

Untersuchungen zum Immunmilieu und zur Expression von PD-L1 im *high grade* serösen Ovarialkarzinom und seinen Metastasen

Janna Nikonov

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Marion B. Kiechle
2. Prof. Dr. Julia Jellusova

Die Dissertation wurde am 19.04.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 01.05.2025 angenommen.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	2
2	Abkürzungsverzeichnis	4
3	Einleitung	6
3.1	Epidemiologie.....	6
3.2	Risikofaktoren.....	7
3.3	Klinische Präsentation und Diagnostik.....	7
3.4	FIGO-Stadien.....	8
3.5	Histologische Einteilung.....	9
3.6	Metastasierung	9
3.7	Prognostische Faktoren.....	11
3.8	Antitumorale Immunantwort / „Immunoediting“	12
3.9	CD3-positive T-Zellen.....	13
3.10	CD8-positive T-Zellen (Zytotoxische T-Zellen).....	14
3.11	Regulatorische T-Zellen (Tregs) und FOXP3.....	15
3.12	Weitere TILs	16
3.13	Immuncheckpointproteine	16
3.14	Vergleich des Immunmilieus zwischen Ovarialtumor und Metastasen.....	17
3.15	Aktueller Therapiestandard.....	18
3.16	Immuntherapie	19
4	Fragestellung und Zielsetzung.....	20
5	Material und Methoden	21
5.1	Patientinnenkollektiv – Zusammenstellung.....	21
5.2	Patientinnenkollektiv – Klinische Daten	24
5.3	Immunhistochemische Färbungen	25
5.4	Histologische Evaluation	27
5.5	Statistische Auswertung.....	32
5.6	Übersichtstabellen aller verwendeten Materialien und Geräte	36
6	Ergebnisse	38
6.1	Deskriptive Übersicht über die Anteile exprimierender Zellen der untersuchten Immun-Marker.....	38
6.2	Univariate Überlebenszeitanalyse.....	43
6.3	Zusammenhang zwischen den Anteilen exprimierender Zellen der unterschiedlichen Immun-Marker an den jeweiligen Lokalisationen	61

6.4	Zusammenhang der Anteile exprimierender Zellen der untersuchten Immun-Marker zwischen den jeweiligen Lokalisationen	62
6.5	Heterogenitätsindex	71
6.6	Immunologischer Typ nach Teng	72
6.7	CD8/FOXP3-Ratio.....	74
7	Diskussion	78
8	Zusammenfassung.....	90
9	Anhang	91
9.1	Protokoll Hämalaun/Eosin - Färbung	92
9.2	Färbeprotokoll PD-L1 Original.....	93
9.3	Färbeprotokoll weitere Biomarker Original.....	97
10	Tabellenverzeichnis.....	100
11	Abbildungsverzeichnis	101
12	Literaturverzeichnis.....	103
13	Danksagung	116

2 Abkürzungsverzeichnis

in Abh.	in Abhängigkeit
abs.	absolut
Aqua Dest.	Destilliertes Wasser
CD3	CD3-Rezeptor, <i>Cluster of Differentiation 3</i>
CD8	CD8-Rezeptor, <i>Cluster of Differentiation 8</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FOXP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
HGSOC	<i>High-Grade</i> seröses Ovarialkarzinom
HT	Haupttumor
IHC	Immunhistochemie
MHC-I	<i>Major Histocompatibility Complex I</i>
Min.	Minute(n)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OM	Omentum majus (-Metastase)
OS	<i>Overall Survival</i> / Gesamtüberleben
PARP(-Inhibitor)	Poly-ADP-Ribose-Polymerase(-Inhibitor)
PD-1	<i>Programmed-Death(-Rezeptor) 1</i>
PD-L1	<i>Programmed-Death-Ligand 1</i>
PFS	<i>Progression Free Survival</i> / Progressionsfreies Überleben

PE	Peritoneum (-Metastase)
rel.	relativ
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i> , TBS-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TMA	<i>Tissue Micro Array</i>
TMB	<i>Tumor Mutational Burden</i> / Tumormutationslast
Tr.	Tropfen
Treg(s)	regulatorische T-Zelle(n)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UICC	Union Internationale contre le Cancer
VAT	<i>Visceral adipose tissue</i> , Viszeralfett

3 Einleitung

Trotz der seit etwa 20 Jahren abnehmenden Inzidenz kommt dem Ovarialkarzinom aufgrund der schlechten Prognose und hohen Letalität weiterhin eine große Bedeutung innerhalb der gynäkologischen Onkologie zu (Sopik et al., 2015). Da sowohl Früherkennungsmaßnahmen wirkungslos als auch die therapeutischen Möglichkeiten limitiert sind, besteht ein Bedarf an der Entwicklung und Optimierung neuer Behandlungsansätze. Die Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren ist seit Jahren in klinischer Erprobung, bislang allerdings mit eher ernüchternden Ergebnissen (Bronger, 2021). Aus diesem Grund kommt der Identifikation von prädiktiven Parametern, wie etwa der Expression von Zielstrukturen und Biomarkern zur Charakterisierung des Immunmilieus, eine besondere Bedeutung zu (James et al., 2022). Hierbei konzentrieren sich viele wissenschaftliche Untersuchungen auf den Primärtumor am Ovar. Da die Metastasen, insbesondere am Peritoneum, allerdings das eigentliche klinische Problem darstellen, gilt es, diese mehr und mehr in den Fokus der (Biomarker-) Forschung einzubeziehen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Immunmilieu in verschiedenen Metastasenlokalisationen beim *high-grade* serösen Ovarialkarzinom vergleichend zu beschreiben und seine prognostische Bedeutung herauszuarbeiten.

3.1 Epidemiologie

Im Laufe ihres Lebens erkrankt in Deutschland etwa eine von 76 Frauen an Eierstockkrebs. Damit ist dies die achthäufigste Tumorentität und die fünfhäufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen (Buttmann-Schweiger & Kraywinkel, 2019). Die häufigste histologische Unterform, das seröse Adenokarzinom, betrifft vorwiegend ältere Patientinnen. Die Erkrankungsrate nimmt bis zum Alter von 85 Jahren zu, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren („Krebs in Deutschland für 2017/2018, 3.21 Eierstöcke“, 2017). Die Inzidenz lag in Deutschland im Jahr 2018 bei 10,7/100.000 (altersstandardisiert). Weltweit ist die Inzidenz mit 6,6/100.000 pro Jahr etwas geringer, ein geografischer Schwerpunkt liegt in Mittel- und Osteuropa (Ferlay et al., 2020; P. M. Webb & Jordan, 2017). Die schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 42% bedingt sich unter anderem durch die frühe und meistens ausgedehnte Metastasierung, die unspezifische Symptomatik und das Fehlen geeigneter Präventionsmöglichkeiten. Damit einhergehend wird die Diagnose oft erst in fortgeschrittenem

Stadium gestellt: ca. drei Viertel der Fälle sind bei Diagnosestellung bereits im FIGO-Stadium III oder IV, zeigen also bereits eine Metastasierung innerhalb der Bauchhöhle oder sogar Fernmetastasen (Bankhead et al., 2005).

3.2 Risikofaktoren

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist multifaktoriell und daher oftmals nicht endgültig geklärt. Als gesicherte Risikofaktoren gelten Alter, Übergewicht sowie hormonelle Faktoren. Eine Hormonersatztherapie mit Östrogenmonopräparaten erhöht die Erkrankungswahrscheinlichkeit („Krebs in Deutschland für 2017/2018, 3.21 Eierstöcke“, 2017). Kinderlosigkeit, frühe Menarche und späte Menopause gehen mit einer erhöhten Anzahl an Ovulationen einher und erhöhen sehr wahrscheinlich dadurch das Erkrankungsrisiko, während häufige Schwangerschaften und lange Stillperioden sowie eine operative Tubenligatur und vor allem die Einnahme von Ovulationshemmern das Risiko senken (Sopik et al., 2015). Insbesondere letzteres scheint ein wesentlicher Grund für den Rückgang der Inzidenz in den letzten zwei Jahrzehnten zu sein (Ferlay et al., 2020).

Eine positive Familienanamnese, auch für Brustkrebs, kann auf eine genetische Prädisposition hinweisen (Jones et al., 2017). Bei bis zu einem Viertel der Patientinnen lassen sich mit Ovarialkarzinom assoziierte Genveränderungen finden. Das durchschnittliche Erkrankungsalter ist in dieser Risikogruppe geringer (Meindl et al., 2013a). Hierbei spielen vor allem Mutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* eine Rolle, die außerdem für die Therapieentscheidung relevant sind (Wooster & Weber, 2003). Ebenso ist das HNPCC-Syndrom mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms verbunden. In diesen Risikogruppen wird die Erwägung einer prophylaktische Adnexektomie empfohlen (Chene et al., 2015; Meindl et al., 2013).

3.3 Klinische Präsentation und Diagnostik

Meistens zeigen sich in frühen Stadien keine Symptome. Bei fortgeschrittener Erkrankung führt vor allem die Tumorausdehnung zu unspezifischen Symptomen. Klassisch sind abdominelle Beschwerden wie Übelkeit, Völlegefühl, Stuhlnunregelmäßigkeiten und Schmerzen, die bei

Befall des Omentum majus auch besonders den Oberbauch betreffen können (Cannistra, 2004). Das „Pseudo-Meigs-Syndrom“ beschreibt das Vorhandensein maligner Ergüsse in Form von Aszites oder Pleuraergüssen beim Ovarialkarzinom. Aszites kann mit einer Bauchumfangsvermehrung einhergehen, Pleuraergüsse können zu Dyspnoe führen. Eine Tumorkachexie ist häufig (Balogun et al., 2012).

Ein klinischer Verdacht kann durch transvaginale Sonografie erhärtet werden (Shetty, 2019). Als Screening ist sie jedoch ungeeignet. Der Tumormarker CA-125 ist zwar in mehr als 80% der Fälle erhöht, eignet sich aber aufgrund unzureichender Spezifität und Sensitivität allenfalls als Verlaufsparemeter und nicht zum Screening oder zur endgültigen Diagnosestellung (Kobayashi et al., 2008; Menon et al., 2009). Eine transkutane Biopsie wird nicht empfohlen, da die Gefahr einer iatrogenen Streuung besteht. Die definitive Diagnose kann in der Regel nur durch eine Operation mit histologischer Sicherung gestellt werden (Cannistra, 2004).

3.4 FIGO-Stadien

Die Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms erfolgt nach dem TNM-System der UICC (Union Internationale contre le Cancer) und der Einteilung der FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique). Die neueste Auflage der FIGO-Klassifikation von 2014 nach Höhn fasst Karzinome von Ovar, Tube und Peritoneum zusammen (Höhn et al., 2014). Der Einteilung kommt eine hohe prognostische Bedeutung zu, die 5-Jahres-Überlebensrate reicht von bis zu 90% in Stadium I bis unter 10% in Stadium IV (Natarajan et al., 2018).

Tabelle 1: FIGO-Klassifikation (2014)

TNM		FIGO		Anatomische Ausbreitung		
T1	T1a	I	I A	Begrenzung auf Ovarien/Tuben	Kapsel/Serosa intakt, negative Spülzytologie	Auf ein Ovar / eine Tube begrenzt
	T1b		I B			Auf beide Ovarien / Tuben begrenzt
	T1c		I C		Kapsel/Serosa rupturiert oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche oder maligne Zellen in Aszites/Spülzytologie	
T2	T2a	II	II A	Ausbreitung innerhalb des kleinen Beckens oder primäres Peritonealkarzinom	Infiltration von Uterus, Tuben, Ovarien	
	T2b		II B		Infiltration extragenitaler Organe	

T3	T3a	III	III A	Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder Peritonealmetastasen und/oder retroperitoneale Lymphknoten- metastasen	mikroskopisch	IIIA1: ausschließlich regionäre Lymphknotenmetastasen
	T3b		III B			IIIA2: Peritonealmetastasen
	T3c		III C		Makroskopisch, Ausdehnung ≤ 2 cm	
					Makroskopisch, Ausdehnung > 2 cm	
M1		IV	IV A	Fernmetastasen (exklusive Peritonealmetastasen)	Pleuraerguss mit positiver Zytologie und/oder histologischer Sicherung des Pleurabefalls	
			IV B		Parenchymatöse Metastasen der Leber/Milz und extraabdominelle Metastasen einschließlich der inguinalen Lymphknoten und Lymphknoten außerhalb der Bauchhöhle	

3.5 Histologische Einteilung

90% aller malignen Ovarialtumore sind epithelialen Ursprungs. Diese Gruppe wird je nach prädominantem Zelltyp in fünf histologische Subtypen eingeteilt. Den größten Anteil bilden die serösen Ovarialkarzinome mit 50–80%. Hiervon sind wiederum die meisten gering differenziert (*high-grade*), lediglich 5-20% der serösen Ovarialkarzinome werden als *low-grade* eingestuft. Seltener sind endometrioiden (ca. 10 %), klarzellige (10 %) und muzinöse (5 %) Ovarialkarzinome (Stewart et al., 2019). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich ausschließlich auf das *high-grade* seröse Ovarialkarzinom (HGSOC).

3.6 Metastasierung

Der genaue anatomische Ursprung des Ovarialkarzinoms ist umstritten bzw. kann meist nicht geklärt werden (Soong et al., 2019). Insbesondere bei Patientinnen mit *BRCA1/2*-Mutationen werden Frühstadien eher im Epithel der Eileiter gefunden werden, was auf einen Ursprung in tubärem Gewebe hinweisen könnte (Gockley & Elias, 2018). Neben dem Tuben- und Ovarialepithel kann auch das Peritoneum selbst Ursprungsort des *high-grade* serösen Karzinoms sein (Salvador et al., 2009).

Die Metastasierung erfolgt zunächst hauptsächlich in Form einer Peritonealkarzinose. Dabei durchlaufen einzelne Karzinomzellen eine epithelial-mesenchymale Transition und können sich so unter anderem aufgrund eines Verlusts von E-Cadherin leicht aus dem Zellverband lösen

und direkt in die freie Bauchhöhle gelangen. Die so modifizierten Zellen haben hoch proliferative und invasive Eigenschaften und wandern einzeln oder in Clustern durch die physiologische Bewegung von Peritonealflüssigkeit durch die Bauchhöhle (Lengyel, 2010). Verschiedene molekulare Mechanismen führen dazu, dass sich die Zellen schließlich gemäß dem „*Seed and Soil*“-Prinzip an typischen Lokalisationen einnisten, eine mesenchymal-epitheliale Transition durchlaufen und Metastasen bilden (Lengyel, 2010; Mikula-Pietrasik et al., 2018; Motohara et al., 2019). Vorrangig sind dies das Omentum majus sowie die peritonealen Überzüge von Organen des kleinen Beckens und des Oberbauchs, insbesondere Blasendach, kraniale Anteile des Uterus, Colon sigmoideum, Gallenblase, Leber und Milz sowie das Peritoneum des Zwerchfells und intraperitonealer Darmabschnitte (Christian et al., 2020). Es konnte gezeigt werden, dass die Metastasenzellen verhältnismäßig ähnliche Mutationen aufweisen wie die bereits ausgeprägt genetisch aberranten Ovarialtumorzellen (Khalique et al., 2009).

Das Peritoneum ist eine seröse Haut, bestehend aus einer parietalen Schicht, die die Innenflächen der Bauch- und Beckenwand auskleidet und einer viszeralen Schicht, die die Bauchorgane und ihre Aufhängestrukturen bedeckt. Es dient der reibungslosen Verschiebbarkeit der Organe gegeneinander und hat außerdem verschiedene, unter anderem immunologische Funktionen (Kastelein et al., 2019).

Das Omentum majus ist eine beidseits von Peritoneum bedeckte Struktur aus Fett und Bindegewebe, die von der großen Krümmung des Magens und dem Colon transversum ausgehend schürzenartig herabhängt und mit einer Ausdehnung von ca. 15x20cm die Ventralseite der Bauchorgane bis etwa zum Bauchnabel bedeckt (Liebermann-Meffert, 2000). Das Omentum majus beeinflusst durch Resorption und Absorption das Flüssigkeitsgleichgewicht im Peritonealraum, hat metabolische Funktionen und spielt aufgrund der Präsenz zahlreicher Makrophagen und Lymphozyten eine zentrale Rolle für die Immunabwehr in der Bauchhöhle (A. W. Wang et al., 2020). Es dient als Barriere bei lokalisierten Inflammationen und kann somit die Ausbreitung zu einer Peritonitis eindämmen. Zudem werden ihm verschiedene weitere Funktionen und Aktivitäten zugeschrieben, die die Vaskularisation fördern, Entzündungen hemmen und Wundheilung beschleunigen (Meza-Perez & Randall, 2017). Hierbei spielen vor allem sogenannte *Milky spots*, diffus im Omentum verteilte Leukozytenaggregate, eine Rolle. Die zelluläre Zusammensetzung unterscheidet sich hier von sekundären lymphatischen Geweben. Insbesondere finden sich im Vergleich weniger CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, vorherrschend sind B-Lymphozyten und Makrophagen (Rangel-Moreno et al., 2010). Insgesamt findet sich eine einzigartige Zusammensetzung an Immunzellen, wie etwa

VAT (*Visceral Adipose Tissue*)-assoziierte regulatorische T-Zellen (Cipolletta et al., 2014) und angeborene Lymphoidzellen (Brestoff et al., 2015), die auch metabolische Funktionen übernehmen, sowie Natürliche Killerzellen und verschiedene weitere. Diese Zellmischung ist darauf optimiert, die metabolische Homöostase aufrechtzuerhalten und einen Schutz vor Infektionen, insbesondere mit Darmpathogenen, zu gewährleisten (Meza-Perez & Randall, 2017).

Trotz dieser für das Immunsystem gut zugänglichen Umgebung scheint allerdings eine antitumorale Immunantwort im Omentum majus in der Regel unzureichend zu sein, im Gegenteil scheinen die Metastasenzellen insbesondere beim Ovarialkarzinom vorrangig zum Omentum zu translokalisieren und dort angekommen besonders aggressiv zu wachsen (Oosterling et al., 2006). Hier spielen neben chemotaktischer Rekrutierung von Tumorzellen verschiedene weitere Interaktionen eine Rolle. Tumorzellen stimulieren z.B. die Proliferation der omentalen Fibroblasten über den Wachstumsfaktor TGF- β 1, wodurch die Implantation und das Wachstum von Tumorzellen erleichtert wird (Cai et al., 2012). Dennoch ist bekannt, dass maligne Zellen sowohl erkannt als auch bekämpft werden. Es wurde zum Beispiel beschrieben, dass insbesondere zu einem frühen Zeitpunkt der Metastasierung die Milky Spots an Größe und Anzahl zunehmen, ähnlich wie bei einer Exposition gegenüber exogenen Pathogenen. Auch ist bekannt, dass eine Infiltration des Omentum majus mit CD8⁺-Zellen mit einer verbesserten Prognose und die Infiltration mit regulatorischen T-Zellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (siehe Abschnitt TILs in Haupttumor und Metastasen) (Meza-Perez & Randall, 2017).

Der peritoneale Weg ist der vorherrschende Metastasierungsmechanismus, lymphogene und hämatogene Metastasierung kommen jedoch auch vor und spielen durchaus eine klinische Rolle, beispielsweise bei der Bildung von Rezidiven (Barbolina, 2018). In einer Studie konnte bei Patientinnen mit peritoneovenösem Shunt beobachtet werden, dass die über den Shunt in den Blutkreislauf gelangten malignen Zellen tendenziell wieder in das Peritoneum und Omentum absiedeln (Tarin et al., 1984).

3.7 Prognostische Faktoren

Als gesicherte prognostische Faktoren gelten das Alter bei Erkrankungsbeginn, der klinische Allgemeinzustand, das Tumorstadium nach FIGO bei Diagnosestellung, die Menge an Resttumorgewebe nach Resektion, das Vorkommen oder Fehlen von Aszites (Ford et al., 2020)

sowie das Grading und der histologische Subtyp. Seröse und endometrioidale Ovarialkarzinome gehen mit einer günstigeren Prognose einher als muzinöse und klarzellige Ovarialkarzinome (Peres et al., 2019). Die prognostische und prädiktive Bedeutung verschiedener Laborparameter wie CA125, alkalische Phosphatase und Albumin ist ebenfalls lange bekannt (Clark et al., 2001). Eine direkte Untersuchung des Tumorgewebes auf die Expression von etwaigen prognostisch oder prädiktiv relevanten Biomarkern ist wie bei anderen Entitäten in der Vergangenheit ausführlich durchgeführt worden. Insbesondere der Stellenwert immunologischer Marker rückt dabei aufgrund der Entwicklung immunmodulatorischer Therapiekonzepte zunehmend in den Fokus (Clark et al., 2001).

3.8 Antitumorale Immunantwort / „Immunoediting“

Die Effektivität einer antitumoralen Immunantwort unterliegt im Sinne des Immunoeditings dynamischen Veränderungen im Laufe der Zeit. Dabei durchläuft die Immunantwort typischerweise drei Phasen: Elimination, Equilibrium und *Escape* (Dunn et al., 2004). Während der ersten Phase ist die Erkrankung in der Regel noch nicht klinisch apparent. Das Immunsystem erkennt und bekämpft Tumorzellen, dabei spielen eine Vielzahl an zellulären und humoralen Faktoren eine Rolle. Werden in dieser Phase nicht alle malignen Zellen eliminiert, entsteht in der nachfolgenden Phase ein Gleichgewicht zwischen Bekämpfung und Entstehung neuer Tumorzellen, die nun im Sinne einer darwinistischen Selektion eine Art Mikroevolution durchlaufen. Dabei werden zunehmend auch Mutationen angehäuft, die dem Tumor einen Vorteil gegenüber der Immunabwehr verschaffen, sodass sich schließlich in der Escape-Phase diejenigen Tumorzellen unkontrolliert vermehren, die vom Immunsystem schlecht erkannt und bekämpft werden (Dunn et al., 2002).

In allen Phasen spielen sowohl Eigenschaften des Tumors selbst, insbesondere die Mutationslast, als auch Eigenschaften des Immuninfiltrats wie zelluläre Zusammensetzung und Expression verschiedener modulierender Faktoren, beispielsweise von Immun-Checkpoint-Proteinen, eine Rolle (Donnell et al., 2019). Die Tumormutationslast (*Tumor Mutational Burden*, TMB) bezeichnet die Anzahl der (nicht-hereditären) Mutationen pro Million Basen einer untersuchten Genomsequenz und geht einher mit einer erhöhten Zahl an präsentierten Neoantigenen und damit mit einer prinzipiell besseren Erkennbarkeit für das Immunsystem (Riviere et al., 2020). Für das Ovarialkarzinom ist eine verhältnismäßig geringe TMB beschrieben (Bronger, 2021). Vor allem p53-Mutationen spielen hier eine Rolle (Bell et al.,

Das Diagramm zeigt die Interaktion zwischen verschiedenen Immunzellen und einer Tumorepithelzelle. Im Zentrum steht eine Tumorepithelzelle (gelb), die von einer M2-Makrophage (grün) und einer Zytotoxischen T-Zelle (blau) umgeben ist. Die M2-Makrophage exprimiert PD-L1 (grün), das mit PD-1 (grau) auf der Zytotoxischen T-Zelle interagiert. Die Zytotoxische T-Zelle exprimiert CD8 (blau) und CD3 (rot). Die M2-Makrophage exprimiert auch CD3 (rot). Eine Dendritische Zelle (weiß) ist oben links dargestellt und exprimiert MHC I und MHC II. Sie interagiert mit einer T-Helferzelle (lila) über CD4 (schwarz) und CD8 (blau). Die T-Helferzelle exprimiert CD3 (rot). Eine Regulatorische T-Zelle (orange) ist oben rechts dargestellt und exprimiert FOXP3 (gelb) und CD3 (rot). Sie interagiert mit der Zytotoxischen T-Zelle über CD3 (rot) und PD-1 (grau). Eine M1-Makrophage (weiß) ist unten links dargestellt und interagiert mit der Zytotoxischen T-Zelle über PD-1 (grau) und PD-L1 (grün). Die Tumorepithelzelle interagiert mit der M2-Makrophage über PD-1 (grau) und PD-L1 (grün). Die Tumorepithelzelle interagiert auch mit der Zytotoxischen T-Zelle über PD-1 (grau) und PD-L1 (grün). Die Tumorepithelzelle exprimiert auch PD-1 (grau) und PD-L1 (grün).

3.9 CD3-positive T-Zellen

13

die Expression des T-Zell-Rezeptors an der Zelloberfläche induziert und an der Übertragung von Aktivierungssignalen ins Zellinnere mitwirkt (Kuhns et al., 2006). CD3 bzw. das CD3-positive Infiltrat ist bereits lange als prognostischer Marker im Ovarialkarzinom bekannt (Zhang et al., 2003). Es sind prognostisch günstige Zusammenhänge zwischen der Expression mit dem Therapieansprechen (Raspollini et al., 2005) sowie mit dem Überleben (Clarke et al., 2009; Milne et al., 2012; Raspollini et al., 2005; Zhang et al., 2003) beschrieben. Einige Studien ergaben jedoch eine fehlende Assoziation mit dem Überleben (Adams et al., 2009; Sato et al., 2005; Shah et al., 2008). In zwei Studien wurde zwischen der epithelialen und stromalen Infiltration unterschieden und jeweils für erstere ein positiver prognostischer Effekt gefunden, während letztere nicht (Tomšová et al., 2008) oder sogar negativ (Al-Attar et al., 2010) mit dem Überleben assoziiert war. Neben den tumorsuppressiv wirkenden zytotoxischen und T-Helfer-Zellen wird CD3 auch durch regulatorische T-Zellen (Tregs), denen ein Tumorwachstum begünstigender Effekt zugeschrieben wird, exprimiert (Bronger, 2021).

3.10 CD8-positive T-Zellen (Zytotoxische T-Zellen)

Der CD8-Rezeptor (*Cluster of Differentiation 8*, CD8) ist ein auf zytotoxischen T-Zellen exprimierter Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors und spielt durch seine spezifische Bindung an den MHC-I (*Major Histocompatibility Complex I*)-Komplex eine zentrale Rolle für die T-Zell-Reaktion auf intrazelluläre Antigene (de Vries et al., 1989). Zytotoxische T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der antitumoralen Immunabwehr. Sie können direkt zur Zerstörung maligner Zellen führen, beispielsweise indem sie über Granulysin, Perforine und Granzyme, die per Endozytose in die Zielzellen gelangen können, in diesen Membranporen entstehen lassen. Über die Bindung des auf zytotoxischen T-Zellen exprimierten Fas-Liganden an entsprechende Rezeptoren auf den malignen Zielzellen kann in diesen die Apoptose ausgelöst werden (Raskov et al., 2021).

Für das Ovarialkarzinom gilt CD8 als noch robusterer prognostischer Marker als CD3 (Bronger, 2021). In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass eine Infiltration mit CD8-positiven Immunzellen mit einem höheren Tumorstadium und ausgeprägterer Entdifferenzierung (Yildirim et al., 2017), einem verbesserten Ansprechen auf die operative Therapie (Adams et al., 2009) sowie mit einem verbesserten Überleben (Adams et al., 2009; Hamanishi et al., 2007; Leffers et al., 2009; Sato et al., 2005) einhergeht. Man kann auch hier zwischen einer

intratumoralen (epithelialen) und stromalen Infiltration unterscheiden, erstere scheint den größeren prognostischen Wert zu haben (Montfort et al., 2020; Stumpf et al., 2009).

3.11 Regulatorische T-Zellen (Tregs) und FOXP3

Regulatorische T-Zellen (Tregs) inhibieren physiologischerweise eine überschießende Immunantwort, indem sie die Aktivitäten anderer Immunzellen, wie die zytotoxischer T- und T-Helfer-Zellen sowie Makrophagen und B-Zellen, hemmen. Dabei spielen verschiedene Mechanismen, wie z.B. die Expression des Immuncheckpointproteins CTLA-4 und die Sekretion verschiedener immunsuppressiver Zytokine wie Interleukin-10 und TGF- β , eine Rolle. So können sie die Selbsttoleranz des Organismus gewährleisten und autoimmunen Reaktionen entgegenwirken (Akkaya & Shevach, 2022). Tumorzellen können sich dies im Rahmen eines sogenannten *Immune-Escape*-Mechanismus zunutze machen und Tregs chemotaktisch in den Tumorlokus rekrutieren (C. Li et al., 2020). Tregs exprimieren auf ihrer Oberfläche üblicherweise CD3, CD4 und CD25 und können spezifisch über die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 (Forkhead-Box-Protein P3) identifiziert werden. FOXP3 spielt sowohl bei der Differenzierung als auch für die Funktion der Tregs eine Rolle. Es wird sowohl von natürlichen als auch von peripher induzierten Tregs exprimiert und ist als Marker für tumorinfiltrierende Tregs etabliert (Gavin et al., 2007). Im HGSOC findet sich eine verhältnismäßig hohe Infiltration durch Tregs (Woo et al., 2001). Es gibt sowohl Studien, die keine (Barnett et al., 2010; Shah et al., 2008) oder eine positive (Leffers et al., 2009; Milne et al., 2009; Tsiatas et al., 2009) Assoziation mit dem Überleben beschreiben, als auch solche, die eine Infiltration mit einer schlechteren Prognose assoziieren (Curiel et al., 2004; Wolf et al., 2005). Zudem ist ein Zusammenhang mit einem metastatischen Phänotyp bekannt (Barnett et al., 2010).

