. 2013;229(1):111-120.
51. Rathjen FG, Schachner M. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J*. 1984;3(1):1-10.
52. Kiefel H, Bondong S, Hazin J, et al. L1CAM: a major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adh Migr*. 2012;6(4):374-384.
53. Djabali M, Mattei MG, Nguyen C, et al. The gene encoding L1, a neural adhesion molecule of the immunoglobulin family, is located on the X chromosome in mouse and man. *Genomics*. 1990;7(4):587-593.
54. Shtutman M, Levina E, Ohouo P, Baig M, Roninson IB. Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 2006;66(23):11370-11380.
55. Herron LR, Hill M, Davey F, Gunn-Moore FJ. The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules. *Biochem J*. 2009;419(3):519-531.
56. Riedle S, Kiefel H, Gast D, et al. Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *Biochem J*. 2009;420(3):391-402.
57. Huszar M, Moldenhauer G, Gschwend V, Ben-Arie A, Altevogt P, Fogel M. Expression profile analysis in multiple human tumors identifies L1 (CD171) as a molecular marker for differential diagnosis and targeted therapy. *Hum Pathol*. 2006;37(8):1000-1008.
58. Altevogt P, Doberstein K, Fogel M. L1CAM in human cancer. *Int J Cancer*. 2016;138(7):1565-1576.
59. Hong H, Brown CE, Ostberg JR, et al. L1 Cell Adhesion Molecule-Specific Chimeric Antigen Receptor-Redirected Human T Cells Exhibit Specific and Efficient Antitumor Activity against Human Ovarian Cancer in Mice. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146885.

60. Chen J, Gao F, Liu N. L1CAM promotes epithelial to mesenchymal transition and formation of cancer initiating cells in human endometrial cancer. *Exp Ther Med.* 2018;15(3):2792-2797.
61. Stoeck A, Gast D, Sanderson MP, Issa Y, Gutwein P, Altevogt P. L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol.* 2007;104(2):461-469.
62. Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, et al. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol.* 2005;168(4):633-642.
63. Daponte A, Kostopoulou E, Kollia P, et al. L1 (CAM) (CD171) in ovarian serous neoplasms. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2008;29(1):26-30.
64. Kiefel H, Bondong S, Erbe-Hoffmann N, et al. L1CAM-integrin interaction induces constitutive NF-kappaB activation in pancreatic adenocarcinoma cells by enhancing IL-1beta expression. *Oncogene.* 2010;29(34):4766-4778.
65. Kiefel H, Bondong S, Pfeifer M, et al. EMT-associated up-regulation of L1CAM provides insights into L1CAM-mediated integrin signalling and NF-kappaB activation. *Carcinogenesis.* 2012;33(10):1919-1929.
66. Gavert N, Ben-Shmuel A, Lemmon V, Brabletz T, Ben-Ze'ev A. Nuclear factor-kappaB signaling and ezrin are essential for L1-mediated metastasis of colon cancer cells. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 12):2135-2143.
67. Cheriyaundath S, Basu S, Haase G, et al. ISG15 induction is required during L1-mediated colon cancer progression and metastasis. *Oncotarget.* 2019;10(67):7122-7131.
68. Kiefel H, Pfeifer M, Bondong S, Hazin J, Altevogt P. Linking L1CAM-mediated signaling to NF-kappaB activation. *Trends Mol Med.* 2011;17(4):178-187.
69. Gast D, Riedle S, Issa Y, et al. The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies. *Oncogene.* 2008;27(9):1281-1289.
70. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442-454.
71. Lund K, Dembinski JL, Solberg N, Urbanucci A, Mills IG, Krauss S. Slug-dependent upregulation of L1CAM is responsible for the increased invasion potential of pancreatic cancer cells following long-term 5-FU treatment. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123684.