Als weiterer prognostischer Marker wurde vielfach die CD8/FOXP3-Ratio beschrieben, um das Zusammenspiel und die gegensätzlichen Aktivitäten der verschiedenen Immunzellen zu berücksichtigen. Hier geben einzelne Studien keinen Zusammenhang mit dem Überleben an (Shah et al., 2008), andere Untersuchungen deuten auf eine positive prognostische Assoziation hin (Knutson et al., 2015). Eine Metaanalyse von Li et al zeigte eine positive, aber nicht statistisch signifikante Assoziation der epithelialen CD8/FOXP3-Ratio mit dem progressionsfreien Überleben, ein Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben konnte nicht gezeigt werden (J. Li et al., 2017).

3.12 Weitere TILs

Auch die Bedeutung eines Infiltrats durch andere proinflammatorische Immunzellen, insbesondere CD4-positive T-Zellen, M1-Makrophagen und CD20-positive Zellen wurde in verschiedenen Studien untersucht. Insgesamt scheinen diese Zellen mit einer besseren Prognose einherzugehen. Neben den regulatorischen T-Zellen gibt es weitere immunsuppressiv wirkende Zellen, wie M2-Makrophagen (Baci et al., 2020).

3.13 Immuncheckpointproteine

Immuncheckpointproteine sind membranständige Rezeptoren auf v.a. T-Lymphozyten, die die Immunantwort regulieren können. PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) ist ein inhibitorisches Immuncheckpointprotein, das durch Bindung an seinen Liganden PD-L1 (*Programmed cell death-ligand 1*) über mehrere Mechanismen zu einer Immunsuppression führt (Diskin et al., 2020). Die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von T-Zellen wird gehemmt und die Produktion von Interleukin-2 reduziert (Sheppard et al., 2004). Die Freisetzung verschiedener für die Immunreaktion notwendiger Transkriptionsfaktoren wird gebremst und es findet eine Herunterregulation von T-Zell-Rezeptoren statt (Karwacz et al., 2011).

Viele Tumore können solche immunsuppressiven Checkpoint-Proteine im Zuge einer Immunevasion hochregulieren. Eine vermehrte Expression von PD-L1 durch Ovarialkarzinomzellen ist in verschiedenen Studien beschrieben worden. Dabei reicht die Häufigkeit einer PD-L1-Expression je nach Studie von 13% bis zu über 90% (siehe Tabelle 28). Die Expression von PD-L1 ist sowohl auf Tumorzellen als auch auf Immunzellen, vor allem M2-Makrophagen, beschrieben (Martin de la Fuente et al., 2020; J. R. Webb et al., 2016). Der Anteil der PD-L1-positiven Zellen ist dabei im Vergleich zu anderen Tumorentitäten vergleichsweise gering (Aust et al., 2017). Einige Studien weisen auf eine negative Korrelation der PD-L1-Expression mit der Überlebenszeit hin (Abiko et al., 2013; Hamanishi et al., 2007; Xue et al., 2020) sowie auf einen Zusammenhang mit Fernmetastasierung (Dötzer et al., 2019) beziehungsweise mit einem höheren FIGO-Stadium (Dötzer et al., 2019; Drakes et al., 2018) andere Gruppen zeigen demgegenüber eine Assoziation mit einem verlängerten Überleben (Darb-Esfahani et al., 2016; J. R. Webb et al., 2016). Eine Zunahme der PD-L1-Expression im Rezidiv wurde beschrieben (Aust et al., 2017).

Die Expression von PD-1 und PD-L1 bietet einen therapeutischen Angriffspunkt für sogenannte Immuncheckpoint-Inhibitoren. Durch Bindung an den Liganden oder Rezeptor wird die Interaktion inhibiert, sodass die immunsuppressiven Effekte nicht ausgelöst werden und folglich die Immunreaktion gegen den Tumor verstärkt wird. Während dieses Konzept die Behandlung zahlreicher Entitäten, z.B. des Malignen Melanoms (Huang & Zappasodi, 2022), in den letzten Jahren revolutioniert hat, befindet es sich beim HGSOE noch in der klinischen Erprobung und hat als Monotherapie bislang eher enttäuschende Ergebnisse gebracht (Bronger, 2021).

3.14 Vergleich des Immunmilieus zwischen Ovarialtumor und Metastasen

Die erste vergleichende Untersuchung des Immunmilieus zwischen Ovarialtumor und Metastasen von Leffers et al. ergab eine höhere Gesamtinfiltration durch TILs in den untersuchten Omentumproben, allerdings keine Unterschiede im direkten Vergleich bei Fällen, in denen Proben von beide Geweben vorhanden waren. Es wurde für fortgeschrittene Stadien eine positive Korrelation des Vorhandenseins einer FOXP3-Infiltration im Omentum mit dem Überleben sowie ein Zusammenhang mit der operablen Resezierbarkeit beschrieben (Leffers et al., 2009). Jimenez-Sanchez et al. präsentierten eine Einzelfallanalyse einer Patientin, die innerhalb eines längeren therapiefreien Intervalls sowohl progrediente als auch regrediente Metastasen aufzeigte, und konnten hier eine erhöhte Infiltration durch TILs in den jeweiligen Geweben mit Regredienz beschreiben (Jiménez-Sánchez et al., 2017). In einer Studie von Dötzer et al. wurde zwischen Omentum- und Peritonealmetastasen unterschieden. Hier konnte wiederum eine höhere Expression von CD3 und CD8 in den Omentummetastasen, verglichen mit dem Ovarialtumor gezeigt werden, allerdings nur bezüglich des Stromas, im Tumorepithel selbst zeigten sich keine Unterschiede. Der Vergleich der Peritonealmetastasen mit dem Ovarialtumor hingegen zeigte in Bezug auf die stromale Infiltration keine Unterschiede, wohl aber eine deutlich höhere intratumorale PD-L1-Expression peritoneal (Dötzer et al., 2019). Bekos et al. konnten in ihrer Studie keine Korrelation der Expression auf TILs von CD8 und PD-L1 zwischen Haupttumor und Metastasen finden, es fand sich aber ein positiver Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression auf Tumorzellen im Haupttumor- und Metastasengewebe. Zudem konnte für beide Lokalisationen eine negative Assoziation mit dem Gesamtüberleben gezeigt werden (Bekos et al., 2021). Parvathareddy et al. konnten schließlich zeigen, dass sich die PD-L1-Expression bei einem paarweisen Vergleich von Ovarialtumor-

und dazugehörigem Metastasengewebe signifikant unterscheidet, wobei eine Expression in Peritonealgewebe insgesamt häufiger gefunden wurde als in Ovarialtumorgewebe. Eine Assoziation mit dem Überleben wurde in dieser Studie für keine der beiden Lokalisation gefunden (Parvathareddy et al., 2021).

3.15 Aktueller Therapiestandard

Die aktuelle S3-Leitlinie empfiehlt für alle operablen Patientinnen mit fortgeschrittenem *high-grade* serösem Ovarialkarzinom eine primäre radikale *Debulking*-Operation. Die vollständige Entfernung aller makroskopisch sichtbaren Tumormanifestationen (R0-Resektion) ist maßgeblich prognosebestimmend und mit einem verbesserten Überleben assoziiert (du Bois et al., 2009). Eine neoadjuvante Chemotherapie wird im Allgemeinen nicht empfohlen, einige Studien zeigen aber Vorteile, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien (Nishio & Ushijima, 2020). Die Operation erfolgt per Längslaparotomie und beinhaltet im fortgeschrittenen Stadium mindestens eine Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie, infragastrischer Omentektomie, Entfernung der ovariellen Gefäßbündel, Biopsien auch aus unauffälligen Peritonealarealen, Zwerchfellzytologien sowie eine Spülzytologie. Sämtliche befallene Gewebe werden, wenn möglich, entfernt, nicht selten sind Darmeingriffe erforderlich. Eine pelvine und paraaortale Lymphadenektomie im fortgeschrittenen Stadium wird nur bei makroskopischer oder bildgebender Auffälligkeit empfohlen (Harter et al., 2019). Es folgt eine adjuvante Kombinationschemotherapie aus Carboplatin und Paclitaxel, gegebenenfalls ergänzt durch den anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab. Im Anschluss soll eine Erhaltungstherapie mit dem Bevacizumab und/oder einem PARP-Inhibitor erfolgen, die genaue Wahl ist dabei abhängig vom Ansprechen auf die zytostatische Therapie sowie vom Status der DNA-Reparatur im Tumor (z.B. im Rahmen einer *BRCA*-Mutation oder einer anderen Störung der homologen Rekombination) (Markman, 2019).

Es wurde gezeigt, dass die zytostatische Therapie auch immunmodulatorische Auswirkungen hat (Galluzzi et al., 2015). So führt die Therapie mit Taxanen zu einer vermehrten Aktivierung von T-Effektorzellen (Peng et al., 2015), während Tregs in einer Studie zum nicht kleinzelligen Lungenkarzinom durch Taxane supprimiert wurden (Zhang et al., 2008). Platinhaltige Therapien scheinen immunogene Effekte zu haben, indem sie beispielsweise durch DNA-Schäden zu einer Vermehrung von Neoantigenen führen und T-Zellen aktivieren. Es ist allerdings auch ein Zusammenhang zwischen neoadjuvanter platinhaltiger Therapie und einer

vermehrten Expression von PD-L1 beschrieben worden (Peng et al., 2015). Die operative Therapie führt zu einer Reduktion von Tregs und des Zytokins Interleukin-10 sowie zur vermehrten Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (Napoletano et al., 2010). Die Therapie durch PARP-Inhibitoren führt über die Hemmung der Poly-(ADP-ribose)-Polymerasen und damit Verhinderung der Zellreparatur in Tumorzellen ebenso zu einer Vermehrung von Neoantigenen (Vikas et al., 2020).

3.16 Immuntherapie

Verschiedene Studien in Phase Ib-III untersuchen die Wirkung einer Monotherapie mit Antikörpern gegen PD-1 (Nivolumab (Hamanishi et al., 2015), Pembrolizumab (Matulonis et al., 2019; Varga et al., 2019)) oder PD-L1 (Avelumab (Disis et al., 2019), Atezolizumab (Liu et al., 2019)) bei in der Regel vielfach vorthapierten Patientinnen. Obwohl für einzelne Patientinnen ein langanhaltendes Ansprechen beschrieben ist, sind die Ergebnisse insgesamt ernüchternd. Die prädiktive Bedeutung der PD-L1-Expression im Tumorgewebe zur Identifikation solcher potenziell profitierenden Subgruppen scheint insgesamt unzureichend (Fan et al., 2018). Die Kombination mit einer zytostatischen Therapie liegt aufgrund der oben genannten immunmodulatorischen Effekte nahe. In bisherigen Phase-III-Studien zusammen mit Chemotherapie wurde aber keine verbesserte Prognose erreicht. Vereinzelt konnten aber profitierende Subgruppen mit PD-L1 als prädiktivem Marker identifiziert werden (Bronger, 2021). Für die Kombination von Immuncheckpoint-Inhibitoren mit PARP-Inhibitoren liegen aktuell noch keine Daten von Phase-III-Studien vor. Einige Frühphasenstudien und vorläufige Ergebnisse weisen jedoch auf positive synergistische Effekte und prognostische Vorteile in der Behandlung sowohl vom Ovarialkarzinom (Lee & Konstantinopoulos, 2019) als auch anderer solider Tumorentitäten (Vikas et al., 2020) hin.

Mögliche Gründe für das im Vergleich zu anderen Malignomen schlechte Ansprechen auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren könnten in der hohen Infiltration durch Tregs oder Makrophagen liegen (Woo et al., 2001). Die oft extensive Vorthherapie der meisten bisher in Studien eingeschlossenen Patientinnen führt zudem mutmaßlich zu einem „immunologischen Ausbrennen“ des Tumors (Farhood et al., 2019). Auch die im Ovarialkarzinom relativ geringe Tumormutationslast scheint eine Rolle zu spielen (Bronger, 2021).

4 Fragestellung und Zielsetzung

Insgesamt liegt es nahe, dass zukünftig möglichst früh im Krankheitsverlauf diejenigen Gruppen von Patientinnen identifiziert werden müssen, die voraussichtlich von einer Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren profitieren werden. So kann im Sinne einer personalisierten Krebstherapie ein maximaler Effekt erzeugt werden. Umgekehrt können so denjenigen Patientinnen, die keinen Nutzen von der Therapie erwarten können, unnötige Nebenwirkungen erspart werden. Da vorangegangene Studien bereits beschrieben haben, dass das Immunmilieu sich zwischen Ovarialtumor und Metastasen unterscheiden kann, gilt es, sich bei der Identifikation solcher Patientengruppen nicht auf eine Lokalisation zu beschränken. Für ein fundierteres Verständnis der Zusammenhänge und der prognostischen Bedeutung verschiedener Immunbiomarker bedarf es weiterer Analysen.

Ziel dieser Arbeit ist die retrospektive, vergleichende Charakterisierung des Immunmilieus im Ovarialtumor- und Metastasengewebe von *high-grade* serösem Ovarialkarzinom und eine prognostische Einordnung.

Im Sinne einer explorativen Analyse erfolgte eine semiquantitative Messung der Expression von vier Biomarkern:

- CD3 als T-Zell-Marker in Tumorepithel und Stroma
- CD8 als Marker für zytotoxische T-Zellen in Tumorepithel und Stroma
- FOXP3 als Marker für regulatorische T-Zellen in Tumorepithel und Stroma
- das Immuncheckpoint-Protein PD-L1 in Tumorepithel und Immunzellen

Um das Zusammenspiel der verschiedenen Zellen und Faktoren zu berücksichtigen, bilden wir zudem zwei bereits in der Literatur vorbeschriebene Kombinationen dieser Marker ab:

- die CD8/FOXP3-Ratio
- einen Immunitätsscore aus PD-L1 und CD8, analog zu Teng et al. (Teng et al., 2015)

Es folgt eine Suche nach Assoziationen dieser Marker untereinander und zwischen den verschiedenen Lokalisationen. Eine prognostische Einordnung erfolgt durch Überlebenszeitanalysen.

5 Material und Methoden

5.1 Patientinnenkollektiv – Zusammenstellung

Die grundsätzliche Fragestellung erforderte die Untersuchung eines Kollektivs, das zum einen bezüglich klinischer Eckdaten möglichst homogen sein sollte, und von dem zum anderen in ausreichender Menge und Qualität Gewebematerial für die immunhistochemische Analyse zur Verfügung stehen sollte. Hierzu wurden Patientinnen, die zwischen 1990 und 2014 eine Operation bei Ovarialkarzinom am Klinikum rechts der Isar erhalten hatten, für den Einschluss evaluiert. Die Erfüllung der folgenden genaueren Einschlusskriterien wurde auf Grundlage von Operationsberichten und Pathologiebefunden überprüft:

Einschlusskriterien:

- Nur Patientinnen mit Erstdiagnose eines HGSOE
- Nur Patientinnen im Stadium FIGO III oder IV
- Nur Patientinnen, die vor der Operation keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten

Die intraoperativ entnommenen Gewebeproben, die standardmäßig seitens der Pathologie formalinbasiert aufbereitet und in Paraffinblöcken konserviert werden, konnten anschließend in der pathologischen Archivgewebekbank des Klinikums rechts der Isar herausgesucht und für die weiteren Untersuchungen zusammengestellt werden. Hierzu wurden auf Grundlage der Operationsberichte und Pathologiebefunde für jeden Fall jeweils eine Gewebeprobe des Ovarialtumors und wenn möglich jeweils eine Gewebeprobe einer Omentummetastase sowie einer Peritonealmetastase identifiziert und somit in das so erstellte Gewebekollektiv eingeschlossen. Als Peritonealmetastase kam dabei tumorinfiltrierter Peritonealüberzug verschiedener Organe in Betracht. Die genaue Auswahl des jeweiligen Gewebeblockes erfolgte je nach Vorhandensein und Qualität des Materials. Hierbei mussten aus dem anfänglichen Kollektiv aus verschiedenen Gründen einige Fälle wieder ausgeschlossen werden:

Ausschlusskriterien:

- Paraffinblock mit Haupttumorgewebe im Pathologiearchiv nicht mehr vorhanden
- Gewebeblock beschädigt und deshalb nicht mehr verwertbar

- Auf dem Gewebblock nicht ausreichend Material für die weiteren Schritte vorhanden

Im nächsten Schritt wurden aus allen gesammelten Gewebelöcken 2-3 μm dicke „*Full-Face*“-Schnitte auf Objektträgern für die weiteren Färbungen mittels Mikrotom hergestellt.

Diese „*Full-Face*“-Schnitte konnten verwendet werden, um zunächst HE-Färbungen sowohl der Ovarialtumor- als auch der Metastasenpräparate anzufertigen (Durchführung nach Standard, Protokoll im Anhang). Für einen Teil der Gewebelöcke entfiel dieser Schritt, da die bereits in der Routine angefertigten HE-Färbungen aus der Pathologie zur Verfügung standen. Anschließend wurden sämtliche HE-Färbungen durch eine Fachärztin für Pathologie (PD Dr. Aurelia Noske) histologisch erneut hinsichtlich der Einschlusskriterien und Verwertbarkeit kontrolliert. Dabei musste wiederum ein weiterer Teil des Kollektivs ausgeschlossen werden aus verschiedenen Gründen:

Weitere Ausschlusskriterien:

- Gewebblock technisch nicht schneidbar (z.B. aufgrund hohen Fett- oder Nekroseanteils)
- HE-Färbung auch nach mehrfacher Wiederholung nicht in ausreichender Qualität möglich (z.B. aufgrund hohen Fett- oder Nekrosenanteils)

Bei der histologischen Beurteilung wurden zudem mittels Farbstiftmarkierung Tumoreale markiert, um für die Herstellung von *Tissue Micro Arrays* (TMAs) im nächsten Schritt die geeigneten Stanzareale eindeutig einzugrenzen. Die Herstellung der TMAs wurde von nach Standardprotokoll durchgeführt (Seiz et al., 2012). Hierbei standen für einen Teil der Fälle bereits TMAs aus früheren Projekten zur Verfügung.

Auf jedem TMA war außerdem Vergleichsgewebe verschiedener Organe (Niere, Leber, Lunge, Plazenta, Tonsille) in vordefiniertem Muster platziert. Dies diente zum einen zur Orientierung bei der Beurteilung unter dem Lichtmikroskop, zum anderen konnten diese Gewebe als Positiv-/Negativkontrollen bzw. zur Kalibrierung der Färbung herangezogen werden.

Anschließend wurden aus den TMA-Blöcken 2-3 μm dicke Gewebeschnitte für die nachfolgenden immunhistochemischen Färbungen hergestellt. Dazu wurden Objektträger der Firma Thermo Scientific verwendet (Superfrost Plus, REF J1800AMNZ, Fa. Menzel), das

Mikrotom Microm HM 335 E der Firma Microm, Mikrotomklingen A35 der Firma Feather, die Kühlplatte COP 30-010 der Firma Medite sowie das Wasserbad TFB 35 der Firma Medite. Das Wasserbad wurde zur Herstellung auf 38°C erwärmt. Die Mikrotomeinstellungen waren 2-3 µm für die Dicke des Schnitts sowie 8° für den Messerabstandswinkel.

5.2 Patientinnenkollektiv – Klinische Daten

Das erstellte Gewebekollektiv entsprach einem klinischen Kollektiv aus 254 Patientinnen mit folgenden klinischen Eckdaten:

Tabelle 2: Deskriptive Daten zum Kollektiv

	n	%
Alter bei Diagnose (in Jahren)	63,2 (20-89; s = 11,4)	
Gesamt	252	100
FIGO-Stadium		
III	186	73,8
IV	66	26,2
Histologisches Grading		
2	28	11,1
3	223	88,5
Resttumor		
R0 (makrosk. Tumorfreiheit)	105	41,7
R1 (Tumorrest <1cm)	71	28,2
R2 (Tumorrest >1cm)	72	28,6
Aszitesmenge		
Kein Aszites	29	11,5
< 500ml Aszites	38	15,1
> 500ml Aszites	71	28,2
Tod im Untersuchungszeitraum		
Ja	170	67,5
Nein/unbekannt	82	32,5
Rezidiv im Untersuchungszeitraum		
Ja	174	69,0
Nein/unbekannt	78	31

5.3 Immunhistochemische Färbungen

Alle TMA-Gewebeschnitte wurden immunhistochemisch (IHC) auf die Expression von CD3, CD8, FOXP3 sowie PD-L1 untersucht.

Im Labor von Dr. med. vet. Katja Steiger (vergleichende experimentelle Pathologie, TUM) wurden die IHC-Färbungen in vollautomatisierten Färbesystemen der Firma Roche (Ventana BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul) durchgeführt.

Die Färbungen gegen CD3, CD8 und FOXP3 wurden gemäß dem laborinternen Standardprotokoll „T CeP CC1“ Nr. 301 nach der Prozedur „XT ultraView DAB v3“ durchgeführt. Dazu wurden jeweils die Antikörper Anti-CD3-MRQ-39 von Cell Marque, Anti-CD8-C8/144B von Dako und Anti-FOXP3-236A/E7 von Abcam als Primärantikörper eingesetzt. Die wichtigsten Zwischenschritte des Färbeprotokolls sind in Tabelle 3 zusammengefasst, das detaillierte Originalprotokoll findet sich im Anhang.

Tabelle 3: Färbeprotokoll T CeP CC1 Nr. 301

Schritt	Unterschritte
Entparaffinierung	Aufheizen des Objektträgers bis 75° C für 4 Minuten Mehrere Waschschrte Aufheizen des Objektträgers bis 76° C für 4 Minuten Mehrere Waschschrte
Hitzevorbehandlung und Conditioning	Cell Conditioner 1 auftragen Aufheizen des Objektträgers bis 100° C für 4 Minuten Cell Conditioner 1 mehrschrittig auftragen Spülen mit Reaktionspuffer
Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität	Aufheizen des Objektträgers bis 37° C Inkubation für 4 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer 1 Tropfen UV INHIBITOR auftragen Inkubation für 4 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer
Primärantikörper	Aufheizen des Objektträgers bis 37° C Inkubation für 4 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer Handauftrag mit Primärantikörper in jeweiliger Verdünnung Inkubation für 32 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer
Sekundärantikörper	Aufheizen des Objektträgers bis 37° C Inkubation für 4 Minuten

	Spülen mit Reaktionspuffer 1 Tropfen UV HRP UNIVERSAL MULTIMER auftragen Inkubation für 8 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer
Markierung und Färbung	Spülen mit Reaktionspuffer 1 Tropfen UV DAB und einen Tropfen UV DAB H202 und LCS auftragen Inkubation für 8 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer
Verstärkung	1 Tropfen UV COPPER auftragen Inkubation für 8 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer

Da es für das Antigen PD-L1 im Gegensatz zu den anderen Antigenen weniger Erfahrungen mit lange erprobten und gut etablierten Primärantikörpern gab, wurden hier zunächst Testfärbungen mit zwei verschiedenen Antikörpern durchgeführt – mit dem Antikörper Anti-PD-L1-22C3 von Dako und dem Antikörper Anti-PD-L1-SP263 von Ventana Medical Systems/Roche. Nach einer mikroskopischen Zwischenbeurteilung der Färbequalität und Auswertbarkeit durch PD Dr. Aurelia Noske fiel die Wahl auf den Antikörper SP263 von Ventana Medical Systems/Roche, mit dem dann die Färbungen des restlichen Kollektivs komplettiert wurden. Dazu wurde das dem laborinterne Standardprotokoll „PDL1 SP263“ Nr. 1 nach der Prozedur „XT VENTANA PD-L1(SP263) Assay“ durchgeführt. Die wichtigsten Zwischenschritte des Färbeprotokolls sind in Tabelle 4 zusammengefasst, das detaillierte Originalprotokoll findet sich im Anhang.

Tabelle 4: Färbeprotokoll PDL SP263 Nr. 1

Schritt	Unterschritte
Entparaffinierung	Aufheizen des Objektträgers bis 75° C für 4 Minuten Mehrere Waschschrte Aufheizen des Objektträgers bis 76° C für 4 Minuten Mehrere Waschschrte
Hitzevorbehandlung und Conditioning	Cell Conditioner 1 auftragen Aufheizen des Objektträgers bis 95°C für 4 Minuten Aufheizen des Objektträgers bis 100° C für 8 Minuten Cell Conditioner 1 mehrschrittig auftragen Spülen mit Reaktionspuffer
Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität	Aufheizen des Objektträgers bis 37° C Spülen mit Reaktionspuffer 1 Tropfen OV PEROXIDASE INHIBITOR auftragen Inkubation für 4 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer
Primärantikörper	Aufheizen des Objektträgers bis 37° C

	Inkubation für 4 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer 1 Tropfen Ventana-PDL1 (SP263) auftragen Inkubation für 16 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer in mehreren Schritten
Sekundärantikörper	Spülen mit Reaktionspuffer 1 Tropfen OV HQ UNIVERSAL LINKER auftragen Inkubation für 8 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer 1 Tropfen OV HRP MULTIMER auftragen Inkubation für 8 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer in mehreren Schritten
Markierung und Färbung	Spülen mit Reaktionspuffer 1 Tropfen UV DAB und einen Tropfen UV DAB H202 und LCS auftragen Inkubation für 8 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer
Verstärkung	1 Tropfen UV COPPER auftragen Inkubation für 4 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer Waschgang
Gegenfärbung	Aufheizen des Objektträgers bis 37° C Spülen mit Reaktionspuffer 1 Tropfen HEMATOXYLIN II auftragen Inkubation für 8 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer
Gegenfärbung	Spülen mit Reaktionspuffer 1 Tropfen BLUING AGENT auftragen Inkubation für 4 Minuten Spülen mit Reaktionspuffer

5.4 Histologische Evaluation

Die histologische Auswertung erfolgte durch Begutachtung der jeweiligen Färbungen am PC mit der Ansichtsoftware Aperio ImageScope im Anschluss an die Digitalisierung der Objektträger mittels Objektträger-Scanner.

Zur semiquantitativen Evaluation wurden Auswertungsschemata zugrunde gelegt, die in vorheriger Diskussion mit PD Dr. Aurelia Noske entwickelt worden waren.

Für die Marker CD3 und CD8 wurde hierzu eine Ordinalskala festgelegt, deren Werte dem prozentualen Anteil der Zellen mit einer Expression des jeweiligen Proteins in Zehnerschritten entsprachen. Eine subjektiv wahrgenommene Expression des Proteins durch 1-9% der Zellen wurde hier beispielsweise mit der Kategorie „1-10%“ bewertet, was zur besseren

Übersichtlichkeit mit „5%“ betitelt wurde. Zur Orientierung wurde die nachfolgende Skizze herangezogen:

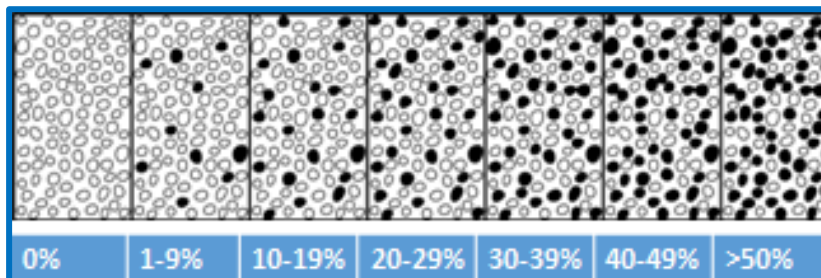


Abbildung 2: Schema zur semiquantitativen Auswertung der Expression immunhistochemisch markierter Proteine.

Diese wurde um die Kategorie „<1%/any“ ergänzt, um die Fälle mit einer sehr geringen Expression getrennt von 0% betrachten zu können. Dabei wurde die Expression in Stroma und Tumorepithelgewebe getrennt beurteilt und dokumentiert. Dots, die nicht eindeutig einem Wert dieses Scores zugeordnet werden konnte, wurden entsprechend als kontrollbedürftig klassifiziert und nach Rücksprache mit PD Dr. Aurelia Noske erneut evaluiert. Nicht auswertbare Gewebedots (aufgrund von Schädigung während der Färbeprozedur) entfielen der weiteren Analyse.

Zur besseren Orientierung beim histologischen Scoring wurden in Absprache mit der Pathologin PD Dr. Aurelia Noske für die jeweiligen Abschnitte repräsentative Proben aus dem Kollektiv herausgesucht und daraus für Stroma und Epithel jeweils Übersichten erstellt, die den Auswertern während der Auswertung zur ständigen Abgleichmöglichkeit vorlagen, um möglichst einheitliche Ergebnisse zu erzielen.