72. Doberstein K, Milde-Langosch K, Bretz NP, et al. L1CAM is expressed in triple-negative breast cancers and is inversely correlated with androgen receptor. *BMC Cancer*. 2014;14:958.
73. Doberstein K, Wieland A, Lee SB, et al. L1-CAM expression in ccRCC correlates with shorter patients survival times and confers chemoresistance in renal cell carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2011;32(3):262-270.
74. Kato K, Maesawa C, Itabashi T, et al. DNA hypomethylation at the CpG island is involved in aberrant expression of the L1 cell adhesion molecule gene in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2009;35(3):467-476.
75. Wiedenhofer R, Schmoeckel E, Grube M, et al. L1-CAM in Mucinous Ovarian Carcinomas and Borderline Tumors: Impact on Tumor Recurrence and Potential Role in Tumor Progression. *Am J Surg Pathol*. 2023: Published ahead of print.
76. Chelariu-Raicu A, Holley E, Mayr D, et al. A combination of immunohistochemical markers, MUC1, MUC5AC, PAX8 and growth pattern for characterization of mucinous neoplasm of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*. 2022;32(5):662-668.
77. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997-4013.
78. Pham DL, Scheble V, Bareiss P, et al. SOX2 expression and prognostic significance in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2013;32(4):358-367.
79. Woodbeck R, Kelemen LE, Köbel M. Ovarian Endometrioid Carcinoma Misdiagnosed as Mucinous Carcinoma: An Underrecognized Problem. *Int J Gynecol Pathol*. 2019;38(6):568-575.
80. Chen S, Dai X, Gao Y, Shen F, Ding J, Chen Q. The positivity of estrogen receptor and progesterone receptor may not be associated with metastasis and recurrence in epithelial ovarian cancer. *Sci Rep*. 2017;7(1):16922.
81. Bondong S, Kiefel H, Hielscher T, et al. Prognostic significance of L1CAM in ovarian cancer and its role in constitutive NF- $\kappa$ B activation. *Ann Oncol*. 2012;23(7):1795-1802.
82. Gorringe KL, Cheasley D, Wakefield MJ, et al. Therapeutic options for mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2020;156(3):552-560.
83. Schmoeckel E, Kirchner T, Mayr D. SATB2 is a supportive marker for the differentiation of a primary mucinous tumor of the ovary and an ovarian

metastasis of a low-grade appendiceal mucinous neoplasm (LAMN): A series of seven cases. *Pathol Res Pract*. 2018;214(3):426-430.

84. Meagher NS, Wang L, Rambau PF, et al. A combination of the immunohistochemical markers CK7 and SATB2 is highly sensitive and specific for distinguishing primary ovarian mucinous tumors from colorectal and appendiceal metastases. *Mod Pathol*. 2019;32(12):1834-1846.
85. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Biotechniques*. 2004;36(1):98-105.
86. Arlt MJ, Novak-Hofer I, Gast D, et al. Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment. *Cancer Res*. 2006;66(2):936-943.
87. Wolterink S, Moldenhauer G, Fogel M, et al. Therapeutic antibodies to human L1CAM: functional characterization and application in a mouse model for ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2010;70(6):2504-2515.
88. Meagher NS, Gorringer KL, Wakefield M, et al. Gene-Expression Profiling of Mucinous Ovarian Tumors and Comparison with Upper and Lower Gastrointestinal Tumors Identifies Markers Associated with Adverse Outcomes. *Clin Cancer Res*. 2022;28(24):5383-5395.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

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

Die Konzeption der Studie und die wissenschaftliche Leitung erfolgte durch Frau Prof. Dr. med. Annette Staebler in Zusammenarbeit mit Dr. Anna Katharina Fischer-Straub.