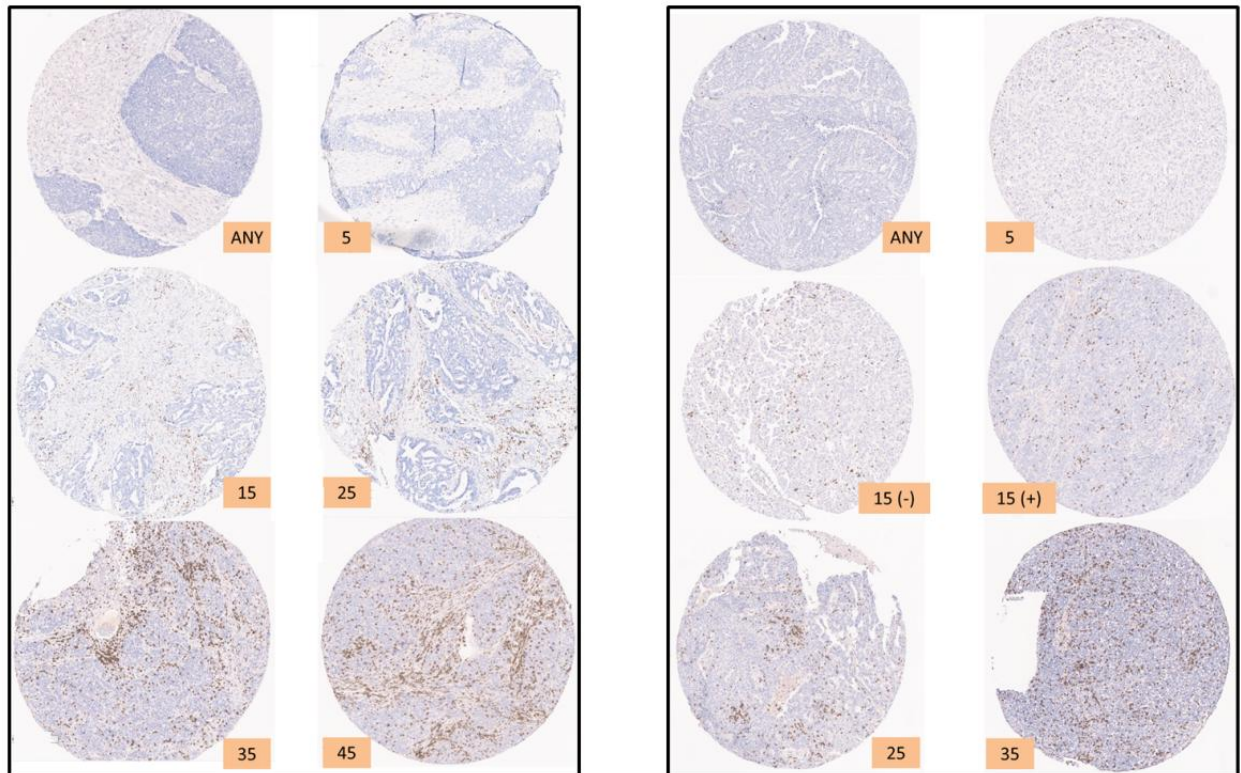


Abbildung 3: Orientierungshilfe für die semiquantitative Auswertung der CD3- und CD8- Expression im Gewebe (A: Stroma, B: Tumorepithel)

Für den Marker FOXP3 wurde das Scoring-Konzept aufgrund des prozentual deutlich geringeren Anteils exprimierender Zellen abgewandelt: Hier wurden nur die 3 Kategorien „0“ (keine oder maximal eine Zelle im ganzen Dot angefärbt), „1“ (vereinzelte angefärbte Zellen – auf einen gesamten Dot hochgerechnet etwa 2-5 Zellen) und „2“ (zahlreiche Zellen) vergeben. Dabei wurde die Expression in Stroma und Tumorepithelgewebe getrennt beurteilt und dokumentiert.

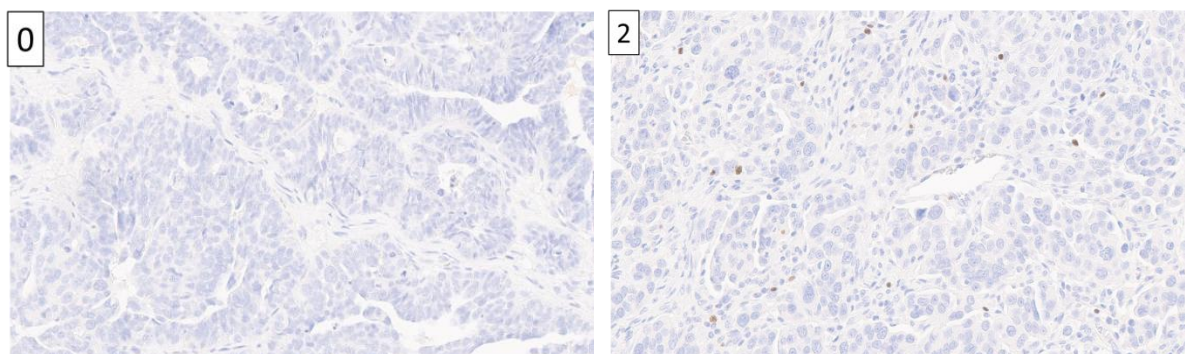


Abbildung 4: Beispiele für vergebene Scores in der Auswertung der IHC-Färbung gegen FOXP3, 40-fache Vergrößerung

Für den Marker PD-L1 wurde ein ähnliches Konzept angewandt. Es konnten Werte auf einer Ordinalskala von 0 (keine Expression) bis 4 (Höchstwert der im Kollektiv gefundenen Expression) vergeben werden. Dabei wurde die Expression in Tumorepithelgewebe und den tumor- infiltrierenden Immunzellen getrennt beurteilt und dokumentiert.

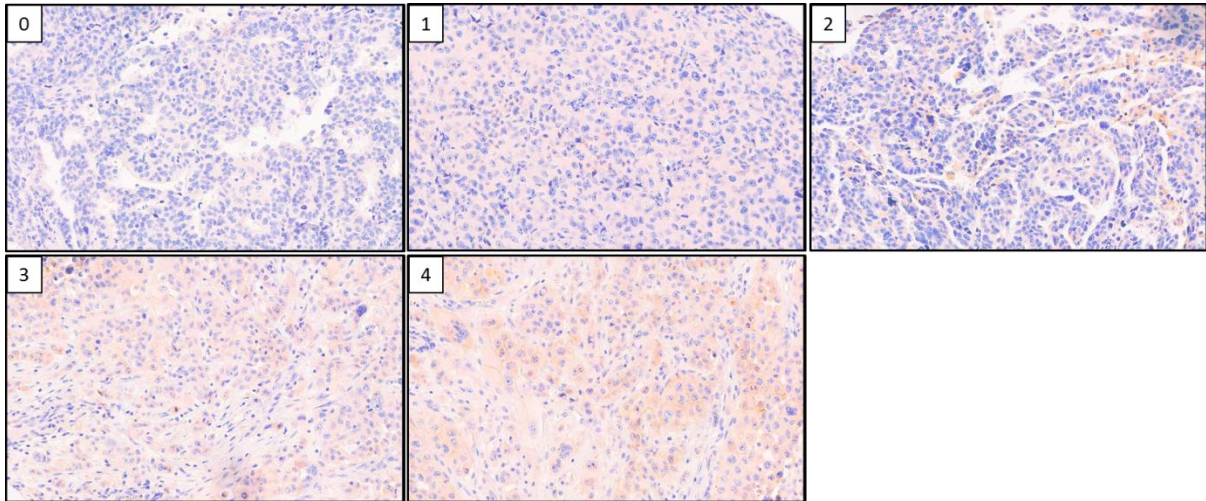


Abbildung 5: Beispiele für vergebene Scores in der Auswertung der IHC-Färbung gegen PD-L1, 40-fache Vergrößerung

Die Auswertung nach diesen Konzepten erfolgte für die Färbungen gegen CD3, CD8 und FOXP3 durch zwei unabhängige Bewerter (Janna Nikonov, PD Dr. Holger Bronger, Gynäkoonkologe) und für die Färbungen gegen PD-L1 durch PD Dr. Aurelia Noske (Pathologin). Alle Werte wurden in einer Tabelle dokumentiert und im nächsten Schritt statistisch ausgewertet. Um für jeden Fall pro Lokalisation jeweils nur einen Wert zu erlangen, wurde zwischen den mitunter unterschiedlichen Scores im Falle von mehreren Dots jeweils der Median gebildet und falls der Median zwischen zwei auf der verwendeten Ordinalskala vorkommenden Werte lag, wurde nächsthöhere Wert der Ordinalskala festgelegt.

Die so generierten ordinalskalierten Scores wurden anschließend für die Marker CD3 und CD8 zusätzlich in die Kategorien «low» und «high» dichotom nominalskaliert eingeteilt, für die Marker FOXP3 und PD-L1 erfolgte die dichotome Nominalskalierung nach «negativ» und «positiv». Hierfür wurden folgende Einteilungswerte («Cut-Off-Werte») gewählt:

Tabelle 5: Kategorienbildung für jeweilige dichotome Nominalskalen

	«low»	«high»
CD3	0%; <1%	1-9%; 10-19%; 20-29%; 30-39%; 40-49%; >50%
CD8	0%; <1%	1-9%; 10-19%; 20-29%; 30-39%; 40-49%; >50%
	«negativ»	«positiv»
FOXP3	0	1;2
PD-L1	0	1;2;3;4;5

Der Wahl dieser Cut-Off-Werte liegt in erster Linie eine Einschätzung physiologisch sinnvoller Kategorien zugrunde. Zum anderen konnten durch die Wahl dieser Kategorien ähnlich große Vergleichsgruppen generiert werden und größtmögliche Effekte gezeigt werden.

Für einige Untersuchungen wurden die ordinalskalierten Werte, für andere die dichotomisierten Kategorien herangezogen. Diese Wahl hing hier in erster Linie von der optimaleren und übersichtlicheren grafischen Darstellung ab, zum anderen von Überlegung physiologisch sinnvoller Kategorisierung.

5.5 Statistische Auswertung

Die Aufbereitung des Datensatzes erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation (2018); Microsoft 365 MSO, Version 2301 Build 16.0.16026.20002, Redmond, USA) und R (R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Version 4.2.2, Vienna, Austria) sowie RStudio (RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. Version 2022.12.0+353, PBC, Boston, MA) Die statistische Auswertung und grafische Umsetzung erfolgte mit R und RStudio. Folgende Pakete wurden dabei verwendet:

Datenmanagement: *dplyr*, *tidyr*, *tibble*, *readxl*, *rio*, *data.table*

Statistische Auswertungen/ Grafische Darstellung: *ggplot2*, *gridExtra*, *extrafont*, *patchwork*, *plotly*, *survival* (Kaplan-Meier-Kurven), *networkD3* (Sankey-Diagramme), *corrplot* (Korrelationstafeln), *ggsankey*

Sonstige: *remotes*, *htmlwidgets*, *psych*

Teilweise wurden im Anschluss mit Microsoft PowerPoint Legenden eingefügt und Beschriftungen optimiert. Die Erstellung von Abbildung 1 erfolgte ebenfalls mit Microsoft PowerPoint (Microsoft Corporation (2018); Microsoft 365 MSO, Version 2301 Build 16.0.16026.20002, Redmond, USA).

Die Arbeit ist als explorative Analyse zu verstehen. Alle angegebenen p-Werte dienen einer groben Einordnung der Signifikanz und sind nicht im Sinne einer Hypothesenbestätigung oder -ablehnung gemeint.

Um das Zusammenspiel und die teils gegensätzlichen Aufgaben der verschiedenen Bestandteile des Immunsystems zu berücksichtigen, wurden verschiedene Scores und Ratios gebildet. In der Literatur vorbeschrieben ist die CD8/FOXP3-Ratio, die das Verhältnis des Anteils CD8-positiver Zellen zu dem Anteil FOXP3-positiver Zellen abbildet. In verschiedenen Studien, in denen die Quantifizierung der CD8- und FOXP3-Expressionen auf metrischen Verhältnisskalen erfolgte, war die Bildung dieser Ratio durch bloße Division der Werte möglich (Preston et al., 2013; Sato et al., 2005). Mitunter wurden diese so gebildeten Werte anschließend in ordinalskalierte Bereiche gruppiert (Knutson et al., 2015). In anderen Studien wurde von Anfang an die Ratio auf einer Ordinalskala abgebildet (Ono et al., 2020). Da in dieser Arbeit die Expression semiquantitativ auf Ordinalskalen abgebildet wurde, konnte auch die Ratio nur auf einer Ordinalskala quantifiziert werden. Um eine begründete und nachvollziehbare

Einteilung vorzunehmen, wurde zunächst die ursprüngliche Quantifizierung der Expressionen von CD8 als sehr grobe Beschreibung des prozentualen Anteils gefärbter Zellen verstanden (beispielsweise entspricht der Wert „15“ hier dem Bereich „10-20%“ und wird somit als „15%+/-5%“ verstanden. Für die FOXP3-Expression wurden ebenfalls der Ordinalskala entsprechenden Prozentwerte verwendet, diese wurden auf 0,5% für den Scorewert 0, auf 3% für den Scorewert 1 und 5% für den Scorewert 2 festgelegt.

Auch wenn die so entstandenen Skalen keine Verhältnisskalen sind, wurden für eine sehr grobe Einschätzung der Ratio die Werte durcheinander dividiert. Die so erhaltenen scheinbar metrisch skalierten Werte (siehe Tabelle 6) wurden anschließend in die Bereiche „ $0 < x < 1$ “, „ $1 \leq x < 5$ “ und „ $x \geq 5$ “ eingeteilt. Für diese Einteilung wurden die jeweiligen Fallzahlen der so entstehenden Subgruppen berücksichtigt.

Tabelle 6: Schema für die Bildung einer CD8/FOXP3-Ratio

		CD8						
		0	1	5	15	25	35	45
FOXP3	0 (ca. 0,5%)	0	2	10	30	50	70	90
	1 (ca. 3%)	0	0,333	1,333	5	8,333	11,67	15
	2 (ca. 5%)	0	0,2	1	3	5	7	9

		CD8						
		0	1	5	15	25	35	45
FOXP3	0 (ca. 0,5%)	low	medium	high	high	high	high	high
	1 (ca. 3%)	low	low	medium	high	high	high	high
	2 (ca. 5%)	low	low	medium	medium	high	high	high

Um den Unterschied zwischen einer sehr geringen (sowohl CD8 niedrig als auch FOXP3 niedrig) und einer sehr hohen Gesamt-Immuninfiltration, die gleichermaßen durch eine „medium“ CD8/FOXP3-Ratio repräsentiert werden, wurde zudem ein „CD8/FOXP3-Score“ gemäß Tabelle 7 gebildet.

Tabelle 7: Schema für die Bildung eines CD8/FOXP3-Scores

		CD8						
		0	1	5	15	25	35	45
FOXP3	0	1	1	3	3	3	3	3
	1	2	2	4	4	4	4	4
	2	2	2	4	4	4	4	4

Die Abbildung verschiedener Immunologischer Subtypen unter Berücksichtigung der CD8- sowie PD-L1-Expression erfolgte analog einer Studie von Teng et al. (Teng et al., 2015)

Tabelle 8: Schema für die Bildung von immunologischen Typen I - IV

		CD8						
		0	1	5	15	25	35	45
PD-L1	0	II	IV	IV	IV	IV	IV	IV
	1	III	I	I	I	I	I	I
	2	III	I	I	I	I	I	I
	3	III	I	I	I	I	I	I
	4	III	I	I	I	I	I	I

Typ I	TILS ⁺ / PD-L1 ⁺
Typ II	TILS ⁻ / PD-L1 ⁻
Typ III	TILS ⁻ / PD-L1 ⁺
Typ IV	TILS ⁺ / PD-L1 ⁻

TILS⁺ ist definiert als CD8-positiv, PD-L1⁺ ist definiert als PD-L1-positiv in Immun- und/oder Tumorzellen.

Als Maß für den Vergleich der verschiedenen Lokalisationen untereinander wurde für alle Biomarker getrennt ein Heterogenitätsindex gebildet. Hier werden jeweils unter Betrachtung der dichotomisierten Skala (für CD3 und CD8: „low“/„high“, für FOXP3 und PD-L1 „negativ“/„positiv“) die Werte von zwei der Lokalisationen paarweise verglichen. Übereinstimmung wurde als homogen, Ungleichheit als heterogen gewertet (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Schema für die Bildung eines Heterogenitäts-Index

		Lokalisation 2	
		low bzw. negativ	high bzw. positiv
Lokalisation 1	low bzw. negativ	homogen	heterogen
	high bzw. positiv	heterogen	homogen

Da hier keine Unterscheidung zwischen der beiden als homogen eingestuften Situation einer gleichsam hohen und gleichsam niedrigen Infiltration möglich ist, wurde zudem ein Heterogenitätsscore gebildet (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Schema für die Bildung eines Heterogenitäts-Scores

		Lokalisation 2	
		low bzw. negativ	high bzw. positiv
Lokalisation 1	low bzw. negativ	low-low (1)	low-high (2)
	high bzw. positiv	high-low (3)	high-high (4)

Univariate Überlebenszeitanalysen:

Es wurden Analysen durchgeführt für das Gesamtüberleben (OS, *overall survival* = Zeit zwischen Diagnose und Tod in Monaten, Todesursache irrelevant) und das progressionsfreie Überleben (PFS, Progressionsfreies Überleben = Zeit zwischen Diagnose und Progression der Erkrankung oder Tod in Monaten, falls Tod: Todesursache irrelevant). Die Errechnung erfolgte über das R-Package *Survival* mittels Kaplan-Meier-Schätzer, vergleichende Analysen mittels Log-Rank-Test, die grafische Darstellung durch Kaplan-Meier-Kurven.

Korrelationen:

Korrelationsanalysen zwischen verschiedenen ordinalskalierten Parametern erfolgten mittels Berechnung des Spearman-Korrelationskoeffizienten (R Base) und grafische Darstellung in Korrelationstabellen mit Angabe des P-Werts mittels R-Package *corrplot*.

5.6 Übersichtstabellen aller verwendeten Materialien und Geräte

Tabelle 11: Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Antikörper- Zielprotein	Beschreibung	Hersteller	Katalognummer	Verwendete Verdünnung
Anti- CD3 - MRQ-39	Rabbit Monoclonal IgG1	Cell Marque	CMC10339020	1:500
Anti- CD8 - C8/144B	Mouse Monoclonal IgG1	Abcam	ab75129	1:100
Anti- FOXP3 - 236A/E7	Mouse Monoclonal IgG1	Abcam	ab20034	1:200
Anti- PD-L1 - SP263	Rabbit Monoclonal IgG1	Ventana	07 494 190 001	1:50

Tabelle 12: Verwendete Reagenzien für die immunhistochemischen Färbungen

Reagenz	Beschreibung	Hersteller	Katalognummer
CC1 – Cell Conditioning 1	Leicht basischer Puffer auf TRIS-Basis zur Vorbehandlung formalinfixierter Präparate zur Renaturierung von Proteinen	Ventana Medical Systems, Roche	950-124
UV-Inhibitor	Peroxidaseinhibitor (3% hydrogen Peroxid-Lösung)	Ventana Medical Systems, Roche	760-500 (UltraView Universal DAB Detection Kit)
UV HRP UNIV MULT	Multimer-Sekundär-Antikörper (Kombination aus HRP-markierten Antikörpern (goat anti-mouse IgG, goat antimouse IgM, and goat anti-rabbit) (<50 µg/mL) in einer Pufferlösung aus Protein mit ProClin 300, einem Konservierungsmittel)		
UV DAB	Chromogen (0.2% 3, 3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in einer stabilisierenden Lösung mit einem Konservierungsmittel)		
UV DAB H2O2	Peroxidase aus Meerrettich (0.04% Hydrogen-peroxid in einer Phosphat-Pufferlösung)		
UV COPPER	Verstärker (Kupfersulfat (5g/L) in Acetatpuffer mit Konservierungsmittel)		
Reaktionspuffer	Pufferlösung (pH 7.6 ± 0.2) auf Tris-Basis	Ventana Medical Systems, Roche	950-300
OV Peroxidase Inhibitor	Peroxidaseinhibitor (3% hydrogen Peroxid-Lösung)	Ventana Medical Systems, Roche	760-700 (OptiView DAB IHC Detection Kit)
OV HQ Universal Linker	Multimer-Sekundär-Antikörper (Kombination aus HQ-markierten Antikörpern (goat anti-mouse IgG,		

	goat antimouse IgM, and goat anti-rabbit) (<50 µg/mL) in einer Pufferlösung aus Protein mit ProClin 300, einem Konservierungsmittel) (HQ ist ein kovalent an goat-Antikörper gebundenes Hapten)		
OV HRP Multimer	Mouse Monoclonal antiHQ-labeled HRP Tertiär-Antikörper (<40 µg/mL) in einer Pufferlösung aus Protein mit ProClin 300, einem Konservierungsmittel)		
OV DAB	Chromogen (0.2% 3, 3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in einer stabilisierenden Lösung mit einem Konservierungsmittel)		
OV DAB H2O2	Peroxidase aus Meerrettich (0.04% Hydrogen-peroxid in einer Phosphat-Pufferlösung)		
OV Copper	Verstärker (Kupfersulfat (5g/L) in Acetatpuffer mit Konservierungsmittel)		
Hematoxylin II	Gegenfärbung von Zellkernen	Ventana Medical Systems, Roche	790-2208
Bluing Reagent	Wässrige Pufferlösung mit Lithium-Acetat zur Gegenfärbung von Zellkernen	Ventana Medical Systems, Roche	760-2037

6 Ergebnisse

6.1 Deskriptive Übersicht über die Anteile exprimierender Zellen der untersuchten Immun-Marker

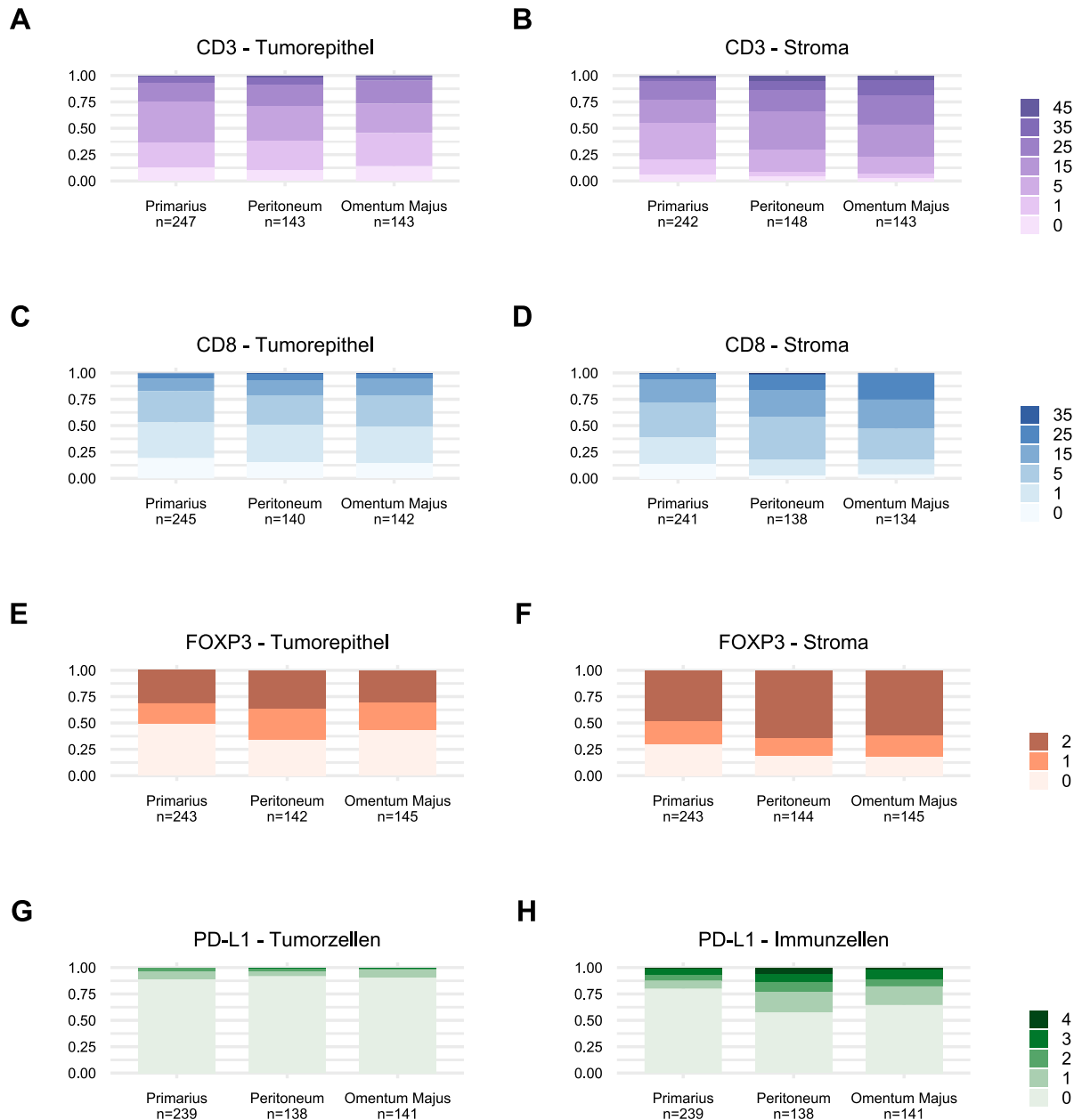


Abbildung 6: Expression der untersuchten Immun-Marker nach Lokalisation (relative Anteile der Ausprägungen an der Gesamtzahl der jeweils untersuchten Fälle)

Nachfolgend wird in Abgrenzung zum Metastasengewebe der Begriff „Haupttumor“ für das Ovarialtumorgewebe verwendet. In einem Großteil der Fälle konnten sowohl in den Ovarialtumor- (Haupttumor-) als auch in den Metastasen-Gewebeproben CD3-positive Zellen gefunden werden. Hierbei war im Vergleich die Infiltration im Stroma etwas ausgeprägter als im Tumorepithel (Abbildung 6A und B). Unterschiede in den verschiedenen Lokalisationen ließen sich für die Infiltration des Tumorepithels allenfalls tendenziell beobachten: Bei den Peritonealmetastasen fanden sich mehr Fälle mit höheren Infiltrationen als im Haupttumor, bei den Omentum-Metastasen zeigte sich eine umgekehrte Tendenz. Deutlichere Unterschiede wurden bei der Untersuchung der Stroma-Infiltration durch CD3-positive Zellen sichtbar: Hier wurden in den Metastasen, insbesondere in Omentummetastasen, im Vergleich zum Haupttumorgewebe häufiger höhere Infiltrationsgrade gefunden, was darauf hindeuten könnte, dass diese Lokalisationen ein inflammatorischeres Milieu aufweisen.

Tabelle 13: Anteil der Zellen mit CD3-Expression nach Lokalisation, A = Ausprägung der Immuninfiltration (semiquantitativ)

A	Tumorepithel						Stroma					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	31	12,6	14	9,8	20	14,0	15	6,2	6	4,1	4	2,8
1	59	23,9	41	28,7	45	31,5	33	13,6	7	4,7	5	3,5
5	95	38,5	46	32,2	40	28,0	84	34,7	30	20,3	23	16,1
15	45	18,2	29	20,3	31	21,7	54	22,3	54	36,5	44	30,8
25	14	5,7	10	7,0	5	3,5	44	18,2	30	20,3	40	28,0
35	3	1,2	3	2,1	2	1,4	6	2,5	13	8,8	21	14,7
45	0	0,0	0	0,0	0	0,0	6	2,5	8	5,4	6	4,2
ges.	247		143		143		242		148		143	

Der Anteil CD3-positiv gewerteter Fälle fällt für alle Lokalisationen bei der Betrachtung des Stromas höher aus als im Epithel. Dieser Unterschied stellt sich deutlicher dar bei der Wahl einer dichotomen Einteilung in „low“ (keine oder nur wenige Zellen positiv) versus „high“. Der Anteil der als „high“ gewerteten Fälle war bei Betrachtung des Tumorepithels am höchsten im Haupttumorgewebe, am geringsten im Omentummetastasengewebe. Bei Betrachtung des Stromas war genau umgekehrt der Anteil als „high“ gewerteter Fälle am höchsten im Omentummetastasengewebe und am geringsten im Haupttumorgewebe.

Tabelle 14: Abs. und rel. Anzahl der Fälle mit als positiv bzw. "high" gewerteter CD3-Expression nach Lokalisation

	Tumorepithel						Stroma					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
pos.	216	87,4	129	90,2	123	86,0	227	93,8	142	95,9	139	97,2
high	157	63,6	88	61,5	78	54,5	194	80,1	135	91,2	134	93,7

Analoge Beobachtungen konnten auch für die jeweilige Infiltration durch CD8-positive Zellen gemacht werden.

Tabelle 15: CD8-Expression nach Lokalisation, A = Ausprägung der Immuninfiltration (semiquantitativ)

A	Tumorepithel						Stroma					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	47	19,2	21	15,0	20	14,1	33	13,7	4	2,9	5	3,7
1	83	33,9	50	35,7	50	35,2	60	24,9	20	14,5	19	14,2
5	73	29,8	39	27,9	41	28,9	81	33,6	57	41,3	39	29,1
15	29	11,8	20	14,3	23	16,2	52	21,6	34	24,6	37	27,6
25	12	4,9	8	5,7	7	4,9	13	5,4	20	14,5	33	24,6
35	1	0,4	2	1,4	1	0,7	2	0,8	2	1,4	1	0,7
45	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,7	0	0,0
ges.	245		140		142		241		138		134	

Der Anteil CD8-positiv gewerteter Fälle fällt auch für alle Lokalisationen bei der Betrachtung des Stromas höher aus als im Epithel. Auch hier stellt sich dieser Unterschied deutlicher dar bei der Wahl einer dichotomen Einteilung in „low“ (keine oder nur wenige Zellen positiv) versus „high“. Der Anteil der als „positiv“ bzw. „high“ gewerteten Fälle war bei Betrachtung des Tumorepithels etwas höher in den Metastasenproben als im Haupttumorgewebe. Bei der Betrachtung des Stromas waren die Anteile „positiv“ bzw. „high“ gewerteter Fälle in den Metastasenlokalisationen deutlich höher als im Haupttumorgewebe.

Tabelle 16: Abs. und rel. Anzahl der Fälle mit als positiv bzw. "high" gewerteter CD8-Expression nach Lokalisation

	Tumorepithel						Stroma					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
pos.	198	80,8	129	92,1	122	85,9	208	86,3	134	97,1	129	96,3
high	115	46,9	69	49,3	72	50,7	148	61,4	114	82,6	110	82,1

Auch FOXP3-positive Zellen fanden sich vergleichsweise am häufigsten im Tumorepithel der Peritonealmetastasen und im Stromagewebe beider Metastasen.

Tabelle 17: FOX-P3-Expression nach Lokalisation, A = Ausprägung der Immuninfiltration (semiquantitativ)

A	Tumorepithel						Stroma					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	119	49,0	48	33,8	62	42,8	72	29,6	27	18,8	26	17,9
1	48	19,8	42	29,6	39	26,9	53	21,8	24	16,7	29	20,0
2	76	31,3	52	36,6	44	30,3	118	48,6	93	64,6	90	62,1
ges.	243		142		145		243		144		145	

Tabelle 18: Abs. und rel. Anzahl der Fälle mit als positiv gewerteter FOXP3-Expression nach Lokalisation

	Tumorepithel						Stroma					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
pos.	124	51,0	94	66,2	83	57,2	171	70,4	117	81,3	119	82,1

Die Expression von PD-L1 in Tumorzellen fiel insgesamt sehr gering aus, die meisten Gewebeproben wiesen keinerlei PD-L1-positive Tumorzellen auf. Auch tumorinfiltrierende Immunzellen exprimierten selten PD-L1, hier konnten die höchsten Anteile in den Peritonealmetastasen gefunden werden, die niedrigsten im Haupttumorgewebe. Wenn man keine Unterscheidung zwischen der Expression auf Tumor- und Immunzellen bzw. in Haupttumor- und Metastasengewebe trifft, also einen Fall insgesamt als PD-L1-positiv wertet, sofern in irgendeiner der Lokalisationen eine positive Expression auftritt, so ergibt sich eine Rate von 48% positiver Fälle (121/252 Fällen).

Tabelle 19: PD-L1-Expression nach Lokalisation, A = Ausprägung der Immuninfiltration (semiquantitativ)

A	Tumorzellen						Immunzellen					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	213	89,1	127	92,0	128	90,8	191	79,9	79	57,2	91	64,5
1	17	7,1	6	4,3	10	7,1	19	7,9	27	19,6	25	17,7
2	8	3,3	3	2,2	1	0,7	13	5,4	13	9,4	9	6,4
3	1	0,4	2	1,4	2	1,4	14	5,9	10	7,2	13	9,2
4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,8	9	6,5	3	2,1
ges.	239		138		141		239		138		141	

Tabelle 20: Abs. und rel. Anzahl der Fälle mit als positiv gewerteter PD-L1-Expression nach Lokalisation

	Tumorzellen						Immunzellen					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
pos	26	10,9	11	8,0	13	9,2	48	20,0	59	42,8	50	35,5

6.2 Univariate Überlebenszeitanalyse

Klinische Parameter

Für verschiedene klinische Parameter konnte eine Assoziation mit dem Überleben gezeigt werden: Weniger Resttumor nach der Staging-Operation, niedrigeres FIGO-Stadium, geringere Aszitesmenge sowie geringeres Alter bei Erstdiagnose (ordinal kategorisiert) gehen in dem untersuchten Kollektiv mit einem besseren Überleben einher. Dies gilt sowohl für das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) als auch für progressionsfreie Überleben (*progression-free survival*, PFS, hier nicht abgebildet).

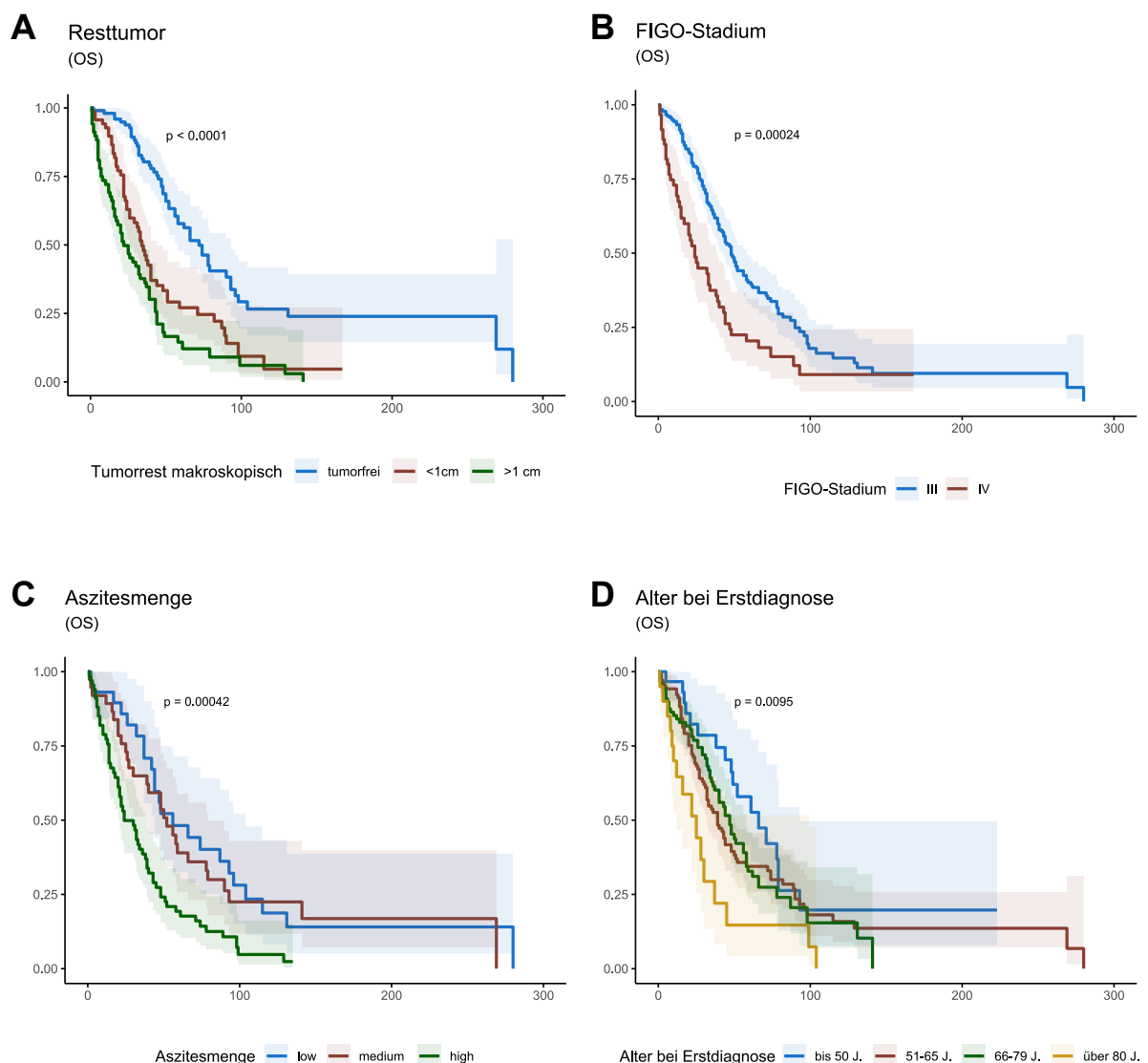


Abbildung 7: Überlebenskurven (Gesamtüberleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit unterschiedlicher klinischer Parameter (A: Resttumor nach Debulking-Operation; B: FIGO-Stadium; C: Aszitesmenge; D: Alter bei Erstdiagnose)

Immunparameter und Überlebenszeiten

Eine univariate Überlebenszeitanalyse wurde zunächst für alle untersuchten Parameter an allen jeweiligen Lokalisationen separat durchgeführt. CD3 und CD8 wurden dichotomisiert untersucht (in den Kategorien „low“ und „high“), für FOXP3 wurden separate Analysen gemacht in der oben genannten Ordinalskala sowie dichotomisiert in die Kategorien „keine Expression“/„Expression“. Die PD-L1-Expression wurde dichotomisiert nach „keine Expression“/„Expression“ untersucht. Die sich dabei abzeichnenden Tendenzen sind in Tabelle 21 und Tabelle 22 zusammengefasst.

OS

Tabelle 21: Übersicht über die Zusammenhänge mit dem Gesamtüberleben der verschiedenen Biomarker an den verschiedenen Lokalisationen (blassgrün: pos. Korrelation mit $p < 0,1$, dunkelgrün: pos. Korrelation mit $p < 0,05$)

	Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	Epithel	Stroma	Epithel	Stroma	Epithel	Stroma
CD3	-	-	positiv	-	positiv	-
CD8	(positiv)	-	positiv	-	-	positiv
FOXP3	(positiv +/-)	-	-	positiv (012)	-	-
	Immunzellen	Tumorzellen	Immunzellen	Tumorzellen	Immunzellen	Tumorzellen
PD-L1	positiv	-	(positiv)	-	-	-

PFS

Tabelle 22: Übersicht über die Zusammenhänge mit dem progressionsfreien Überleben der verschiedenen Biomarker an den verschiedenen Lokalisationen (blassgrün: pos. Korrelation mit $p < 0,1$, dunkelgrün: pos. Korrelation mit $p < 0,05$, blassrot: negative Korrelation mit $p < 0,1$)

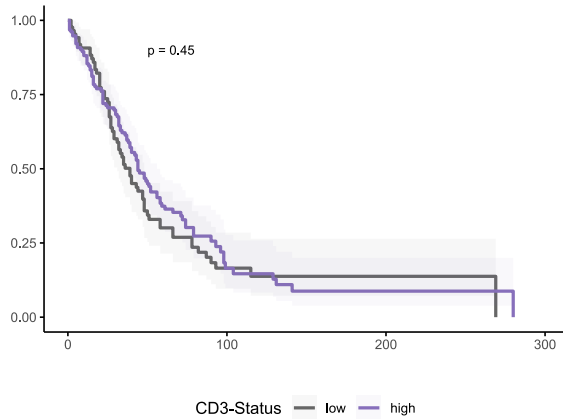
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	Epithel	Stroma	Epithel	Stroma	Epithel	Stroma
CD3	-	-	-	-	positiv	-
CD8	positiv	-	-	-	-	positiv
FOXP3	-	-	-	-	(positiv)	-
	Immunzellen	Tumorzellen	Immunzellen	Tumorzellen	Immunzellen	Tumorzellen
PD-L1	(positiv)	((negativ))	(positiv)	-	-	-

CD3

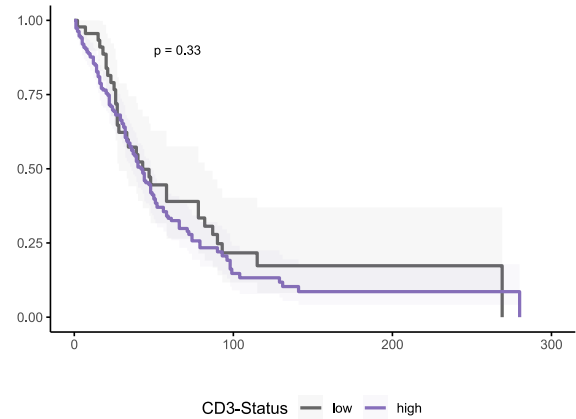
Für die nach „low“/„high“ dichotomisierte CD3-Expression im Haupttumor zeichnet sich weder mit dem PFS noch mit dem OS eine Assoziation ab. Allenfalls bemerkenswert ist eine leichte numerische Tendenz zu einer negativen Assoziation der Expression im Stroma, während es sich im Tumorepithel genau umgekehrt verhält. Für die Metastasen sind bei insgesamt geringerer Fallzahl die Ausprägungen im Stroma sehr ungleich verteilt, hier deuten sich keine prognostischen Tendenzen an. Epithelial ist die Expression für beide Lokalisationen positiv mit dem OS assoziiert, für das Omentum außerdem auch mit dem PFS (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9)

Bei der isolierten Betrachtung derjenigen Fälle mit Resektionsstatus R0 sind diese Effekte noch deutlicher zu erkennen. Bei der alleinigen Betrachtung von Fällen, bei denen kein R0 erreicht werden konnte, lässt sich kein Überlebensvorteil erkennen.

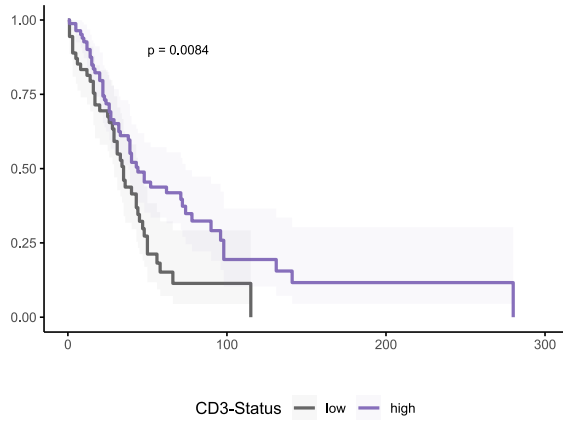
A CD3 - HT Epithel (OS)



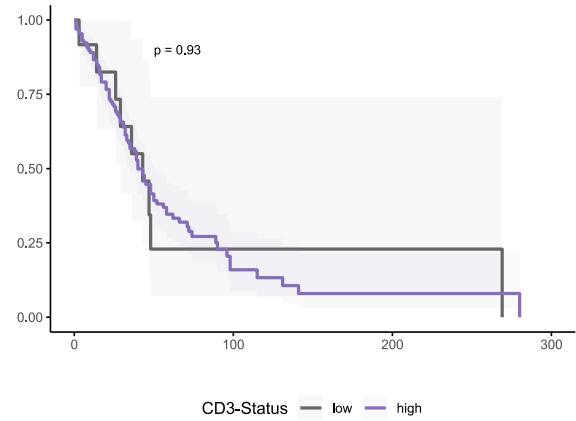
B CD3 - HT Stroma (OS)



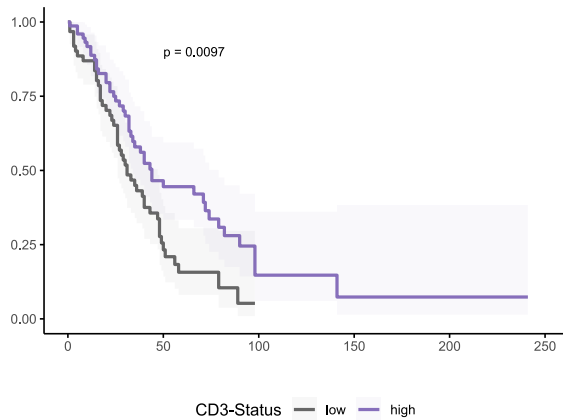
C CD3 - PE Epithel (OS)



D CD3 - PE Stroma (OS)



E CD3 - OM Epithel (OS)



F CD3 - OM Stroma (OS)

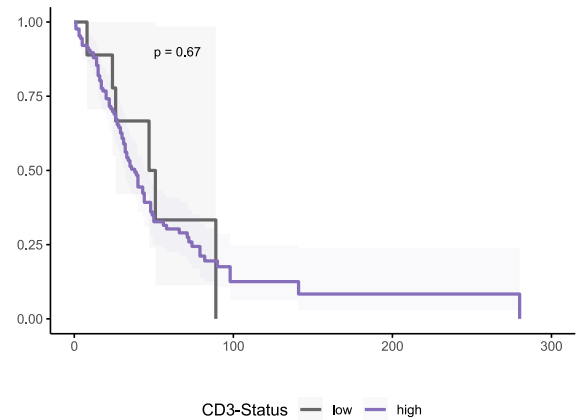


Abbildung 8: Überlebenskurven (Gesamtüberleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der epithelialen (links) und stromalen (rechts) CD3-Expressionsrate in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentummetastase

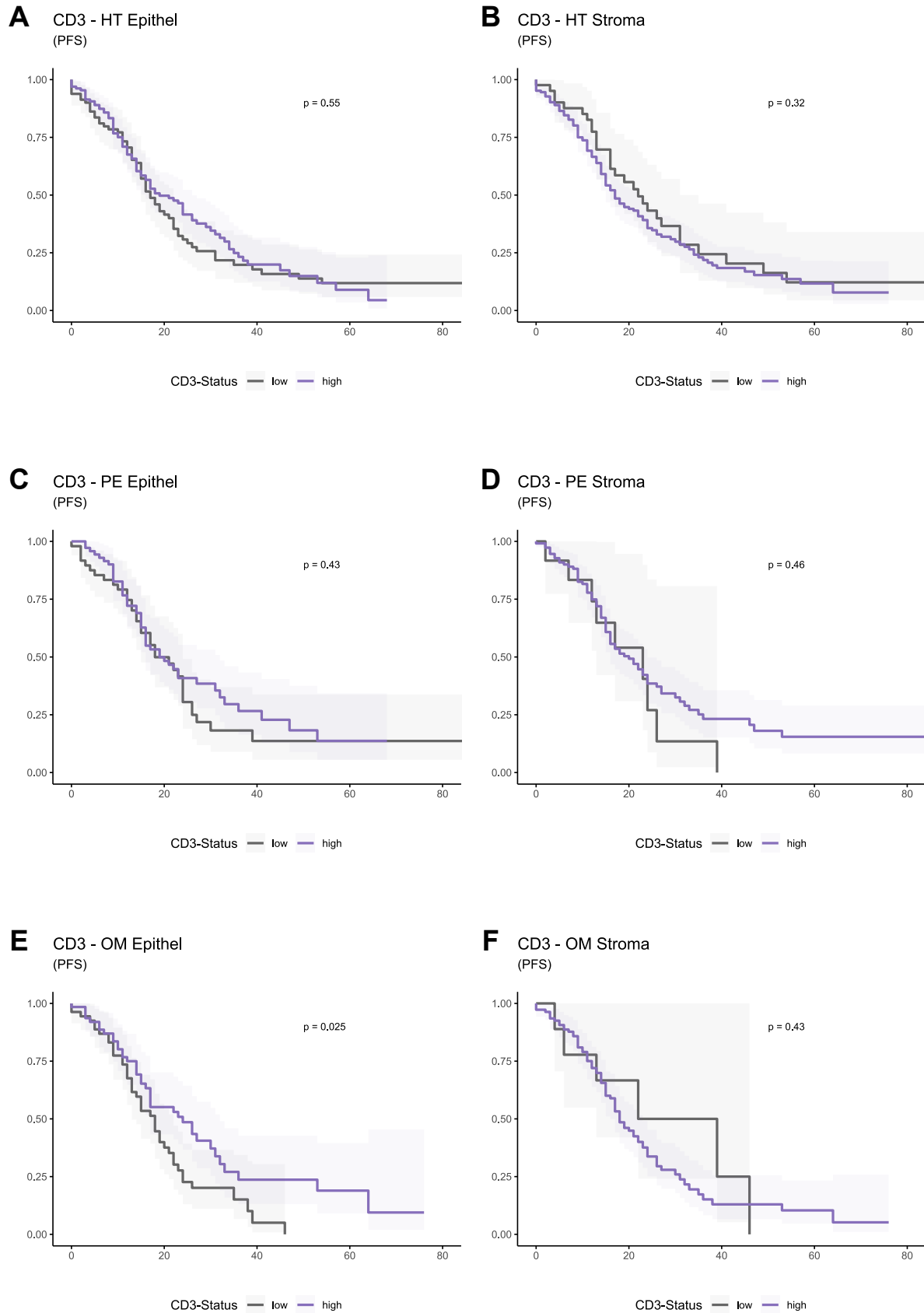


Abbildung 9: Überlebenskurven (Progressionsfreies Überleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der epithelialen (links) und stromalen (rechts) CD3-Expressionsrate in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentummetastase

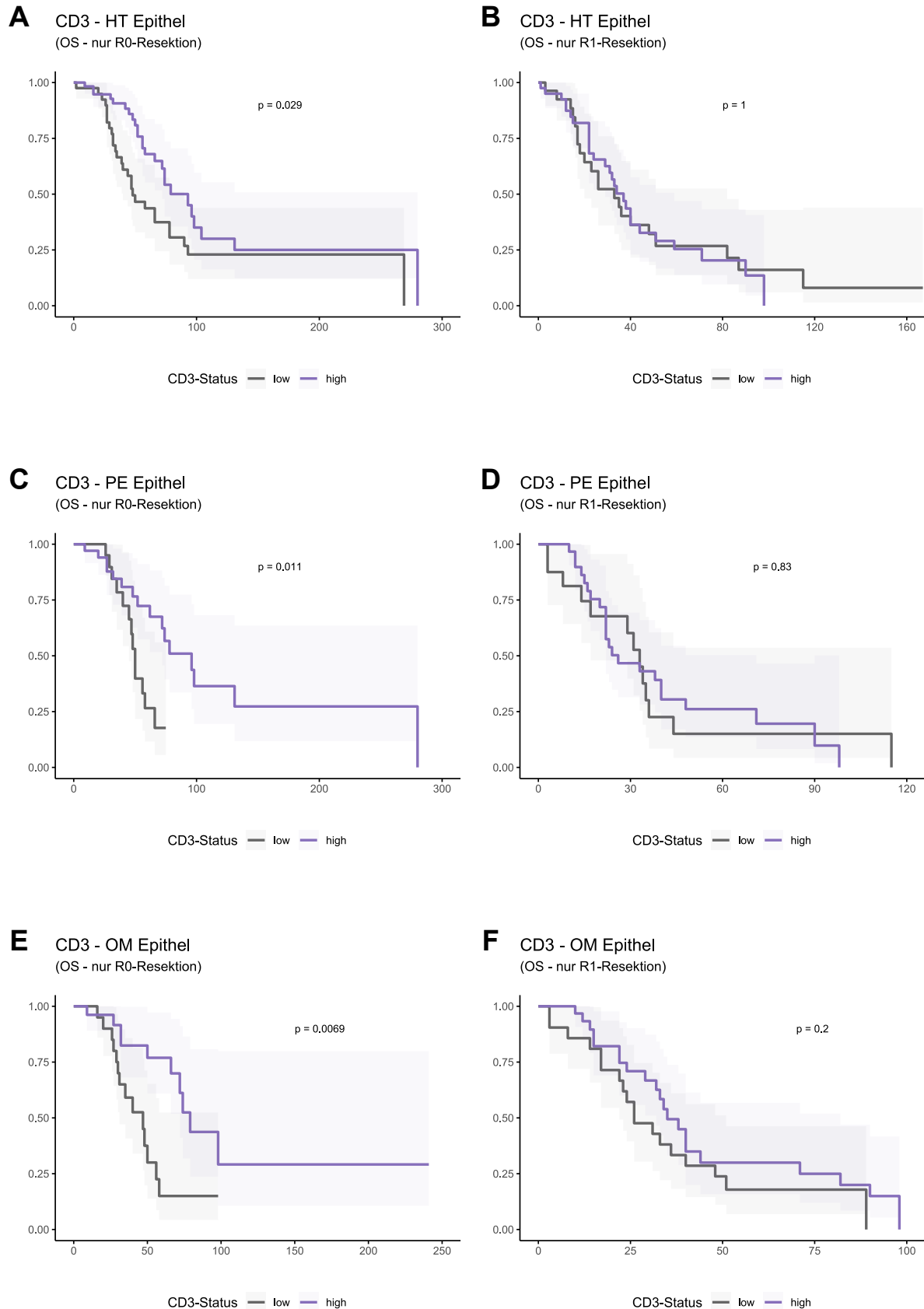


Abbildung 10: Überlebenskurven (Gesamtüberleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der epithelialen CD3-Expressionsrate je nach Resektionsstatus (R0: links, R1: rechts) in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentum

CD8

Die nach „low“/„high“ dichotomisierte CD8-Expression zeigt im Epithel des Haupttumors eine Tendenz zur positiven Assoziation mit dem OS und PFS. Stromal zeichnet sich keine Assoziation ab. Für die Omentummetastasen scheint eine positive Assoziation im Stroma ausgeprägter zu sein als epithelial (vor allem PFS), genau umgekehrt ist es in den Peritonealmetastasen (hier v.a. OS) (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12).

Bei der isolierten Betrachtung derjenigen Fälle mit Resektionsstatus R0 kann ein signifikanter Überlebensvorteil für eine als „high“ klassifizierte CD8-Expression für den Ovarialtumor sowie die Omentummetastasen festgestellt werden. Bei der alleinigen Betrachtung von Fällen, bei denen makroskopisch keine Tumorfreiheit erreicht werden konnte, lässt sich kein Überlebensvorteil erkennen (siehe Abbildung 13).

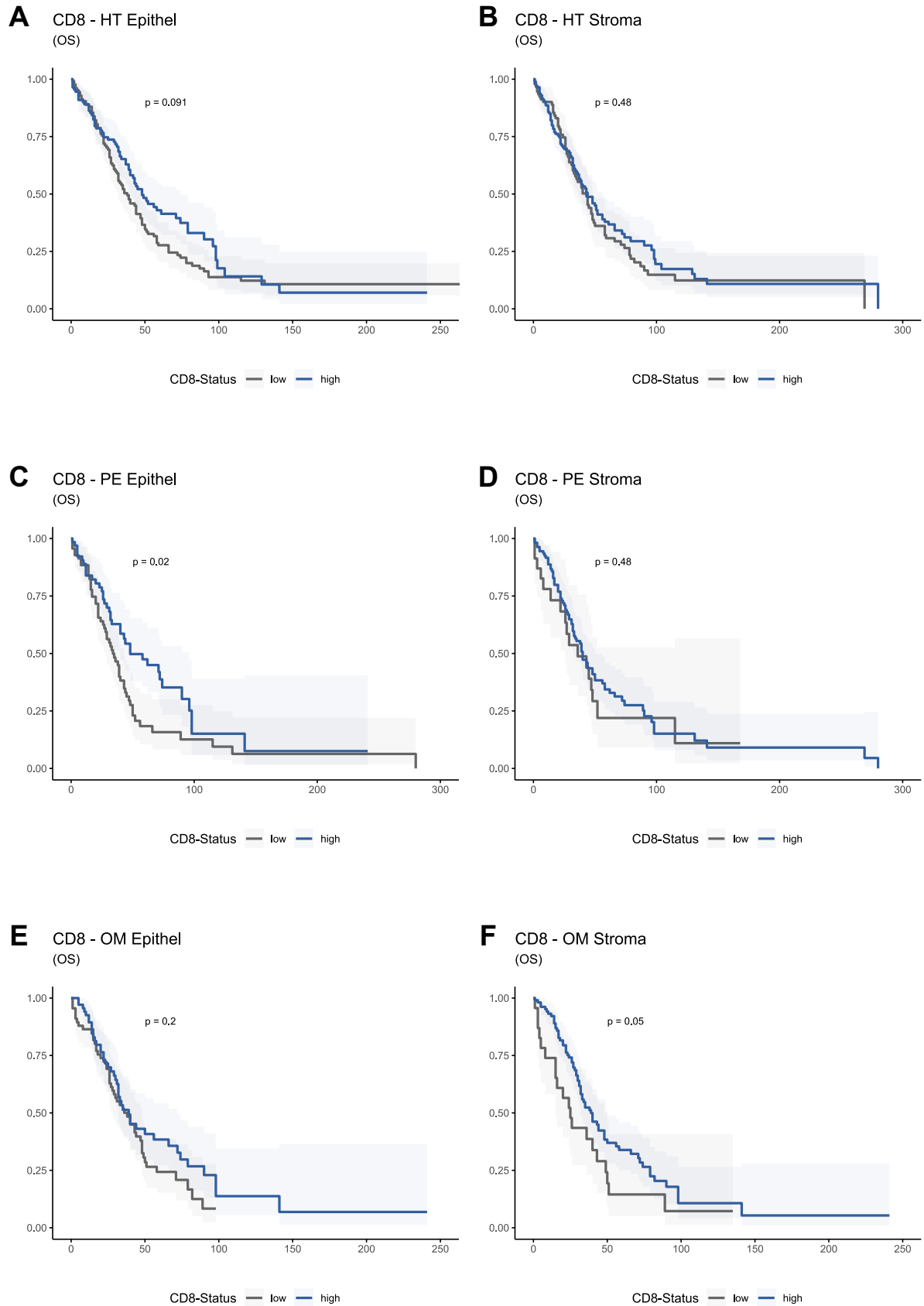


Abbildung 11: Überlebenskurven (Gesamtüberleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der epithelialen (links) und stromalen (rechts) CD8-Expressionsrate in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentummetastase

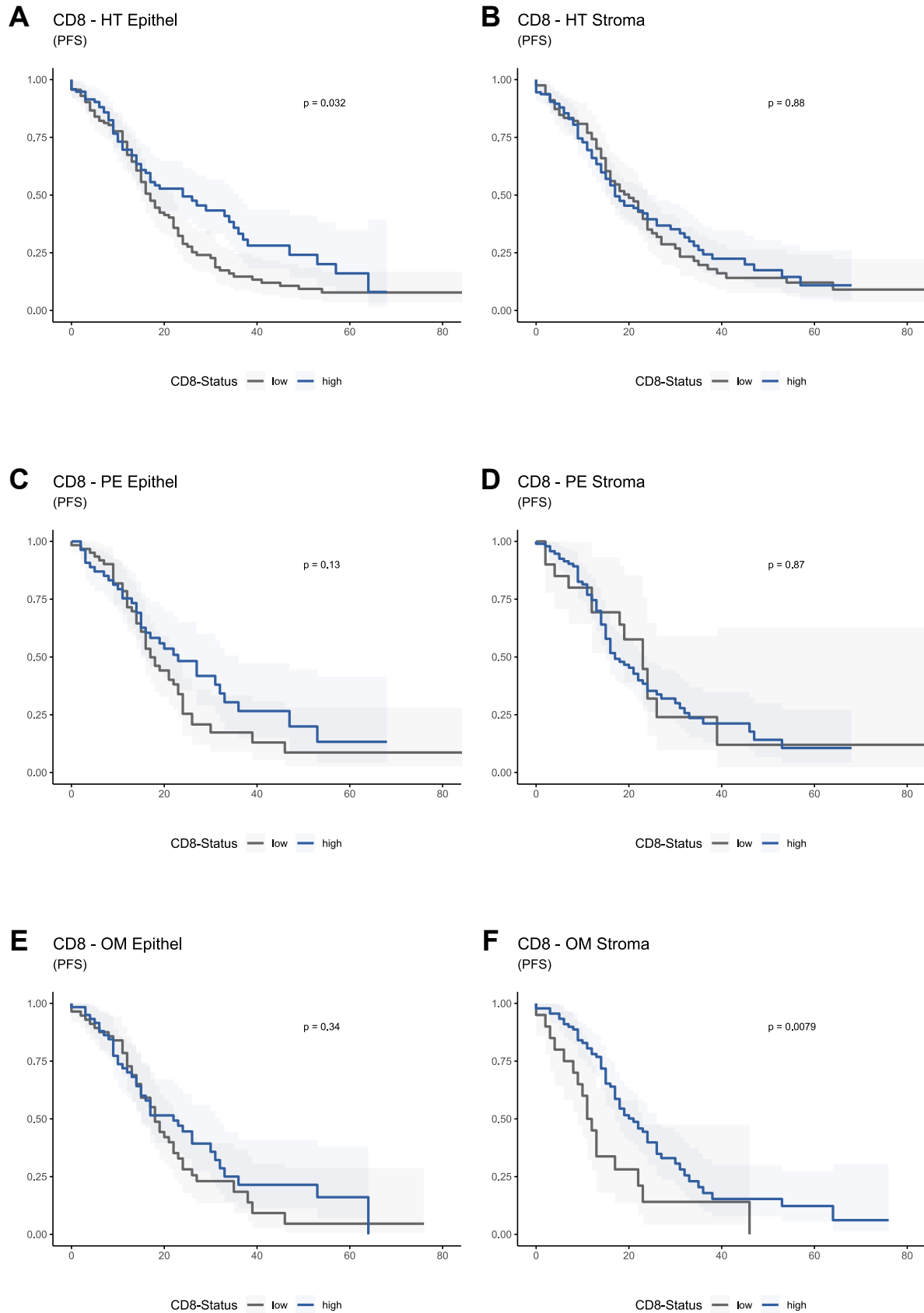


Abbildung 12: Überlebenskurven (Progressionsfreies Überleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der epithelialen (links) und stromalen (rechts) CD8-Expressionsrate in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentummetastase

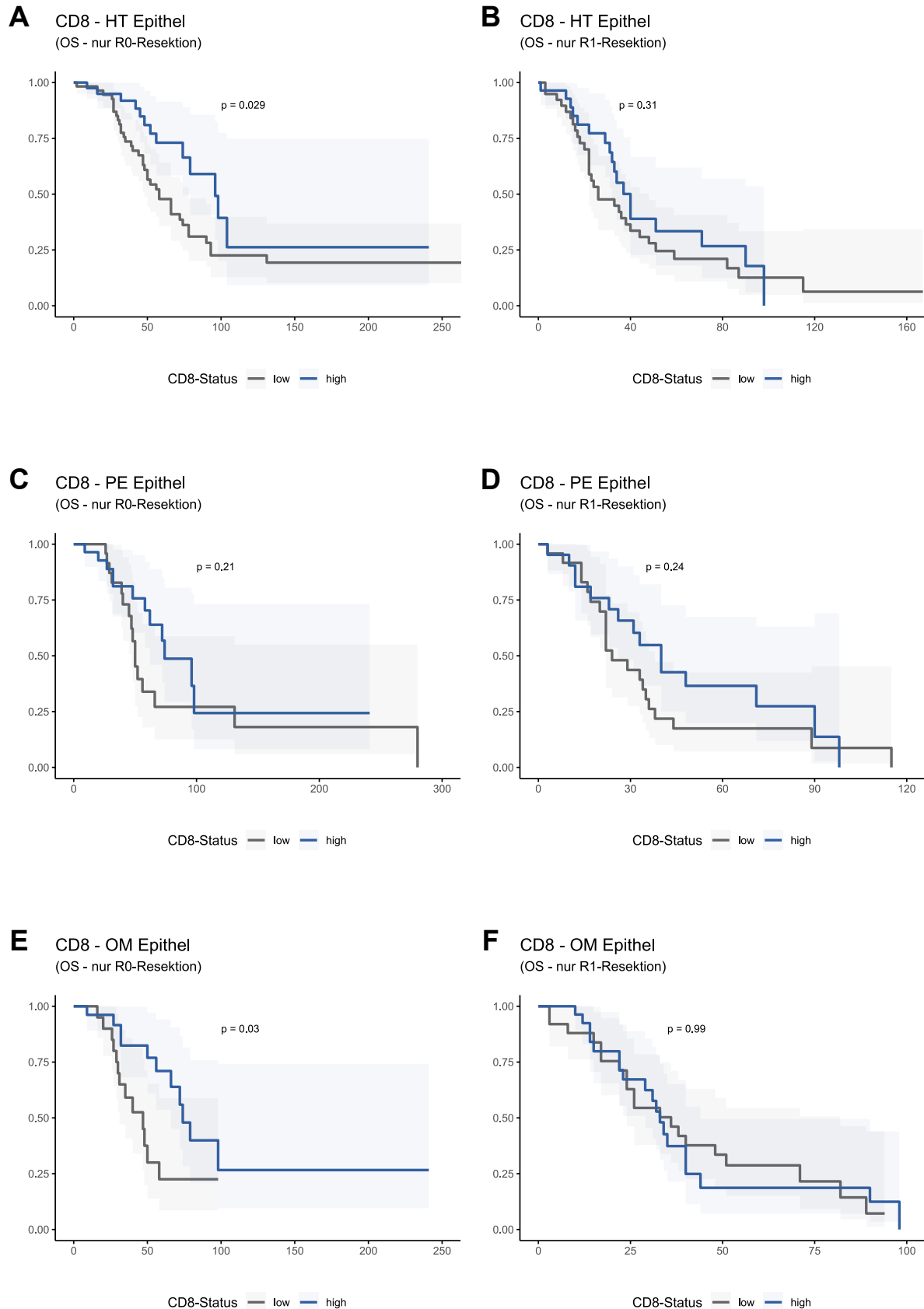


Abbildung 13: Überlebenskurven (Gesamtüberleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der epithelialen CD8-Expressionsrate je nach Resektionsstatus (R0: links, R1: rechts) in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentum

FOXP3

Die nach „negativ“/„positiv“ dichotomisierte FOXP3-Expression scheint in allen Lokalisationen tendenziell eher positiv mit dem Überleben assoziiert zu sein, die Unterschiede sind allerdings geringfügig. Betrachtet man die ordinalskalierte FOXP3-Expression („negativ“, „low“, „high“) so lässt sich allenfalls feststellen, dass zumeist eine hohe Expression verglichen mit keiner Expression mit einem verbesserten Überleben assoziiert ist, relevante Assoziationen finden sich aber nicht, sodass eine prognostische Einordnung einer niedrigen Expression nicht möglich ist (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15).

Ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben abhängig von der FOXP3-Expression im Haupttumorgewebe zeigt sich bei der alleinigen Betrachtung derjenigen Fälle, in denen eine makroskopische Tumorfreiheit (R0) erreicht werden konnte. Hier ist eine höhere Expression mit einem längeren Überleben assoziiert. Für die Metastasengewebe konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Für die Fälle mit R1-Status ergab sich ebenfalls kein Zusammenhang der FOXP3-Expression mit dem Überleben (siehe Abbildung 16).

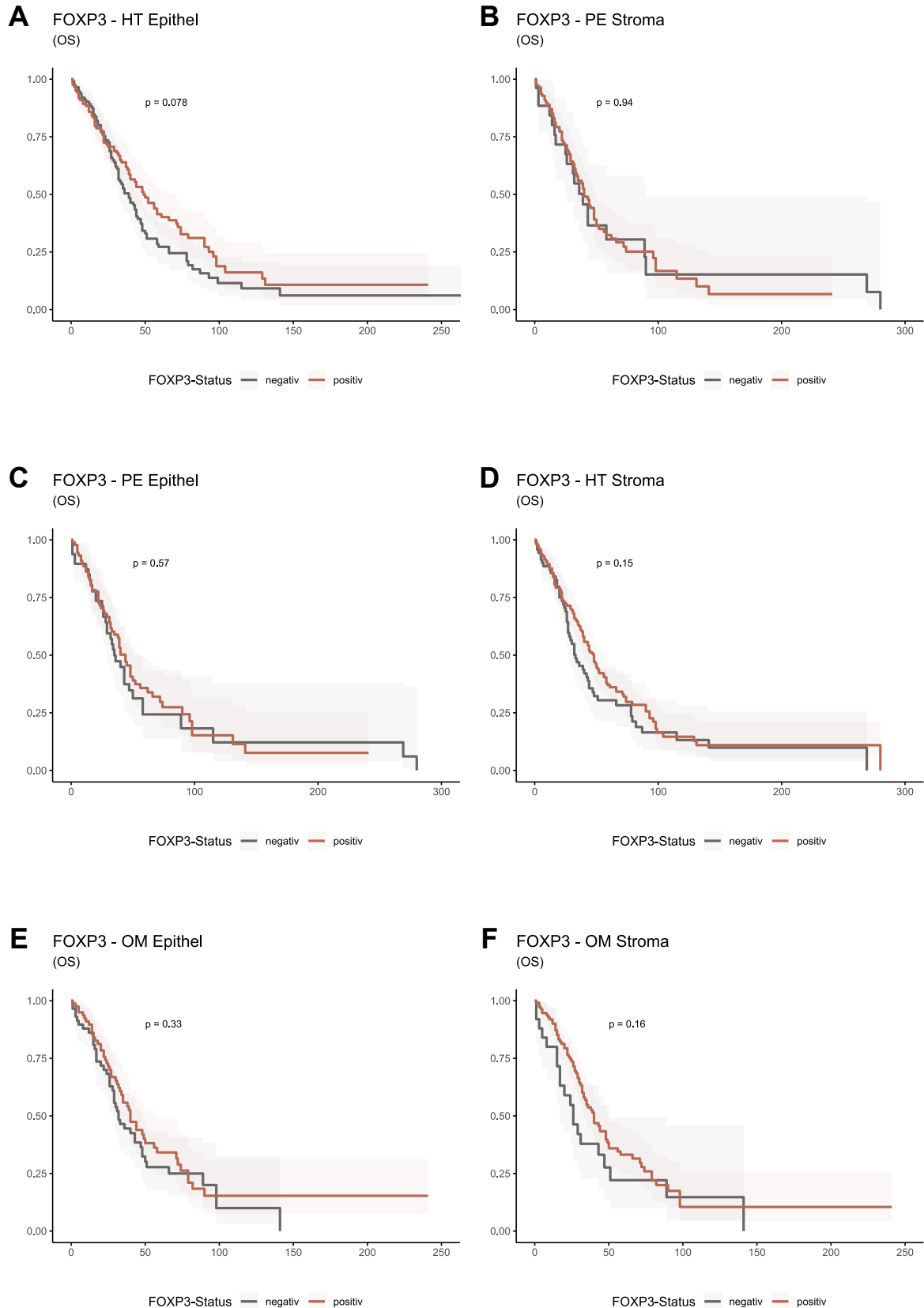


Abbildung 14: Überlebenskurven (Gesamtüberleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der epithelialen (links) und stromalen (rechts) FOXP3-Expressionsrate (dichotomisiert nach negativ/positiv) in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentummetastase

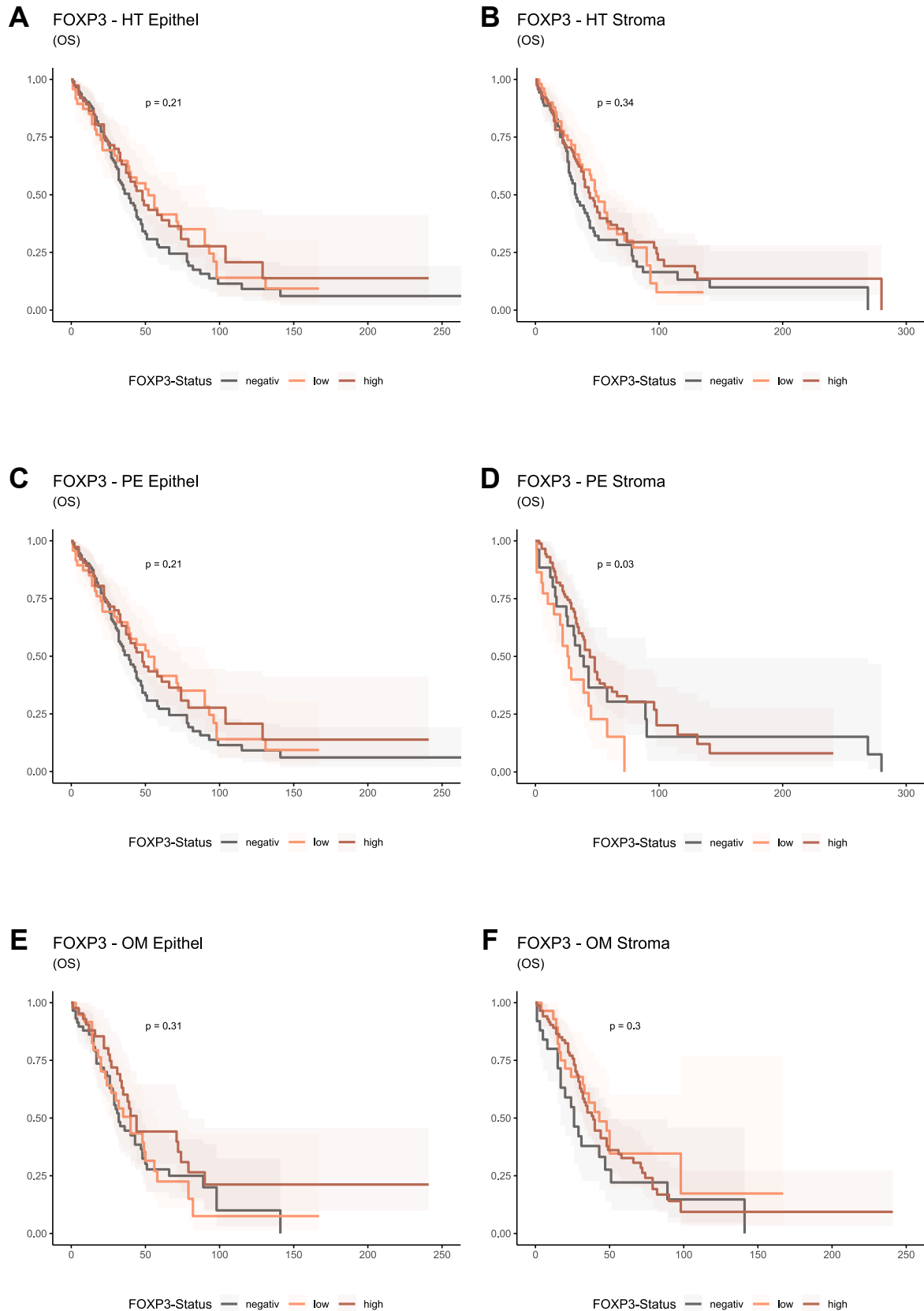


Abbildung 15: Überlebenskurven (Gesamtüberleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der epithelialen (links) und stromalen (rechts) FOXP3-Expressionsrate (gruppiert in „negativ“/„low“/„high“) in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentummetastase

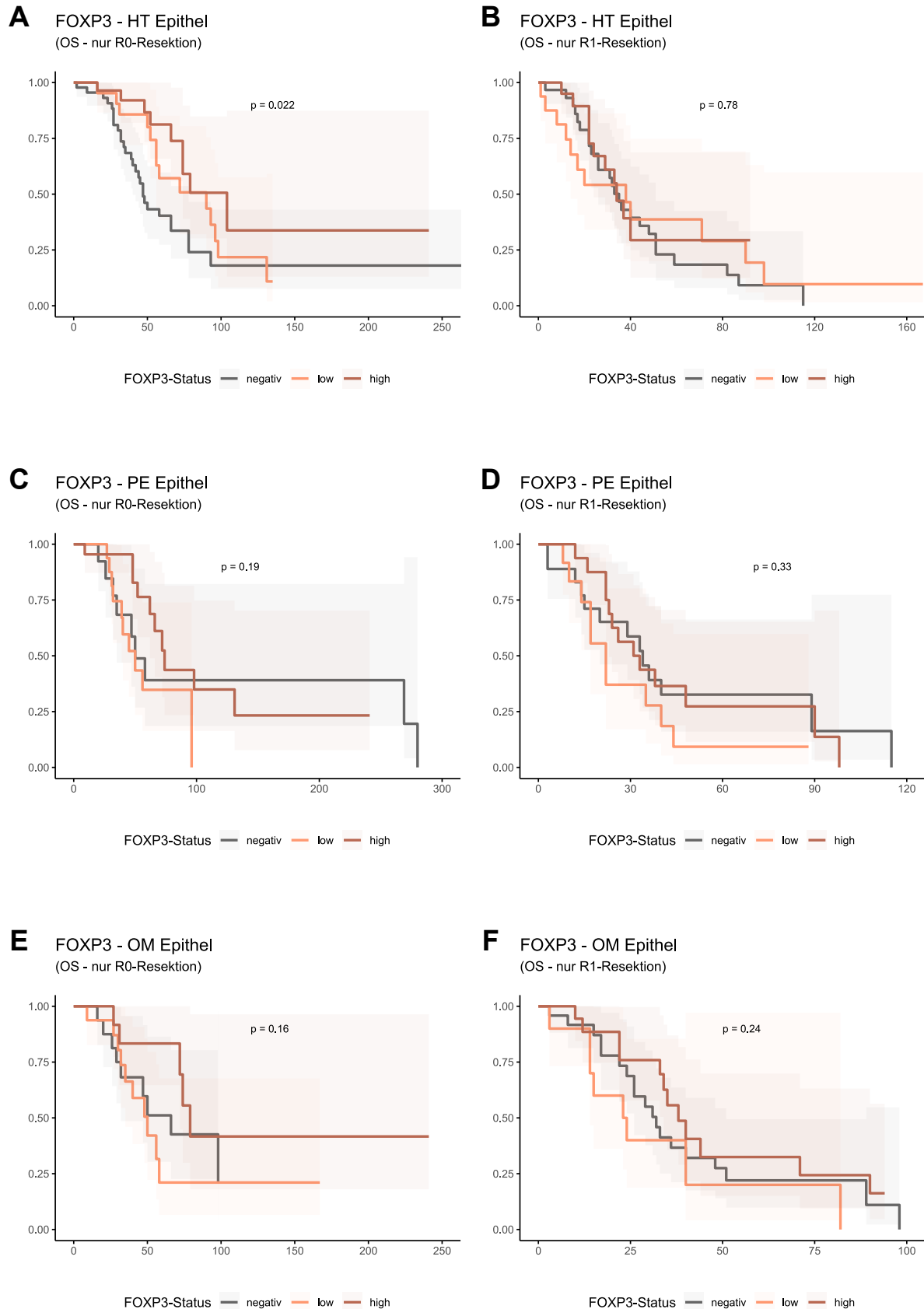


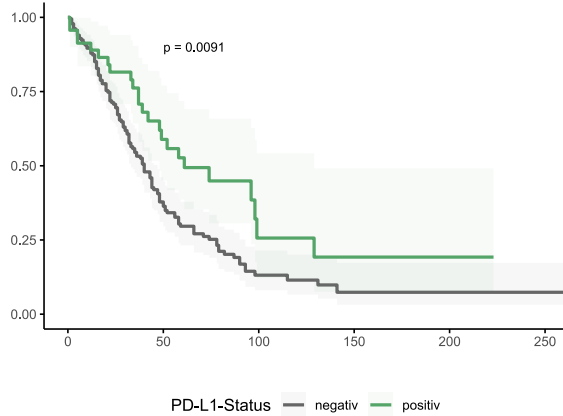
Abbildung 16: Überlebenskurven (Gesamtüberleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der epithelialen FOXP3-Expressionsrate je nach Resektionsstatus (R0: links, R1: rechts) in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentum

PD-L1

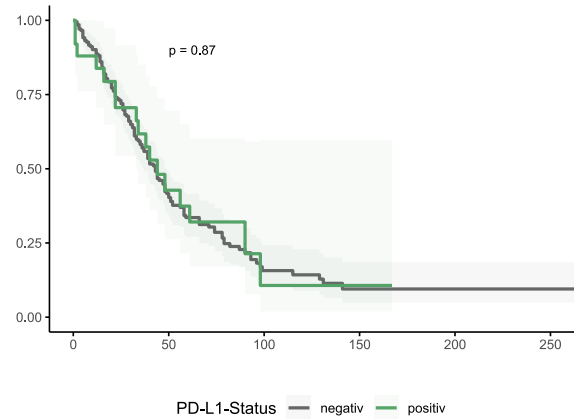
Für die PD-L1-Expression auf Immunzellen zeichnet sich im Haupttumorgewebe eine positive Assoziation mit dem Überleben ab. Demgegenüber ist für die Expression auf Tumorzellen für das OS keine Assoziation, für das PFS tendenziell eine negative Assoziation zu erkennen. In den beiden Metastasenlokalisationen war eine Expression auf Tumorzellen nur in wenigen Fällen zu verzeichnen, es besteht hier also eine große Fallzahlendifferenz zwischen den Subgruppen mit einer Expression und denen ohne Expression. Die Expression auf Immunzellen zeigt allenfalls für die Peritonealmetastasen eine positive Tendenz, für die Omentummetastasen ist keine Assoziation erkennbar (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18).

Bei der separaten Betrachtung der Fälle mit und ohne makroskopischen Tumorrest konnte für keine der beiden Gruppen ein Zusammenhang der PD-L1-Expression mit dem Überleben festgestellt werden, dies gilt sowohl für die Expression in Immun- als auch in Tumorzellen (siehe Abbildung 19).

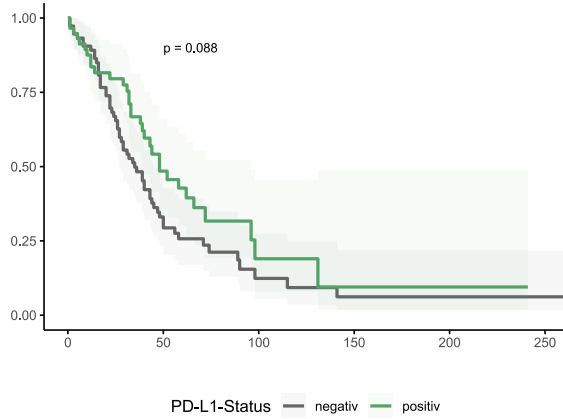
A PD-L1 - HT Immunzellen
(OS)



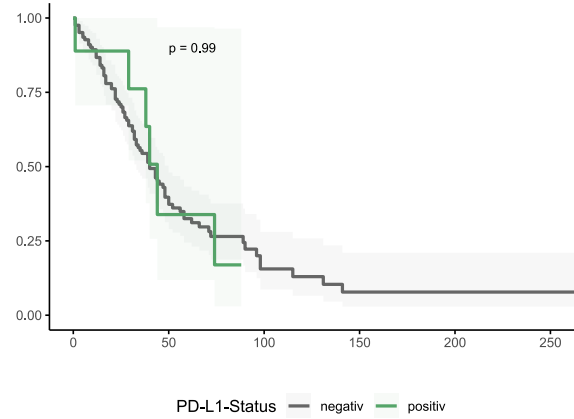
B PD-L1 - HT Tumorzellen
(OS)



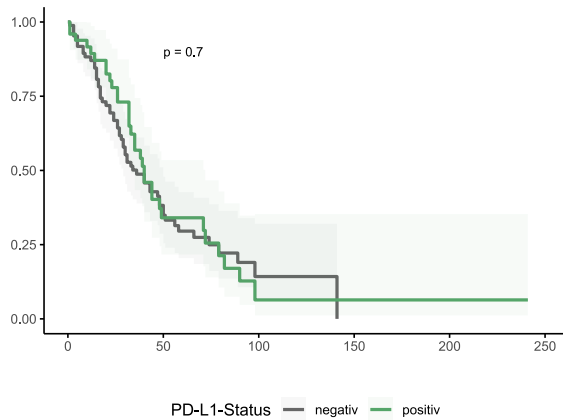
C PD-L1 - PE Immunzellen
(OS)



D PD-L1 - PE Tumorzellen
(OS)



E PD-L1 - OM Immunzellen
(OS)



F PD-L1 - OM Tumorzellen
(OS)

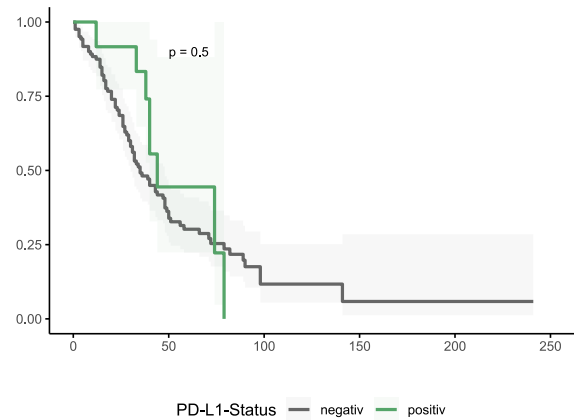


Abbildung 17: Überlebenskurven (Gesamtüberleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der PD-L1-Expressionsrate in Immun-(links) und Tumorzellen (rechts) in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentummetastase

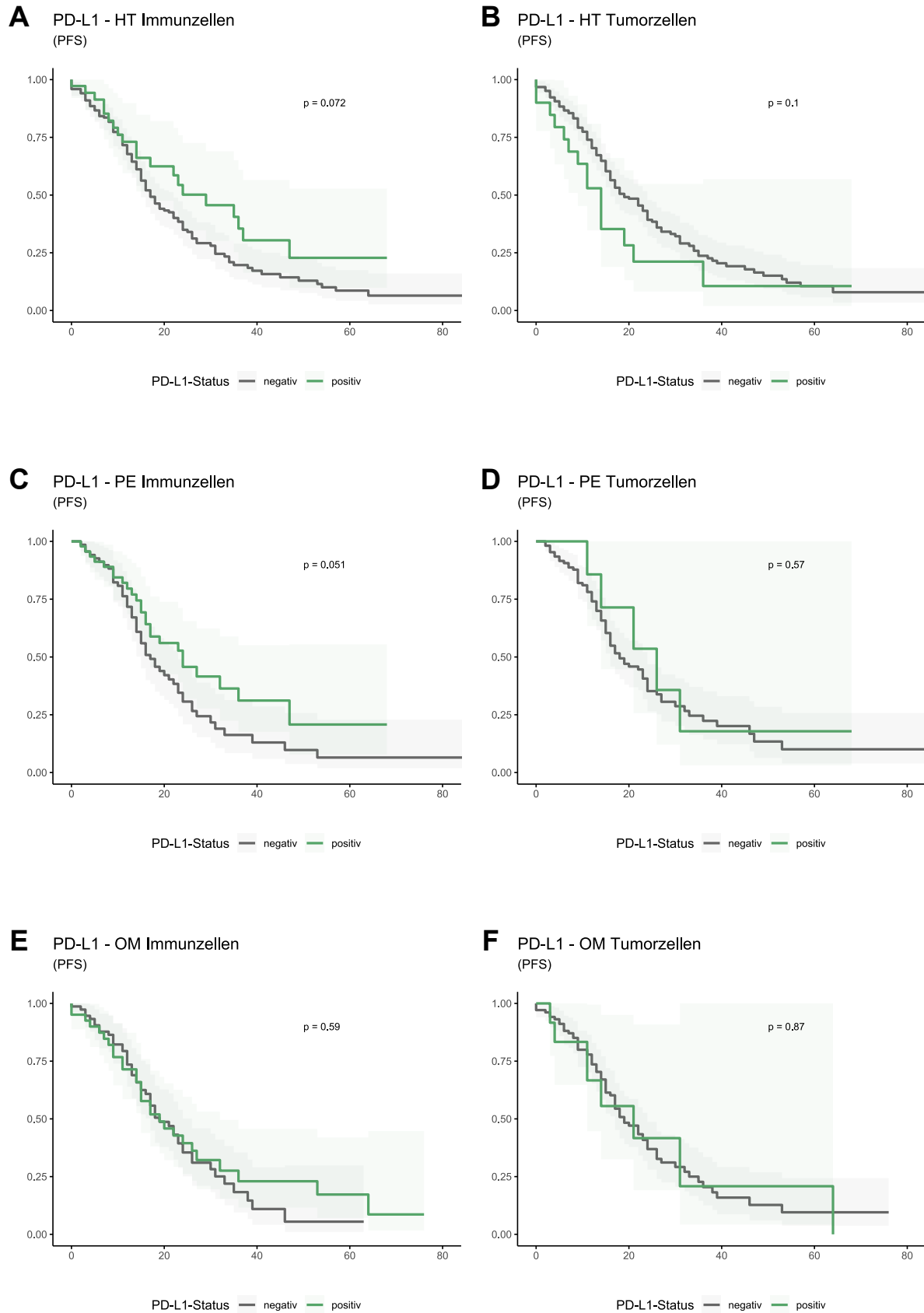
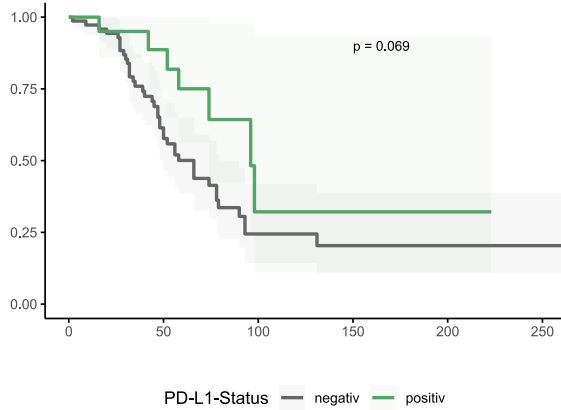
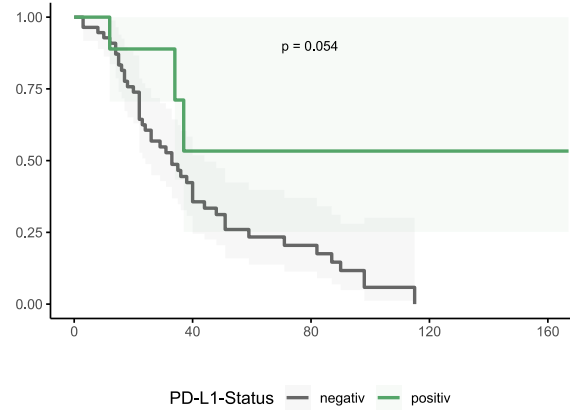