Das Tübinger Patientinnenkollektiv der muzinösen Ovarialkarzinome wurde von mir eigenständig zusammengestellt. Ein vorhandenes Patientinnenkollektiv aus muzinösen Borderlinetumoren, welches durch Frau Dr. med. Anna Katharina Fischer-Straub erstellt worden ist, wurde von mir mit weiteren Patientinnen ergänzt. Die dazugehörigen klinischen Daten habe ich von der Universitätsfrauenklinik Tübingen durch Dr. med. Marcel Grube (AG Prof. Kommos) erhalten. Das Münchener Kollektiv mit den uns zugesandten Leerschnitten wurde in der Pathologie der LMU München durch Frau PD Dr. med. Elisa Schmoeckel und Frau Prof. Dr. med. Doris Mayr erstellt und verwaltet.

Das Archivmaterial wurde von mir, mit Unterstützung von Frau Karen Greif und Frau Christine Beschorner verwaltet. Sämtliche Schnitte von Tumorblöcken wurden nach Einarbeitung von Frau Karen Greif und Frau Christine Beschorner von mir eigenständig geschnitten.

Die TMAs wurden von Christine Beschorner und mir erstellt und verwaltet und von Christine Beschorner angeschnitten.

Sämtliche HE-Färbungen wurden durch das Routinelabor der Pathologie Tübingen ausgeführt. Die immunhistochemische Färbungen wurden von Frau Karen Greif ausgeführt.

Die histologischen Schnitte und immunhistochemische Färbungen für diese Arbeit wurden von mir gesichtet und ausgewertet und danach unabhängig von Frau Prof. Dr. med. Annette Staebler überprüft.

Die FISH-Analyse wurde durch Frau Dr. med. Anna Katharina Fischer und Frau Annette Barbara Mankel durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich und Dr. Dr. med. Mihály Sulyok mit Beratung von Frau Prof. Dr. med. Annette Staebler.

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

Tübingen, den 10.03.2023

---

## 8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits veröffentlicht:

Wiedenhofer R, Schmoeckel E, Grube M, et al. L1-CAM in Mucinous Ovarian Carcinomas and Borderline Tumors: Impact on Tumor Recurrence and Potential Role in Tumor Progression [published online ahead of print, 2023 Feb 28]. *Am J Surg Pathol*. 2023;10.1097/PAS.0000000000002027. doi:10.1097/PAS.0000000000002027<sup>75</sup>

Außerdem sind Daten des MOC Kollektivs in folgende Studie miteingegangen, die bereits veröffentlicht worden ist.

Meagher NS, Gorringer KL, Wakefield M, et al. Gene-Expression Profiling of Mucinous Ovarian Tumors and Comparison with Upper and Lower Gastrointestinal Tumors Identifies Markers Associated with Adverse Outcomes. *Clin Cancer Res*. 2022;28(24):5383-5395. doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-1206<sup>88</sup>

## 9 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Annette Staebler, die unzählige Stunden mit mir Schnitte und Färbungen unserer Kollektive angesehen hat und mich in der Auswertung und dem Prozess der Publikation dieser Daten maßgeblich unterstützt und vor allem sehr motiviert hat.

Außerdem möchte ich dem Ärztlichen Direktor des Instituts für Pathologie, Herrn Prof. Dr. med. Falko Fend, und meiner Betreuerin Frau Dr. med. Anna Katharina Fischer-Straub für die konstruktive Kritik an dieser Studie und dessen Publikation danken. Herrn Dr. Dr. med. Mihály Sulyok möchte ich für seine Mithilfe an der statistischen Auswertung der Daten ebenfalls besonders danken.

Ohne die Einarbeitung in die Prozesse und Methoden des Labors durch Karen Greif und Christine Beschorner und die durch sie vermittelte positive Arbeitsstimmung, wäre mir diese Arbeit deutlich schwerer gefallen. Vielen Dank, euch beiden!

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern, die Teile der Arbeit Korrektur gelesen haben und jeden errungenen Meilenstein mit mir gefeiert haben.

Zum Schluss danke ich Felix, der mich schon bei der Suche nach einer Promotionsarbeit stets ermutigt hat und mich dann während meiner Arbeit immer motiviert hat weiterzumachen.