Abbildung 18: Überlebenskurven (Progressionsfreies Überleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der PD-L1-Expressionsrate in Immun-(links) und Tumorzellen (rechts) in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentummetastase

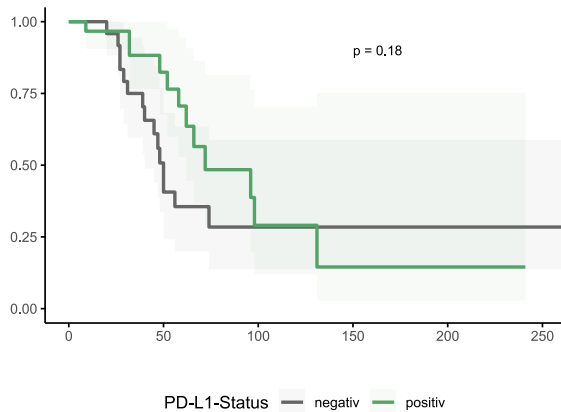
A PD-L1 - HT Immunzellen
(OS - nur R0-Resektion)



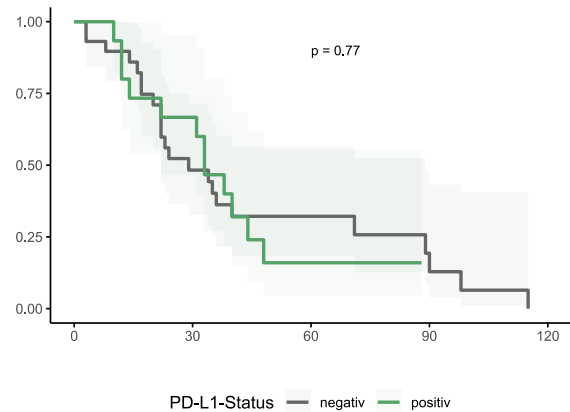
B PD-L1 - HT Immunzellen
(OS - nur R1-Resektion)



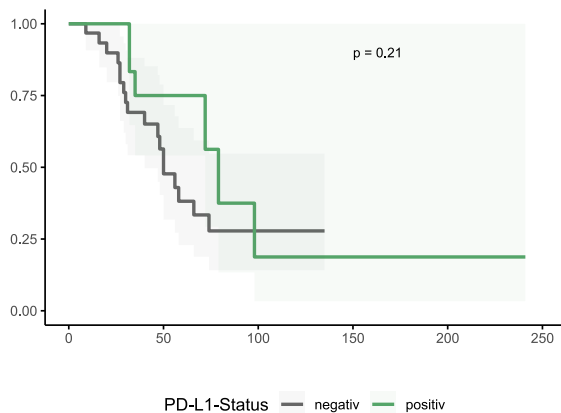
C PD-L1 - PE Immunzellen
(OS - nur R0-Resektion)



D PD-L1 - PE Immunzellen
(OS - nur R1-Resektion)



E PD-L1 - OM Immunzellen
(OS - nur R0-Resektion)



F PD-L1 - OM Immunzellen
(OS - nur R1-Resektion)

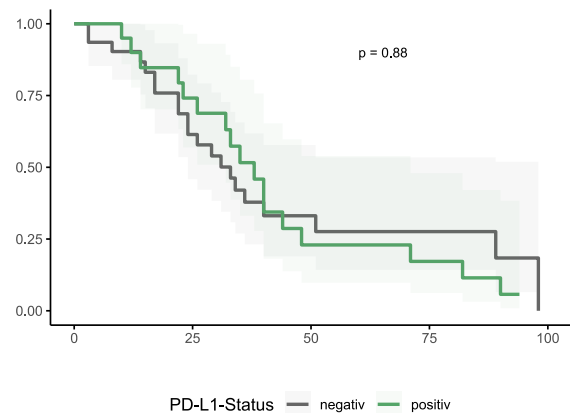


Abbildung 19: Überlebenskurven (Gesamtüberleben) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der PD-L1-Expressionsrate je nach Resektionsstatus (R0: links, R1: rechts) in den unterschiedlichen Lokalisationen. A, B: Ovarialtumor; C, D: Peritonealmetastase; E, F: Omentum

6.3 Zusammenhang zwischen den Anteilen exprimierender Zellen der unterschiedlichen Immun-Marker an den jeweiligen Lokalisationen

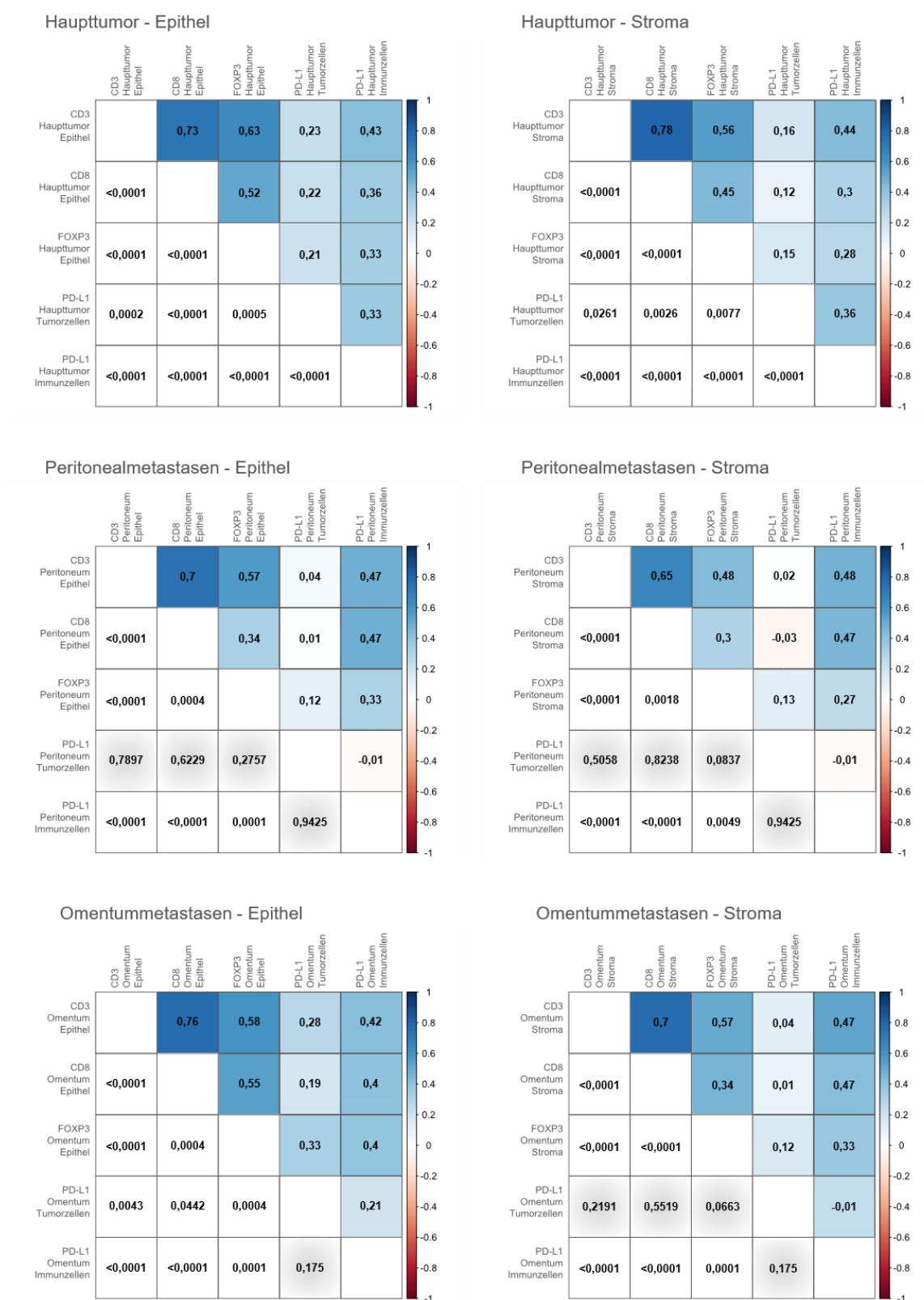


Abbildung 20: Korrelationstabellen der verschiedenen Immunmarker untereinander, nach Lokalisation, rechte obere Hälfte: Korrelationskoeffizienten nach Spearman, linke untere Hälfte: jeweilige P-Werte

Untersucht wurden die Korrelationen der verschiedenen Marker untereinander an sechs unterschiedlichen Lokalisationen: Jeweils epithelial sowie stromal in Haupttumor, Peritonealmetastasen, Omentummetastasen. Es fällt auf, dass an allen Lokalisationen die stärkste Korrelation zwischen den Expressionsraten von CD3 und CD8 besteht. Ebenfalls stark korreliert ist an allen genannten Lokalisationen die CD3-Expressionsrate mit der von FOXP3. Etwas weniger stark, aber dennoch deutlich und mit einem p-Wert unter 0,05 korrelieren in allen Lokalisationen die Expressionsraten von CD8 und FOXP3. Diese Assoziation ist am stärksten in Haupttumor und Omentum ausgeprägt, und hier jeweils etwas stärker epithelial als stromal. In den Peritonealmetastasen ist diese Korrelation sowohl epithelial als auch stromal dazu verglichen kleiner. Die Expressionsrate von PD-L1 auf Immunzellen korreliert in allen Lokalisationen mittelgradig mit der Expressionsrate von CD3. Die Korrelation der PD-L1-Expressionsrate mit der von CD8 ist dazu verglichen insgesamt in allen Lokalisationen etwas geringer, jedoch in den Metastasenlokalisationen deutlicher als im Haupttumorgewebe. Die Korrelation der PD-L1-Expressionsrate mit der FOXP3-Expressionsrate ist in den Omentummetastasen etwas ausgeprägter als im Haupttumor und Peritonealmetastasen. Bemerkenswerterweise zeigte sich im Haupttumorgewebe eine schwache Korrelation zwischen der PD-L1-Expression in Immun- und Tumorzellen, während dies in den Metastasen nicht der Fall ist.

6.4 Zusammenhang der Anteile exprimierender Zellen der untersuchten Immun-Marker zwischen den jeweiligen Lokalisationen

CD3

Die CD3-Expression korreliert am stärksten zwischen den epithelialen und stromalen Geweben an der jeweiligen Lokalisation. Diese Assoziation ist am ausgeprägtesten im Haupttumor. Auffällig ist eine deutliche Korrelation zwischen der epithelialen Expression im Haupttumor- und Omentumgewebe, die Korrelation zwischen der Expression in Haupttumor- und peritonealem Tumorepithel ist im Vergleich etwas geringer. Im Stroma ist die Korrelation zwischen Expression in Haupttumor und den Metastasen jeweils geringfügig kleiner als epithelial, auch hier scheint die Assoziation zwischen Omentummetastasen und Haupttumor größer als die zwischen Peritonealmetastasen und Haupttumor. Die Metastasen untereinander

haben stromal eine höhere Assoziation bzgl. der CD3-Infiltration als epithelial. Insgesamt scheint die CD3-Expression aber in allen Lokalisationen miteinander schwach bis mittelgradig assoziiert zu sein (siehe Abbildung 21). Bei der Betrachtung der Fallzahlen beim Vergleich von zwei Lokalisationen fällt trotz dieser Korrelation direkt ins Auge, dass eine beträchtliche Anzahl von Fällen eine heterogene Expression aufweist, also in einer Lokalisation als „high“ gewertet wurde und in der verglichenen Lokalisation als „low“ und umgekehrt. So können jeweils vier Gruppen voneinander abgegrenzt werden: zum einen jeweils eine mit homogen niedriger und homogen hoher CD3-Expression, zum anderen jeweils zwei Subgruppen mit in den Lokalisationen unterschiedlicher CD3-Expression (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23).

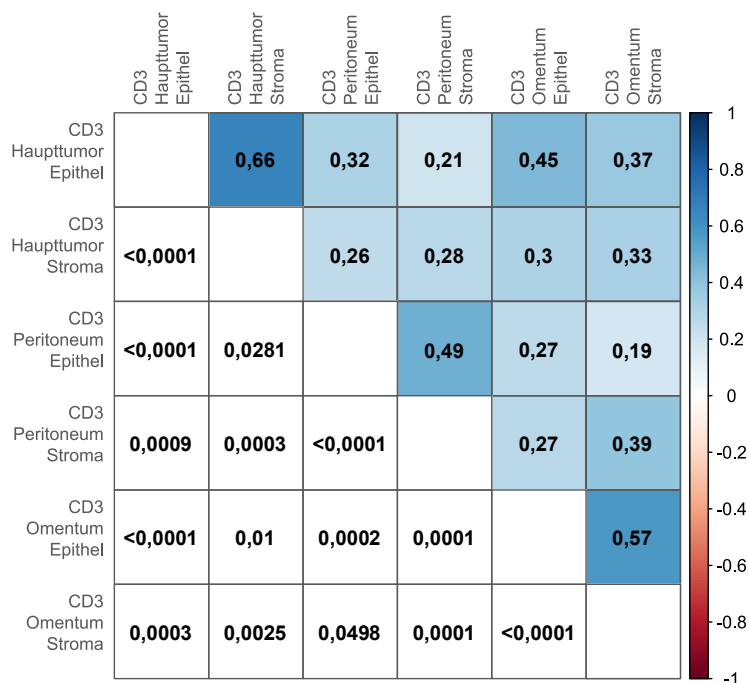


Abbildung 21: Korrelationstafel der CD3-Expression zwischen verschiedenen Lokalisationen, rechte obere Hälfte: Korrelationskoeffizienten nach Spearman, linke untere Hälfte: jeweilige P-Werte

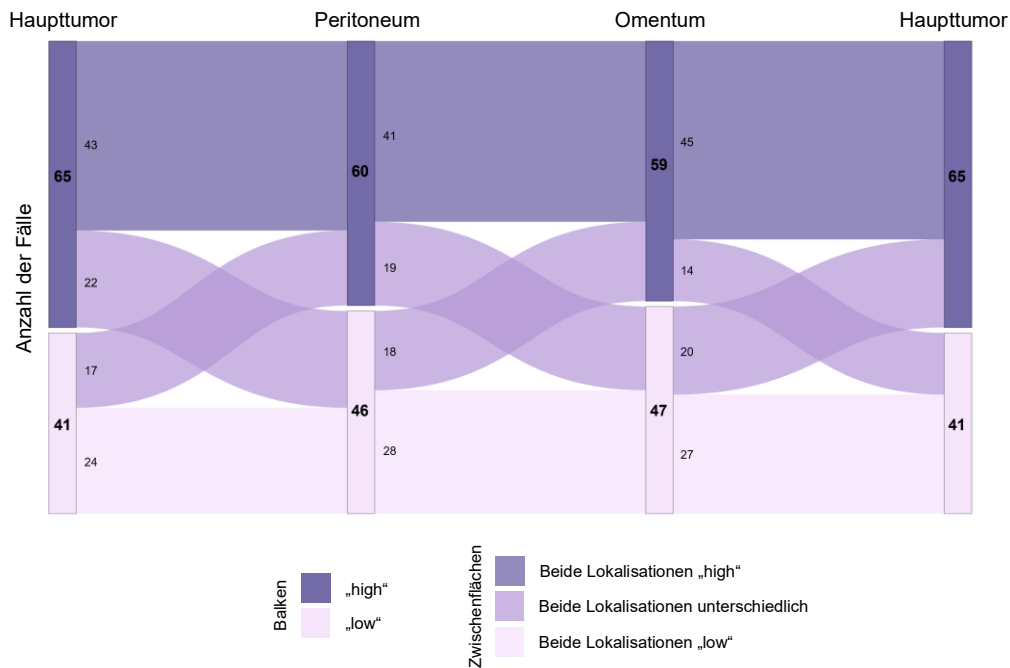


Abbildung 22: Sankey-Diagramm zur CD3-Expression (Epithel) der verschiedenen Lokalisationen, dichotomisiert nach „low“ und „high“ („low“: 0% Expression und vereinzelte exprimierende Zellen, „high“: >1% Expressionsrate). Untersucht wurden ausschließlich Fälle, für die zu allen Lokalisationen die nötigen Daten vorhanden waren. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der Fälle in den Balken für die angegebene Lokalisation und in den Flächen zwischen den Balken die Fälle, die jeweils links und rechts den angrenzenden Balkenabschnitten zugeordnet sind.

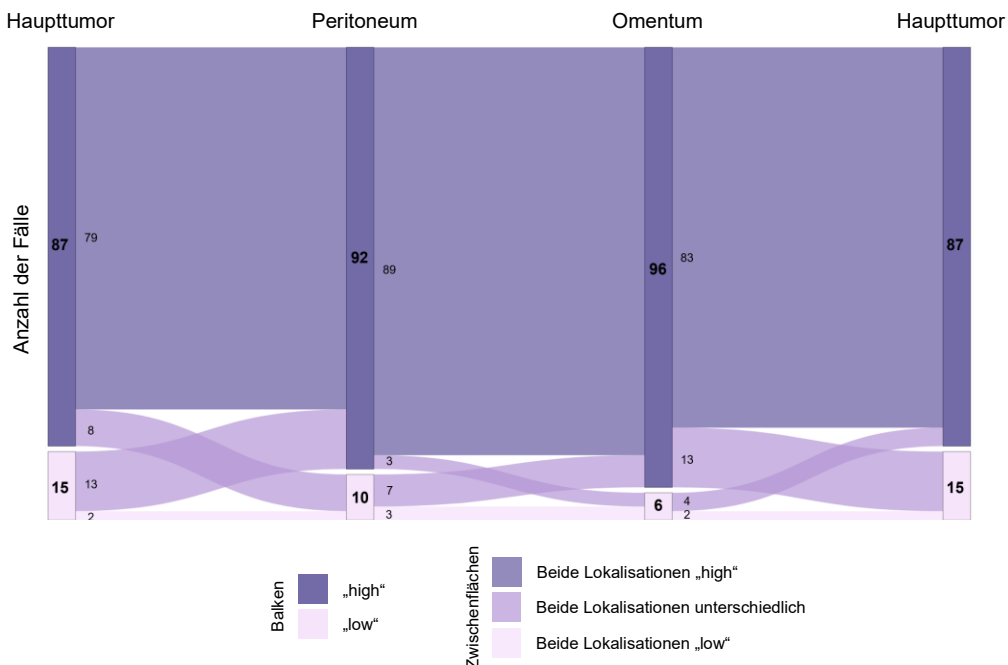


Abbildung 23: Sankey-Diagramm zur CD3-Expression (Stroma) der verschiedenen Lokalisationen, dichotomisiert nach „low“ und „high“ („low“: 0% Expression und vereinzelte exprimierende Zellen, „high“: >1% Expressionsrate). Untersucht wurden ausschließlich Fälle, für die zu allen Lokalisationen die nötigen Daten vorhanden waren. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der Fälle in den Balken für die angegebene Lokalisation und in den Flächen zwischen den Balken die Fälle, die jeweils links und rechts den angrenzenden Balkenabschnitten zugeordnet sind.

CD8

Ähnliche Assoziationen präsentieren sich in der Analyse der CD8-Expression. Hier ist die Korrelation zwischen der epithelialen omentalen Expression mit der im Haupttumor wieder geringfügig stärker als die mit der peritonealen. Im Stroma ähneln sich die beiden Korrelationen. Auffällig ist im Vergleich zu CD3, dass die Korrelation zwischen den beiden Metastasen stromal ausgeprägter zu sein scheint als epithelial (siehe Abbildung 24 bis Abbildung 26).

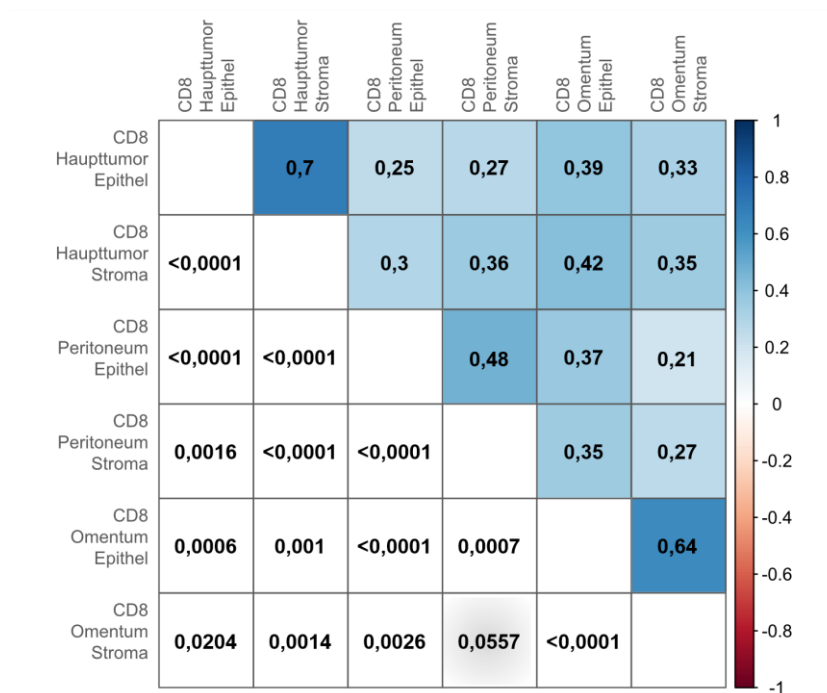


Abbildung 24: Korrelationstafel der CD8-Expression zwischen verschiedenen Lokalisationen, rechte obere Hälfte: Korrelationskoeffizienten nach Spearman, linke untere Hälfte: jeweilige P-Werte, grau hinterlegt: P-Werte < 0,05

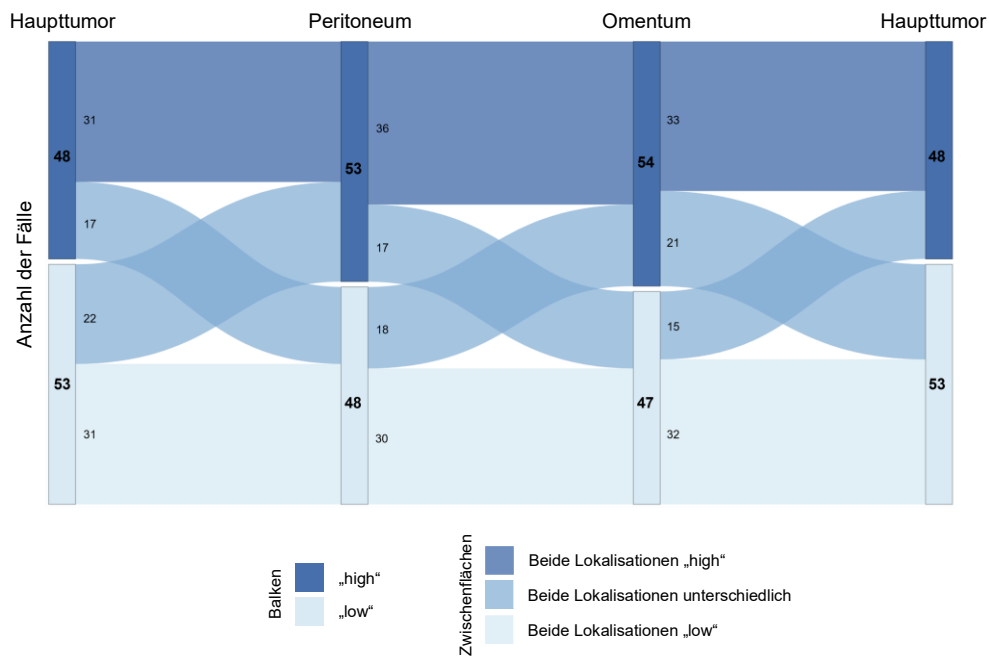


Abbildung 25: Sankey-Diagramm zur CD8-Expression (Epithel) der verschiedenen Lokalisationen, dichotomisiert nach „low“ und „high“ („low“: 0% Expression und vereinzelte exprimierende Zellen, „high“: >1% Expressionsrate). Untersucht wurden ausschließlich Fälle, für die zu allen Lokalisationen die nötigen Daten vorhanden waren. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der Fälle in den Balken für die angegebene Lokalisation und in den Flächen zwischen den Balken die Fälle, die jeweils links und rechts den angrenzenden Balkenabschnitten zugeordnet sind.

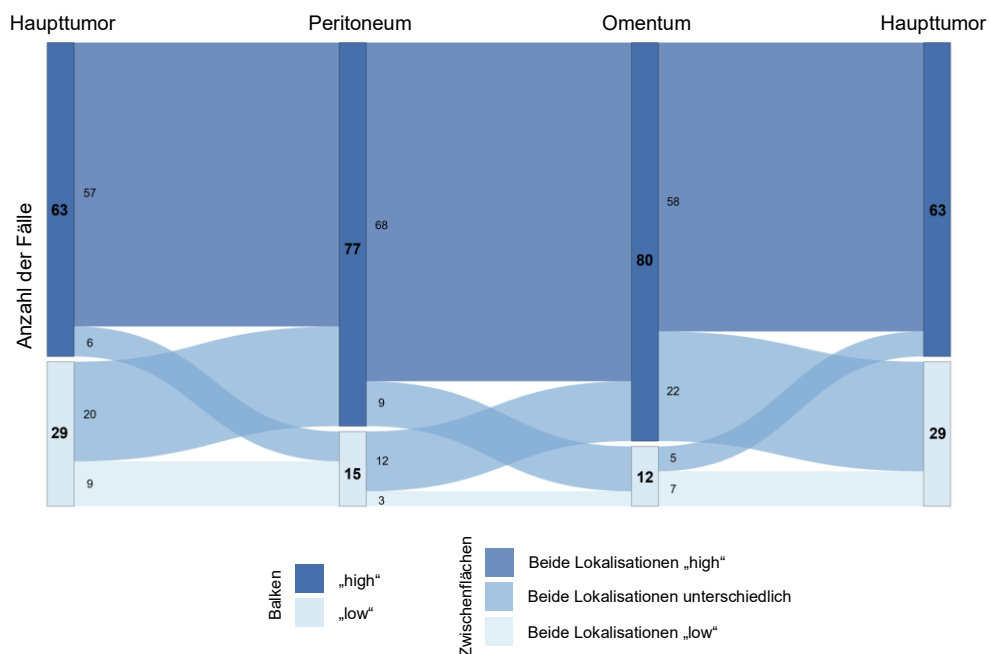


Abbildung 26: Sankey-Diagramm zur CD8-Expression (Stroma) der verschiedenen Lokalisationen, dichotomisiert nach „low“ und „high“ („low“: 0% Expression und vereinzelte exprimierende Zellen, „high“: >1% Expressionsrate). Untersucht wurden ausschließlich Fälle, für die zu allen Lokalisationen die nötigen Daten vorhanden waren. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der Fälle in den Balken für die angegebene Lokalisation und in den Flächen zwischen den Balken die Fälle, die jeweils links und rechts den angrenzenden Balkenabschnitten zugeordnet sind.

FOXP3

Die Korrelation der verschiedenen FOXP3-Expressionen gestaltet sich insgesamt weniger ausgeprägt. Während epithelial zwischen Haupttumor und den beiden Metastasenlokalisationen jeweils eine leichte Assoziation zu bestehen scheint, gibt es stromal keine Korrelation. Umgekehrt ist aber zwischen den beiden Metastasenlokalisationen untereinander stromal eine höhere Assoziation bezüglich der FOXP3-Expression zu finden als epithelial (siehe Abbildung 29 bis Abbildung 28).

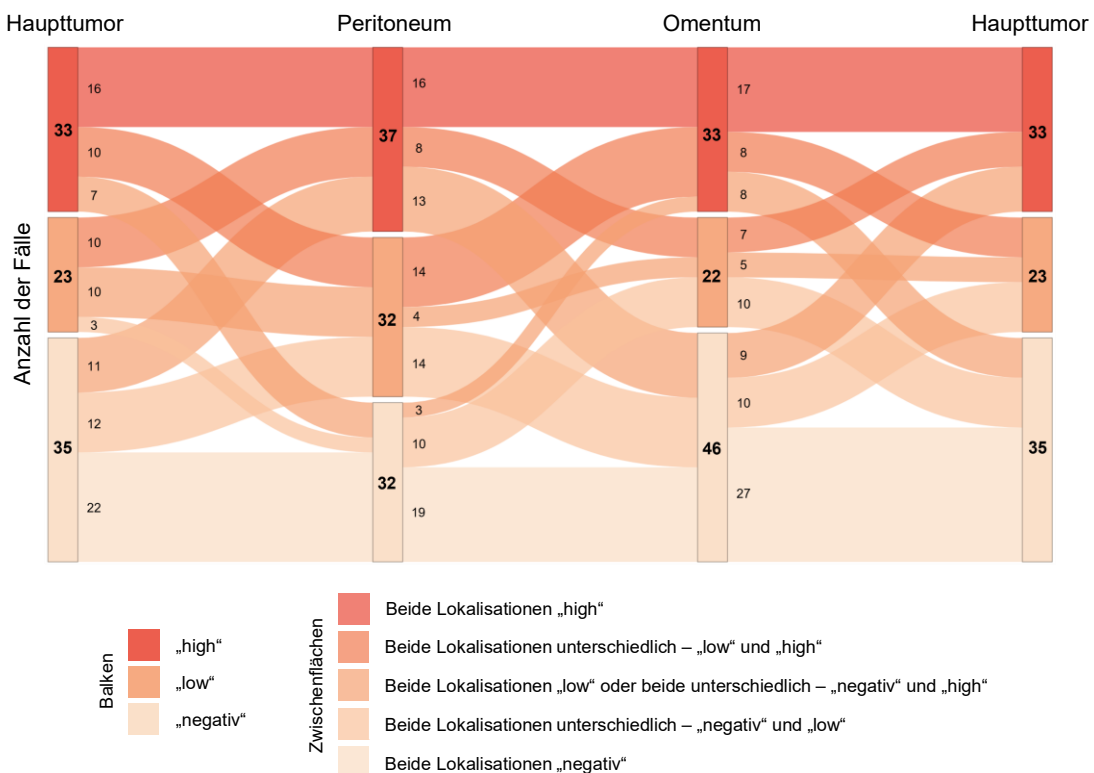


Abbildung 27: Sankey-Diagramm zur FOXP3-Expression (Epithel) der verschiedenen Lokalisationen, unterteilt nach „negativ“, „low“ und „high“. Untersucht wurden ausschließlich Fälle, für die zu allen Lokalisationen die nötigen Daten vorhanden waren. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der Fälle in den Balken für die angegebene Lokalisation und in den Flächen zwischen den Balken die Fälle, die jeweils links und rechts den angrenzenden Balkenabschnitten zugeordnet sind.

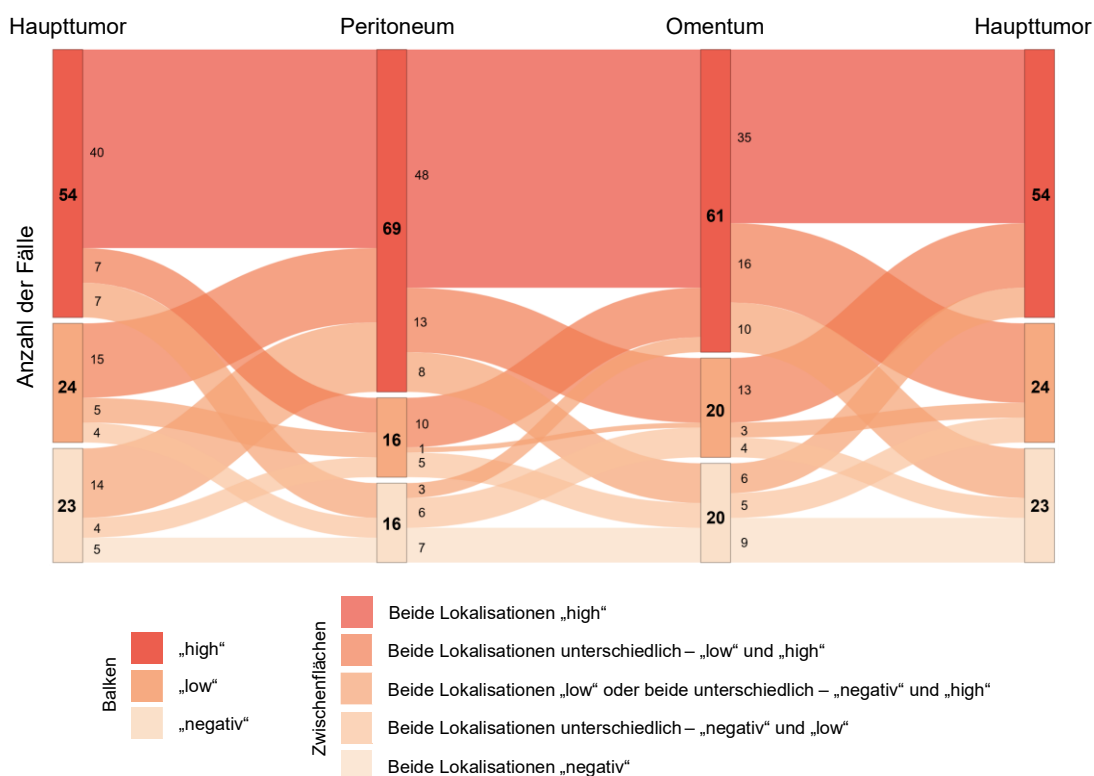


Abbildung 28: Sankey-Diagramm zur FOXP3-Expression (Stroma) der verschiedenen Lokalisationen, unterteilt nach „negativ“, „low“ und „high“. Untersucht wurden ausschließlich Fälle, für die zu allen Lokalisationen die nötigen Daten vorhanden waren. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der Fälle in den Balken für die angegebene Lokalisation und in den Flächen zwischen den Balken die Fälle, die jeweils links und rechts den angrenzenden Balkenabschnitten zugeordnet sind.

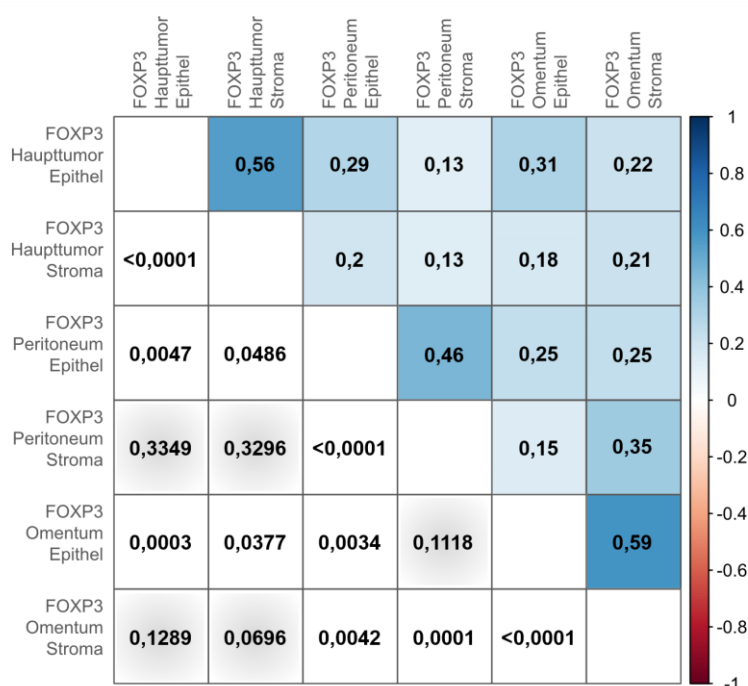


Abbildung 29: Korrelationstafel der FOXP3-Expression zwischen verschiedenen Lokalisationen, rechte obere Hälfte: Korrelationskoeffizienten nach Spearman, linke untere Hälfte: jeweilige P-Werte, grau hinterlegt: P-Werte < 0,05

PD-L1

Die Expression von PD-L1 korreliert sowohl für die Tumor- als auch für die Immunzellen am stärksten zwischen den beiden Metastasen. Auch zwischen Haupttumor und den Metastasen ist eine Assoziation zu erkennen, jedoch etwas geringer. Im Haupttumor korreliert die PD-L1-Expression in Tumorzellen mit der in Immunzellen. Weder in den Omentum- noch in den Peritonealmetastasen zeichnet sich eine solche Assoziation zwischen der Expression in Immun- und Tumorzellen ab (siehe Abbildung 30 bis Abbildung 32).

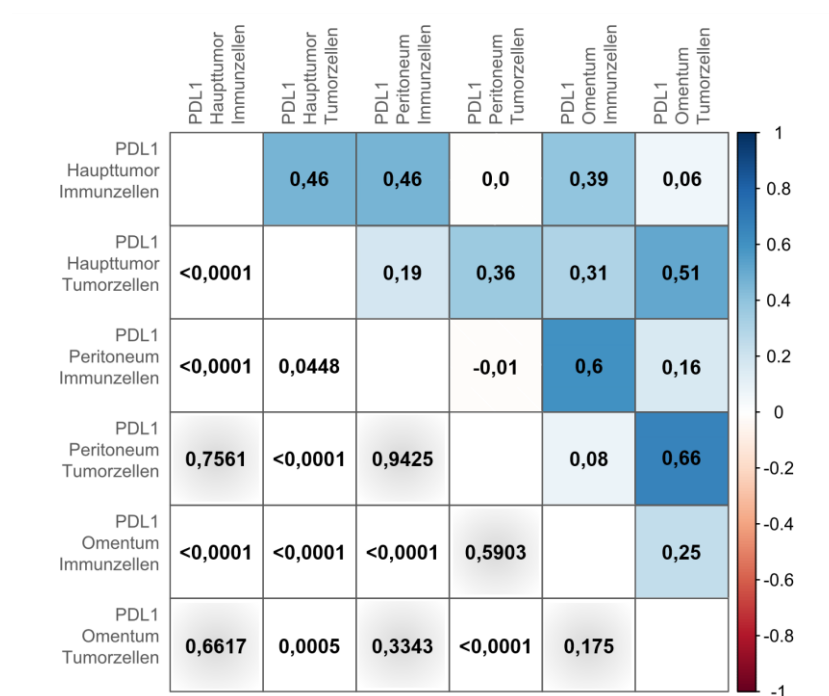


Abbildung 30: Korrelationstafel der PD-L1-Expression zwischen verschiedenen Lokalisationen, rechte obere Hälfte: Korrelationskoeffizienten nach Spearman, linke untere Hälfte: jeweilige P-Werte, grau hinterlegt: P-Werte < 0,05

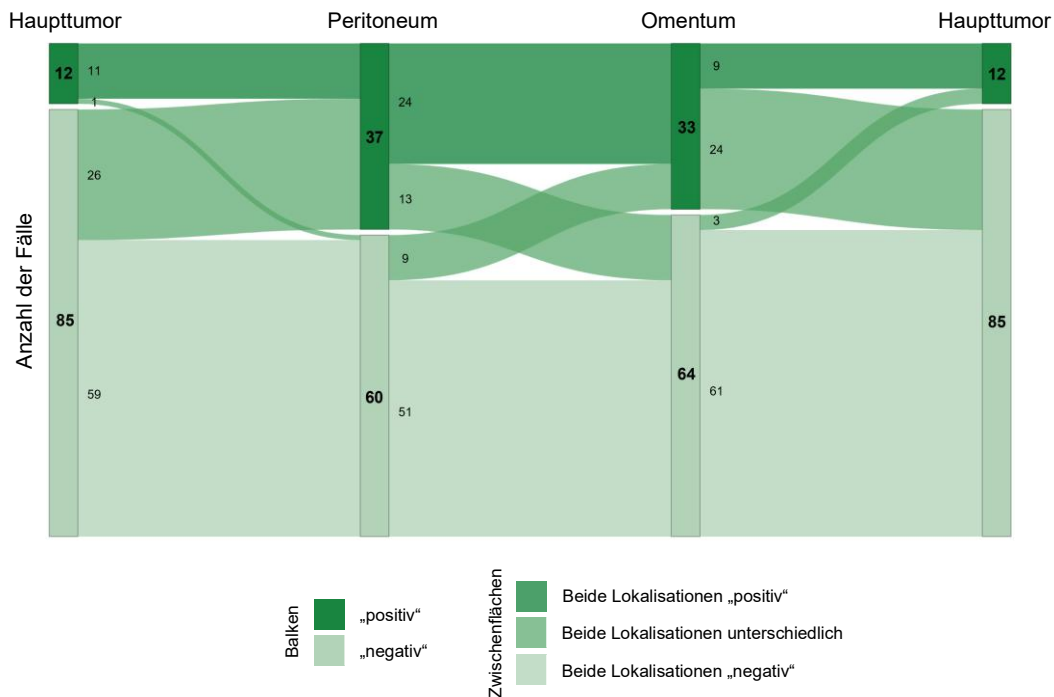


Abbildung 31: Sankey-Diagramm zur PD-L1-Expression (Immunzellen) der verschiedenen Lokalisationen, dichotomisiert nach „negativ“ und „positiv“. Untersucht wurden ausschließlich Fälle, für die zu allen Lokalisationen die nötigen Daten vorhanden waren. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der Fälle in den Balken für die angegebene Lokalisation und in den Flächen zwischen den Balken die Fälle, die jeweils links und rechts den angrenzenden Balkenabschnitten zugeordnet sind.

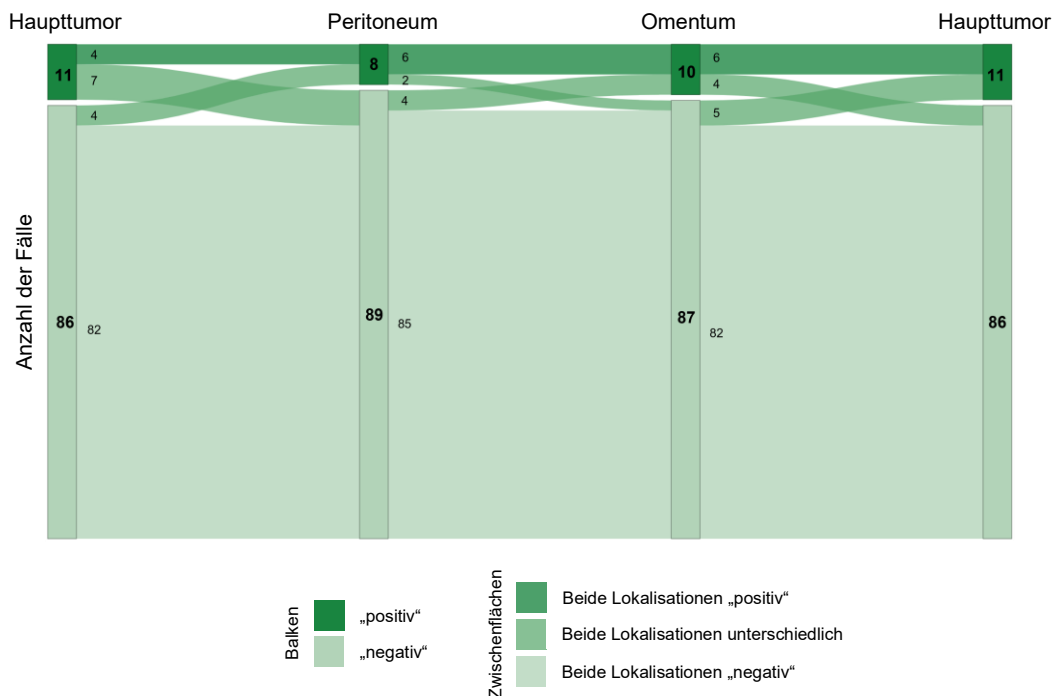


Abbildung 32: Sankey-Diagramm zur PD-L1-Expression (Tumorzellen) der verschiedenen Lokalisationen, dichotomisiert nach „negativ“ und „positiv“. Untersucht wurden ausschließlich Fälle, für die zu allen Lokalisationen die nötigen Daten vorhanden waren. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der Fälle in den Balken für die angegebene Lokalisation und in den Flächen zwischen den Balken die Fälle, die jeweils links und rechts den angrenzenden Balkenabschnitten zugeordnet sind.

6.5 Heterogenitätsindex

Bei der Überlebenszeitanalyse eines dichotomisierten Heterogenitätsindex (siehe Abschnitt zu Material und Methoden, Statistische Auswertung, Seite 32) für CD3 und CD8 zeichnet sich vor allem für die Heterogenität zwischen Haupttumor und Peritoneum eine positive Assoziation mit dem Überleben ab. Eine Heterogenität zwischen den beiden Metastasenlokalisationen in der CD8-Expression zeigt ebenfalls eine deutliche Tendenz dazu, mit verlängertem Überleben einherzugehen (siehe Abbildung 33). Für FOXP3 und PD-L1 zeigen sich keinerlei Zusammenhänge zwischen Heterogenitätsindex und Überleben.

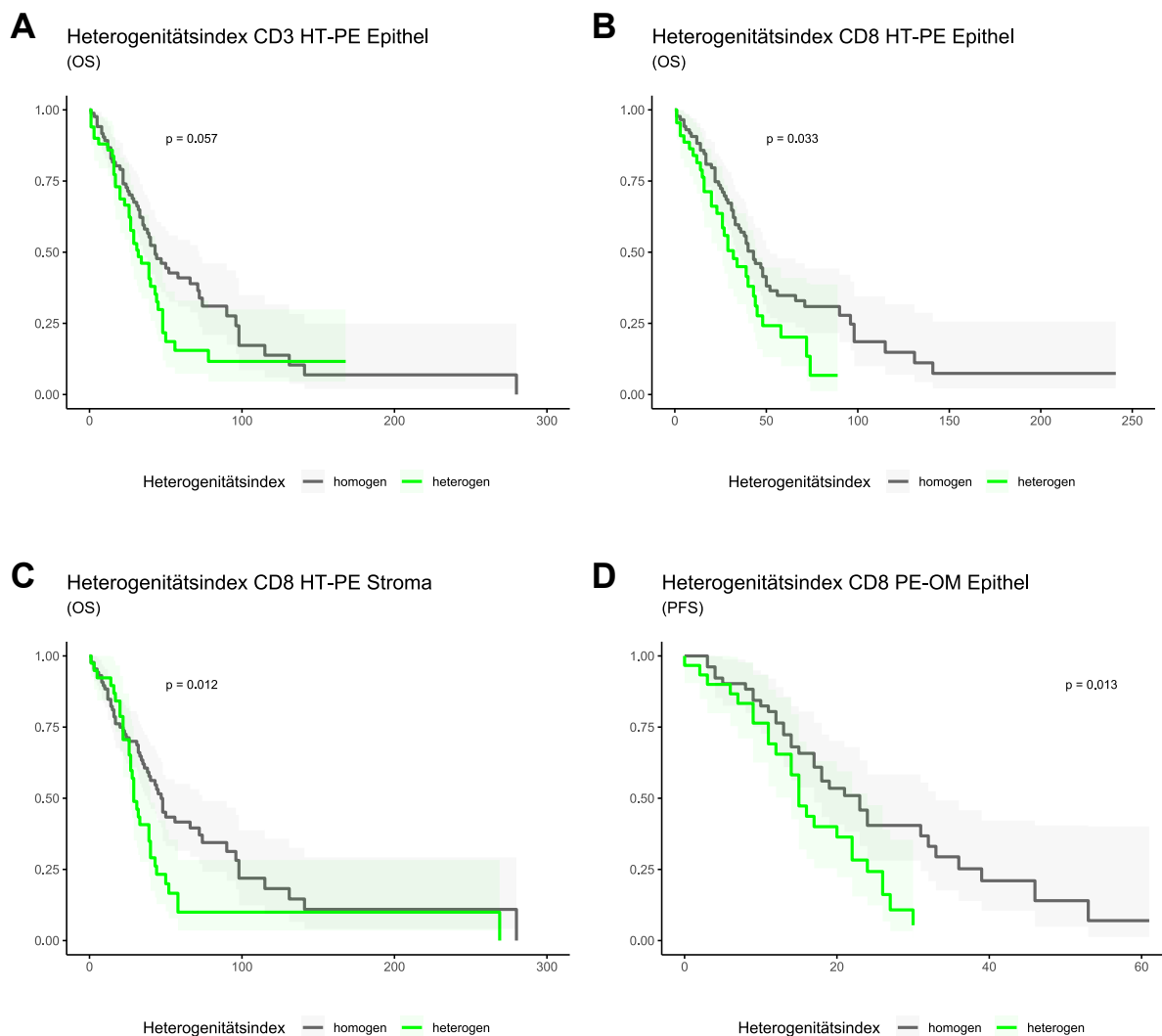


Abbildung 33: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der Heterogenität zwischen den verschiedenen Lokalisationen für CD3 (A) und CD8 (B-D). A-C: X-Achse: Gesamtüberleben, Heterogenitätsindex zwischen Haupttumor und Peritoneum. A-B: Epithel, C: Stroma. D: Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit vom Heterogenitätsindex zwischen Peritoneal- und Omentummetastasen (Epithel)

Für eine differenziertere Betrachtung insbesondere der gleichermaßen durch die Kategorie „homogen“ abgebildeten Subgruppen, die jeweils homogen hohe oder homogen niedrige Expressionen aufweisen, lohnt sich die Betrachtung des Heterogenitätsscores (siehe Abbildung 34). Hier fallen wiederum vor allem für den Vergleich der CD3- und CD8-Expression zwischen Haupttumor und Peritonealmetastasen Effekte auf: Ein Überlebensvorteil zeichnet sich vor allem für die Fälle mit homogen hoher Expression ab. Zwischen den Überlebenskurven der Subgruppen mit heterogener und homogen niedriger Expression deutet sich kein Unterschied an. Die Überlebenszeitanalyse für FOXP3 zeigt keine eindeutigen Zusammenhänge von Heterogenitätsscore und Überleben. Für die Expression von PD-L1 sind die verglichenen Fallzahlen sehr unterschiedlich, hier sind keine Tendenzen zu beobachten.

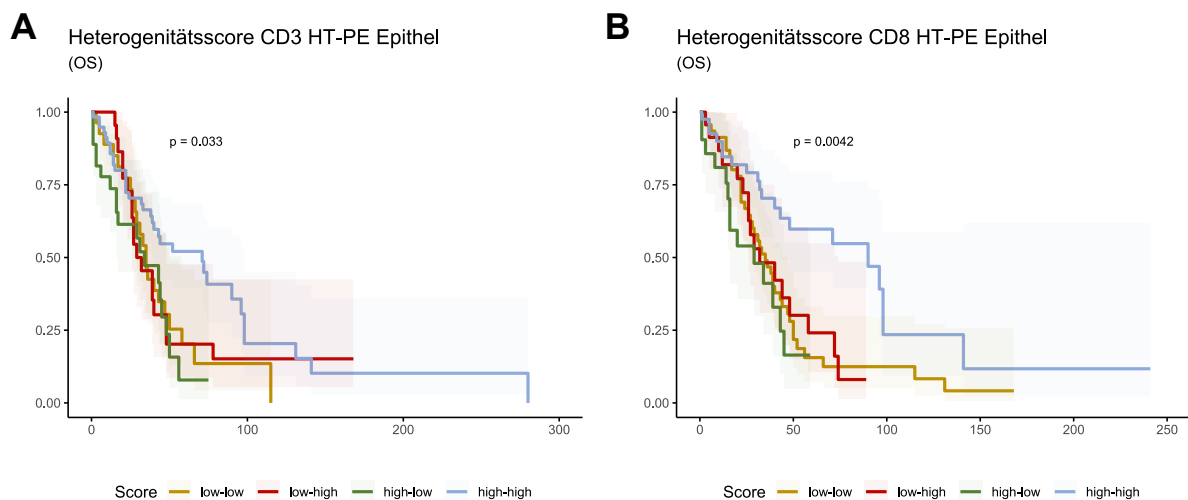


Abbildung 34: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit des Heterogenitätsscores zwischen Haupttumor- und Peritonealmetastasenepithel für CD3 (A) und CD8 (B). X-Achse: Gesamtüberleben in Monaten. Der P-Wert bezieht sich auf den zugrundeliegenden Log-Rank-Test mit der Nullhypothese, dass alle untersuchten Gruppe die gleiche Überlebenswahrscheinlichkeit haben.

6.6 Immunologischer Typ nach Teng

Die Verteilung der immunologischen Typen (siehe Abschnitt zu Material und Methoden, Statistische Auswertung, Seite 32; Typ I: PD-L1+/CD8+, Typ II: PD-L1-/CD8-, Typ III: PD-L1+/CD8-, Typ IV PD-L1-/CD8+) gestaltet sich in den verschiedenen Lokalisationen sehr unterschiedlich. Vor allem im Haupttumor ist Typ IV vorherrschend. In den Metastasenlokalisationen, insbesondere den Peritonealmetastasen, kommen auch die PD-L1-positiven Typen I und III etwas häufiger vor. Dies gilt gleichermaßen für Epithel wie Stroma,

abgesehen von Typ III, der stromal häufiger im Haupttumor beobachtet wurde, aber insgesamt sehr selten vorkam (siehe Abbildung 35 und Tabelle 23). Eine eindeutige Assoziation mit dem Überleben konnte nicht gefunden werden. Vor allem Typ III konnte wegen geringer Fallzahl nicht gut beurteilt werden. Für die anderen Typen zeichnet sich eine Tendenz dafür ab, dass Typ 1 mit der besten Prognose einhergeht, gefolgt von Typ IV und schließlich Typ II (siehe Abbildung 36).

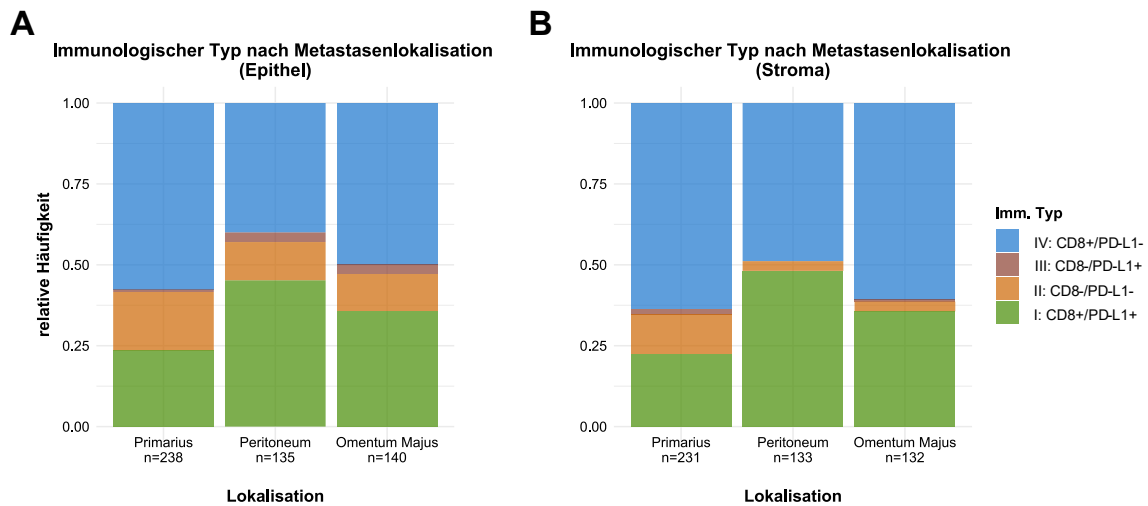


Abbildung 35: Immunologische Typen nach Lokalisation (relative Anteile der vier Typen an der Gesamtzahl der jeweils untersuchten Fälle)

Tabelle 23: Absolute und relative Anzahl der jeweiligen immunologischen Subtypen nach Teng nach Lokalisation, T = Subtyp nach Teng et al

T	Tumorepithel						Stroma					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
I	56	23,5	61	45,2	50	35,7	52	22,5	64	48,1	47	35,6
II	43	18,1	16	11,9	16	11,4	28	12,1	4	3,0	4	3,0
III	2	0,8	4	3,0	4	2,9	4	1,7	0	0,0	1	0,8
IV	137	57,6	54	40,0	70	50,0	147	63,6	65	48,9	80	60,6
ges.	238		135		140		231		133		132	

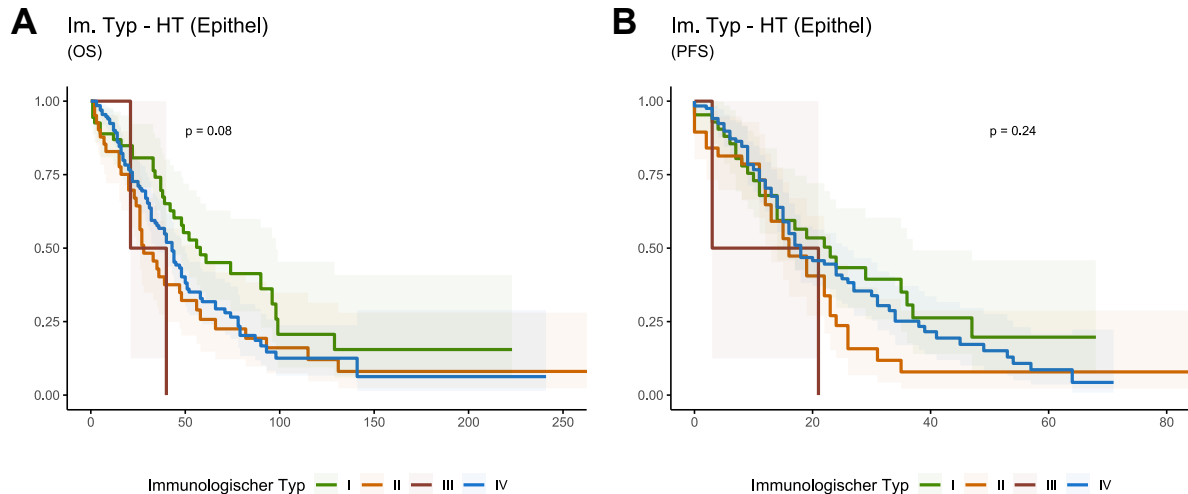


Abbildung 36: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit des immunologischen Typs im Tumorepithel des Haupttumors. X-Achse: A: Gesamtüberleben in Monaten. B: Progressionsfreies Überleben in Monaten

6.7 CD8/FOXP3-Ratio

Die CD8/FOXP3-Ratio unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Lokalisationen deutlich. Während sich in den Peritonealmetastasen die Verteilung nur unwesentlich von der im Haupttumor unterscheidet, wurden für die Omentummetastasen deutlich mehr Fälle als „medium“ oder „high“ gewertet. Allerdings muss betont werden, dass vor allem für die Wertung „high“ die Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Lokalisationen gering ist: Die meisten Fälle, die in einer Lokalisation als „high“ eingestuft wurden, sind in einer oder beiden anderen Lokalisationen als „medium“ oder sogar „low“ gewertet (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38).

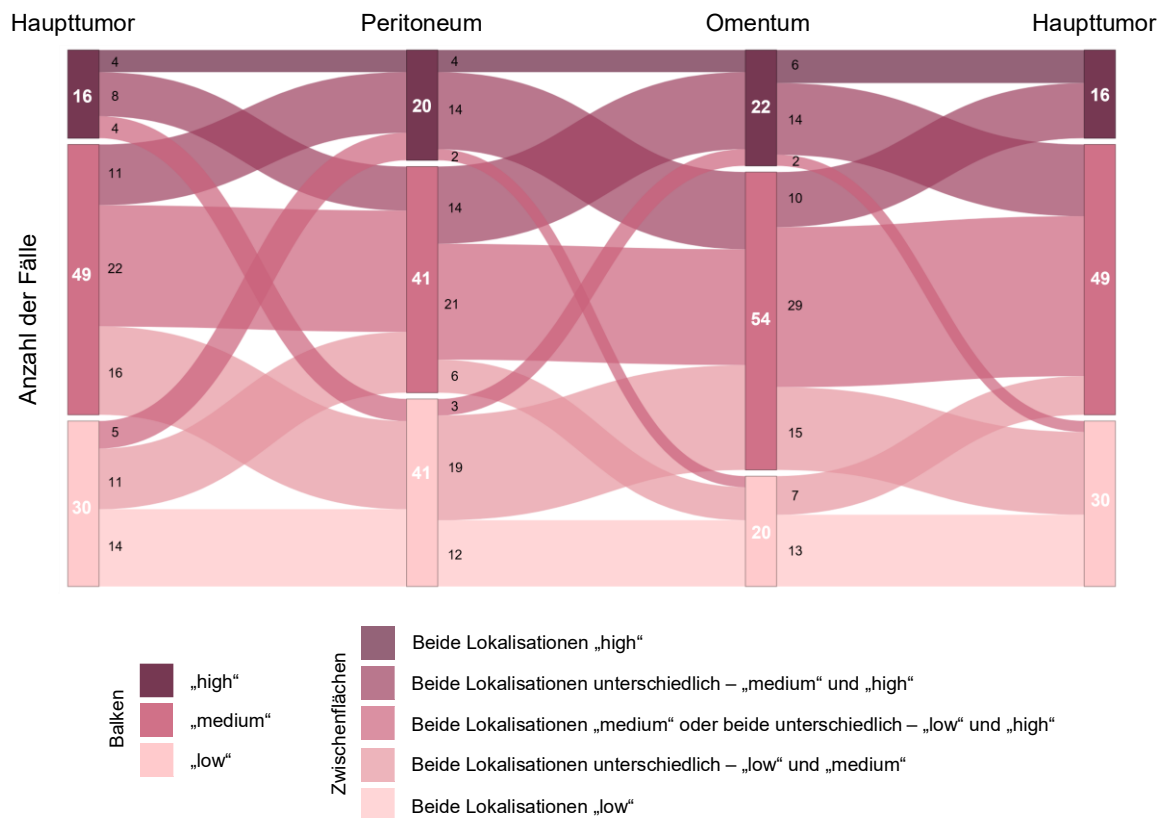


Abbildung 37: Sankey-Diagramm zur CD8/FOXP3-Ratio (Epithel) der verschiedenen Lokalisationen, aufgeteilt nach „low“, „medium“ und „high“. Untersucht wurden ausschließlich Fälle, für die zu allen Lokalisationen die nötigen Daten vorhanden waren. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der Fälle in den Balken für die angegebene Lokalisation und in den Flächen zwischen den Balken die Fälle, die jeweils links und rechts den angrenzenden Balkenabschnitten zugeordnet sind.

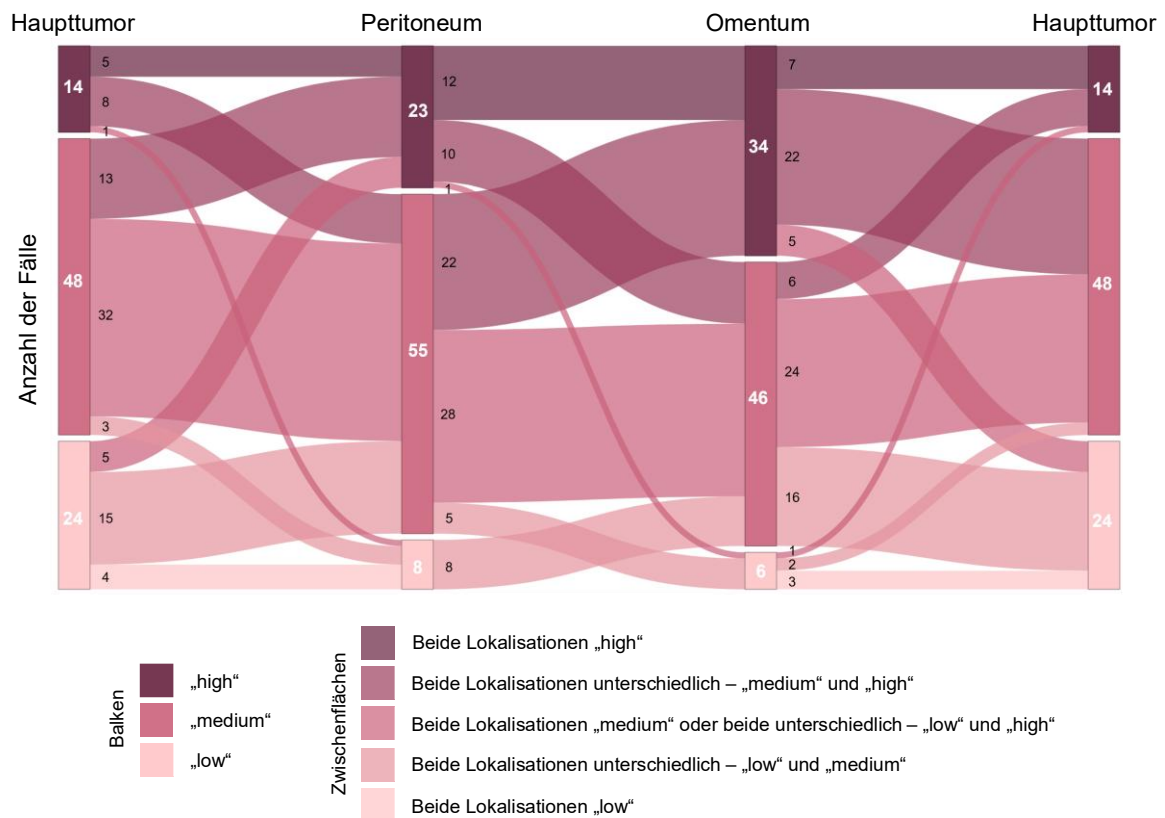


Abbildung 38: Sankey-Diagramm zur CD8/FOXP3-Ratio (Stroma) der verschiedenen Lokalisationen, aufgeteilt nach „low“, „medium“ und „high“. Untersucht wurden ausschließlich Fälle, für die zu allen Lokalisationen die nötigen Daten vorhanden waren. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der Fälle in den Balken für die angegebene Lokalisation und in den Flächen zwischen den Balken die Fälle, die jeweils links und rechts den angrenzenden Balkenabschnitten zugeordnet sind.

Ein eindeutiger Zusammenhang mit dem Überleben konnte nicht gefunden werden. Interessanterweise zeichnet sich aber im Omentummetastasengewebe eine bessere Kurve für als „high“ gewertete Fälle ab (siehe Abbildung 39). Da in die Gruppe „medium“ sowohl $CD8^{low}/FOXP3^{low}$ als auch $CD8^{high}/FOXP3^{high}$ fällt, womit zwei ganz unterschiedliche immunologische Situationen in eine Gruppe abgebildet werden, eignet sich zur weiteren Stratifizierung die Bildung eines CD8/FOXP3-Scores (siehe Abbildung 40). Hier sieht man vor allem im Peritoneum-Epithel eine Tendenz für ein verbessertes Überleben bei Fällen, die sowohl hohe CD8- als auch hohe FOXP3-Expressionen aufweisen.

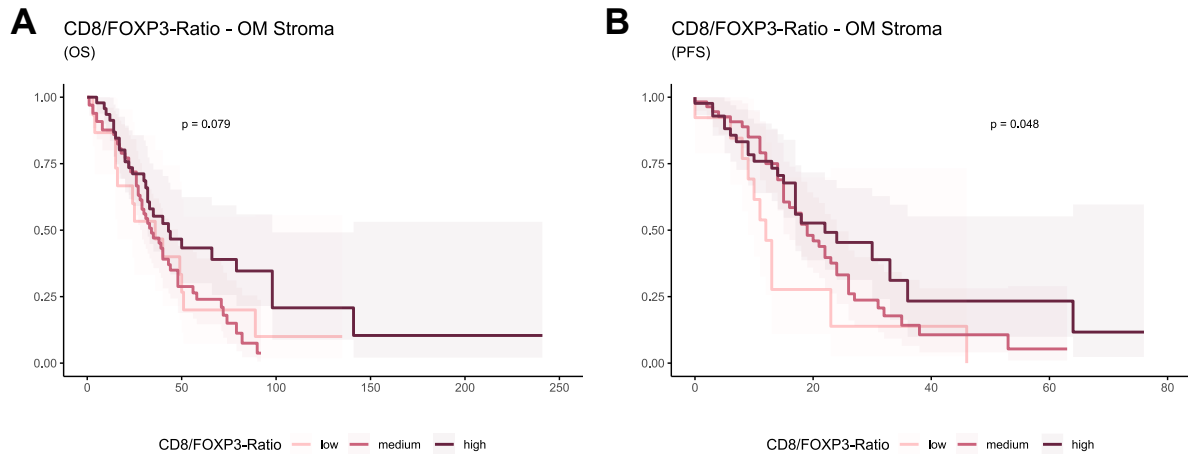


Abbildung 39: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der CD8/FOXP3-Ratio im stromalen Omentummetastasengewebe. X-Achse: A: Gesamtüberleben in Monaten, B: Progressionsfreies Überleben in Monaten

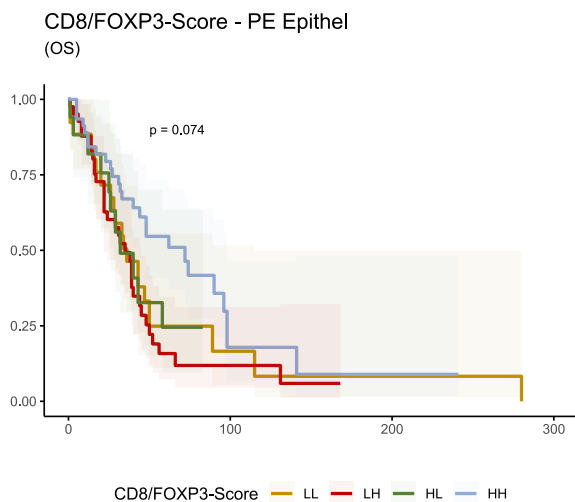


Abbildung 40: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit des CD8/FOXP3-Scores im Epithel von Peritonealmetastasen. X-Achse: A: Gesamtüberleben in Monaten, B: Progressionsfreies Überleben in Monaten

7 Diskussion

Mit dieser Arbeit konnte erneut gezeigt werden, dass im Ovarialkarzinom durchaus Immuninfiltrate gefunden werden können. Die hohe Infiltrationsrate mit CD3+ und CD8+ TILs entspricht in etwa dem in verschiedenen Studien vorbeschriebenen Ausmaß. In einer Metaanalyse von Hwang et al wurden im Median 60% der Fälle als positiv für intraepitheliale CD3-Expression (Spannweite: 39% bis 90,2%) gewertet. Für die intraepitheliale Infiltration mit CD8+ TILs ergab sich ein medianer Anteil von 62% als positiv gewerteter Fälle (Spannweite: 19,4% bis 81,4%) (Hwang et al., 2012). Die jeweils hohe Spannweite erklärt sich durch die inhomogene Definition von „Positivität“ in den in der Metaanalyse eingeschlossenen Studien. Dort war in einigen Studien jegliches Vorkommen positiver Zellen als Positivität gewertet worden, teilweise wurden Zellen in Gewebeausschnitten gezählt und Cutoffs festgelegt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche dichotome Einteilungen ausgewertet (siehe Abschnitt Material und Methoden). In der Auswertung mit „Positivität“ im Sinne jeglichen Vorkommens exprimierender Zellen ergaben sich für CD3 und CD8 jeweils Anteile positiver Fälle im oberen Bereich der oben genannten Spannweite der Metaanalyse. In der Auswertung mit Unterscheidung zwischen „low“ (keine oder nur wenige positive Zellen, siehe Abschnitt Material und Methoden) und „high“ ergaben sich Anteile von positiv gewerteten Fällen im Bereich des Medians der Metaanalyse für CD3 bzw. etwas darunter für CD8 (siehe Tabelle 24 und Tabelle 25). In der bereits oben genannten Metaanalyse wurden für diejenigen Studien, die Positivität als jegliches Vorkommen von CD3+ bzw. CD8+ TILs werteten, weniger signifikantere Effekte in den Überlebenszeitanalysen gefunden als in den Studien mit höherem Cutoff. Deshalb schlagen die Autoren vor, einen Cutoff von 5 positiven Zellen /200× HPF zu wählen. Dies entspricht bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten semiquantitativen Auswertungsskala am ehesten der Einteilung in „low“ und „high“, weshalb wir diese Dichotomisierung für die Überlebenszeitanalysen verwendeten.

Tabelle 24: Abs. und rel. Anteile der Fälle, die "positiv" bzw. "high" für CD3 gewertet wurden nach Lokalisation

CD3	Tumorepithel						Stroma					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
pos.	216	87,4	129	90,2	123	86,0	227	93,8	142	95,9	139	97,2
high	157	63,6	88	61,5	78	54,5	194	80,1	135	91,2	134	93,7

Tabelle 25: Abs. und rel. Anteile der Fälle, die "positiv" bzw. "high" für CD8 gewertet wurden nach Lokalisation

CD8	Tumorepithel						Stroma					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
pos.	198	80,8	129	92,1	122	85,9	208	86,3	134	97,1	129	96,3
high	115	46,9	69	49,3	72	50,7	148	61,4	114	82,6	110	82,1

Auch eine verhältnismäßig hohe FOXP3-Infiltration ist in verschiedenen Studien beobachtet worden und bestätigt sich in dem hier untersuchten Kollektiv. Etwa die Hälfte der untersuchten Fälle zeigte eine Infiltration durch FOXP3+ Zellen im Haupttumorgewebe, was sich sehr gut deckt mit zwei Studien (Leffers et al., 2009; Milne et al., 2009).

Tabelle 26: Abs. und rel. Anteile der Fälle, die "positiv" für FOXP3 gewertet wurden nach Lokalisation

FOX P3	Tumorepithel						Stroma					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
pos.	124	51,0	94	66,2	83	57,2	171	70,4	117	81,3	119	82,1

Eine deutliche Diskrepanz findet sich allerdings in der PD-L1-Expression, die in dieser Arbeit in deutlich geringerem Ausmaß gemessen wurde als in vergleichbaren Studien (siehe Tabelle 27 und Abbildung 41).

Tabelle 27: Abs. und rel. Anteile der Fälle, die "positiv" für PD-L1 gewertet wurden nach Lokalisation

PD- L1	Tumorzellen						Immunzellen					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
pos.	26	10,9	11	8,0	13	9,2	48	20,0	59	42,8	50	35,5

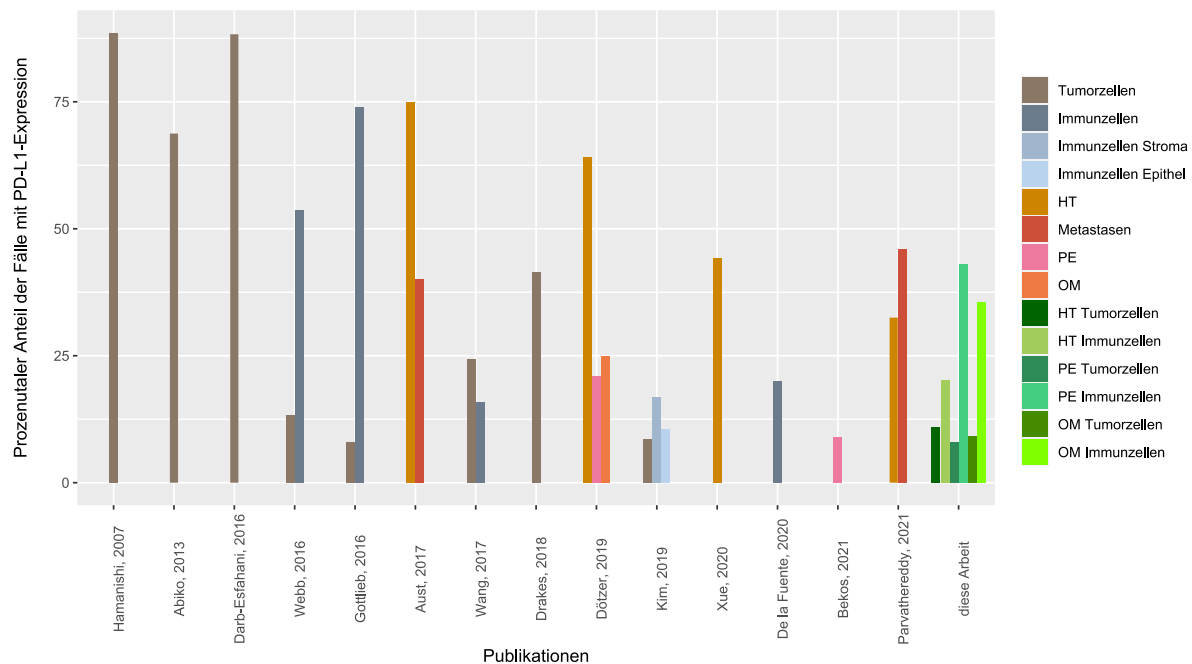


Abbildung 41: Übersicht zu den Expressionsraten von PD-L1 in verschiedenen Studien mit immunhistochemischer Untersuchung, die Farben geben die in den verschiedenen Studien untersuchten Zellkompartimente an. Die Balken geben die Rate positiver oder als „high“ gewerteter Fälle an, genauere Angaben dazu finden sich in Tabelle 28.

Die Vergleichbarkeit ist allerdings gewissermaßen durch die verschiedenen Studiendesigns limitiert. Eine Übersicht über die Studien ist in Tabelle 28 zu finden.

Beispielsweise unterschieden nur manche der Gruppen, insbesondere die späteren Untersuchungen, zwischen der Expression auf Tumorzellen und Immunzellen/Makrophagen, auch eine Unterscheidung zwischen Hautptumor und Metastasen wurde nur in wenigen Studien gemacht. In dem hier untersuchten Kollektiv weisen 121 Fälle eine PD-L1-Expression in mindestens einer der genannten Lokalisationen auf. Ohne Rücksicht auf die Lokalisation und den Zelltyp ergibt sich somit also eine Rate von ca. 48% (121/252). Diese Rate ist zwar noch immer geringer als in denjenigen Studien, die keine solche Lokalisationsunterscheidung getroffen haben, jedoch ließe sich so die Diskrepanz der Ergebnisse zumindest anteilig erklären. Bemerkenswert ist hier, dass auch in anderen Studien eine deutlich höhere PD-L1-Expression in Immunzellen als in Tumorzellen beschrieben wurde (J. R. Webb et al., 2016; Gottlieb et al., 2017; Kim et al., 2019), was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt, wenn auch wiederum mit teils deutlich höherer Expressionsrate in den Immunzellen. Einzig in der Untersuchung von Wang et al (J.-J. Wang et al., 2020) wurde eine höhere Expression in den Tumorzellen als in den Immunzellen gefunden.

Ein weiterer möglicher Störfaktor liegt im histologischen Scoring selbst. Denkbar wäre eine höhere Sensitivität bei automatisierter Auswertung im Vergleich zur Evaluierung durch Personen. An dieser Stelle ist auch die begrenzte Vergleichbarkeit der Studien aufgrund unterschiedlicher Dichotomisierungskriterien anzumerken. Einige der Studien unterschieden zwischen einer hohen und niedrigen Expression, während in anderen, inklusive der vorliegenden Arbeit, jegliche Expression (positiv) mit fehlender Expression (negativ) verglichen wurde. Durch diese Diskrepanz wären aber tendenziell höhere Raten zu erwarten als in den Studien mit Dichotomisierung in „low“ und „high“. Dies kann also nicht die niedrigere Expression im hier untersuchten Kollektiv erklären.

Möglicherweise hat auch die Wahl der verwendeten Antikörper einen Einfluss auf die Ergebnisse. Nur eine einzige weitere Studie verwendete den gleichen Antikörper gegen PD-L1 wie in dieser Arbeit (Kim et al., 2019). Bemerkenswert ist, dass in dieser Studie ebenfalls verhältnismäßig geringe Expressionen gefunden wurden, wobei anzumerken sei, dass dort eine Dichotomisierung in „low“ und „high“ erfolgte, was also mit der hier verwendeten Dichotomisierung in „negativ“ und „positiv“ nur bedingt vergleichbar ist. Auch die Qualität der Gewebeproben könnte die Färbbarkeit beeinflussen. Hier ist der Einschluss teils sehr alter Proben (die am frühesten gewonnenen Gewebeproben des Kollektivs stammen aus dem Jahr 1991) in das hier untersuchte Kollektiv zu betonen. Allerdings sind hierdurch verursachte Einflüsse aufgrund der einheitlichen Konservierung und optimalen Lagerungsbedingungen als gering einzustufen.

In der vorliegenden Arbeit wurden *Tissue Micro Arrays* verwendet, entsprechend lag pro Fall deutlich weniger Gewebematerial vor als in denjenigen Studien, in denen pro Gewebeprobe ein ganzer Objektträger hergestellt („*Full-Face*-Schnitte“) und analysiert wurde. Es liegt nahe, dass insbesondere bei einer eher ungleichmäßigen Expression von PD-L1, die in der Literatur vorbeschrieben ist (Q. Wang et al., 2017), die Wahrscheinlichkeit, mittels TMA-Stanze ein solches Cluster zu verfehlen und entsprechend nicht abzubilden, höher ist als bei der Auswertung von solchen *Full-Face*-Schnitten. Der Stellenwert dieses Aspekts wird durch die Tatsache unterstrichen, dass in den Studien mit *Full-Face*-Schnitten tendenziell höhere Infiltrationsquoten gefunden wurden als in den Studien mit TMA-Verwendung (siehe Tabelle 28).

Auch die Struktur bzw. Homogenität des Kollektivs hinsichtlich Grading und Staging kann als Erklärung diskutiert werden. In der hier vorgestellten Arbeit wurde ein deutlich homogener

gestaltetes Kollektiv mit ausschließlicher Betrachtung von HGSOE untersucht als in manchen der vorherigen Studien. Allerdings wäre aus diesem Grund eine eher höhere Expression von PD-L1 zu erwarten, da bekannt ist, dass ein höheres Staging mit einer höheren PD-L1-Infiltration in Zusammenhang steht (Dötzer et al., 2019; Drakes et al., 2018).

Schließlich ist die Fallzahl in den Analysen sehr unterschiedlich groß, die Größe des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs findet sich hier in etwa im Mittelfeld. Sicherlich wären bei der Wahl eines größeren Kollektivs belastbarere Ergebnisse zu erwarten.

Tabelle 28: Auswahl an Publikationen zur immunhistochemisch evaluierten PD-L1-Expression in HGSOE. Die Auswahl zeigt alle Publikationen, die im Zeitraum bis 03/2022 in der Metadatenbank PubMed der nationalen medizinischen Bibliothek der Vereinigten Staaten durch die kombinierte Suche der Begriffe „Ovarian Cancer“ und „PD-L1“ gefunden wurden und die mittels histologischer Färbungen die PD-L1-Expression im Tumorgewebe und/oder auf Immunzellen im HGSOE durchführten.

Autor, Jahr	n	Verwendeter Antikörper	Eckdaten zum Kollektiv	Material, Scoring	Definition von „PD-L1-positiv“	Assoziation mit Überleben / sonstiges	Anteil an PD-L1-positiven Fällen
Hamanishi, 2007	70	Eigens entwickelt	40% serös 55,7% < FIGO III/IV	Full-Face-Schnitte	Semiquantitative Skala (0-3) (gemessen an der Positivkontrolle Plazenta)	Negativ mit OS und PFS, auch in der multivariaten Analyse Invers mit CD8 ⁺ T-Zellen assoziiert	88,6%
Abiko, 2013	64	Der von Hamanishi et al. entwickelte AK	40% serös 41% < FIGO III	Full-Face-Schnitte	Plazenta als Positivkontrolle: Gleiche /stärkere Expression als positiv, schwächere (Proben mit Färbung in weniger als 50% der Zellen) als negativ gewertet	Negativ mit OS (p=0,023)	68,75%
Darb-Esfahani, 2016	202	Clone EPR1161(2), Abcam plc., Cambridge, UK	13,4% < FIGO III Alle HGSOE	TMA; auf Tumorzellen und Immunzellen	Semiquantitative Skala (0-3)	Tumorzellen: Positiv mit PFS und OS Immunzellen: positiv mit Überleben	88,3 %
Webb, 2016	490	Clone SP142, Spring Bioscience, Pleasanton, CA und clone E1L3N, Cell Signaling Technology, Danvers, MA	40% HGSOE, davon 67% < FIGO III	TMA	Einteilung in positiv (mindestens eine gefärbte Zelle in mindestens einem Core) und negativ	Positiv mit PFS	Tumorz. pos.: 13,2% Makrop. pos: 53,7%
Gottlieb, 2016	61, davon 21 auch Met	Clone SP142, Spring Biosciences/ Ventana, Pleasanton, CA	Alle HG, stage III-IV, aber 23,8% neoadj.	40 TMA, 21 Full Face (auch Met)	Ordinalskala auf Grundlage des prozentualen Anteils gefärbter Zellen (1 = 1–5%, 2 = 6–10%, 3 = 11–25%, 4 = 26–50%, 5 ≥ 50%).	Nicht untersucht	HT Tumorzellen 8%, TAMs 74%
Aust, 2017	64 (aber nicht alle IHC)	Clone E1L3N XP, Cell Signaling Technology, Danvers, MA	Nur FIGO III/IV 82% serös	Full-Face	Positiv, falls ≥ 1% der Tumorzellen im gesamten Tumoralareal gefärbt	positiv	HT: 75% Metastasen: 40%
Wang, 2017	107	Clone E1L3N, Cell Signaling Technology, Danvers, MA	24,3% < FIGO III, alle HGSOE	Full-Face	Semiquantitative Skala: 0, negativ; 1: schwach; 2, moderat, aber schwächer als Plazenta; 3: gleich/stärker als Plazenta, Positivität definiert als ≥ 5% der Zellen positiv	In Tumorzellen negativ, in TILs keine progn. Assoziation	Tumorzellen: 24,3% TILs 15,89%

Drakes, 2018	55	Clone ab205921, Abcam	Fast alle serös 16% low grade 84% high-grade 16% < FIGO III, gemischt Tube, Peritoneum, endometrium	Full-Face- Schnitte	Zellen/HPF, dann in Kategorien 0-3 eingeteilt	(Nicht untersucht) PD-L1 signifikant häufiger in high-grade vs. low-grade Tumoren	Im Subset aus High Grade: 41,5%
Dötzer, 2019	49 (+ Met: OM 23, PE 15)	Clone MIH1, affymetrix eBiosciences	90% serös, alle high grade	Full-Face- Schnitte	PD-L1-Positivität definiert als Expression auf $\geq 1\%$ der Zellen (Tumor- und Immunzellen)	Nicht untersucht	HT: 64% PE: 21% OM: 25%
Kim, 2019	248	Clone SP263, Ventana, Tucson, AZ	56,5% serös, 77% grade 2 oder 3	TMA	semiquantitative Skala: 0 (none), 1+ (mild), 2+ (moderate), 3+ (marked). „high“, wenn beide TMA- Cores 2+ oder mehr, bzw. wenn der Anteil der PD- L1-exprimierenden Zellen in beiden Cores $\geq 5\%$	Expression in Stromalen TILs mit besserem OS	“High Expression” Stroma TILs: 16,9% Tumorzellen: 8,5% intraepitheliale TILs: 10,5%
Xue, 2020	77	PD-L1 antibody purchased from Novus biotechnology (keine genauere Angabe)	68,8% serös, 20,8% < FIGO III	Full-Face- Schnitte	Einteilung in low/high sowie quantitativ mittels „H-Score“, der die Stärke der Färbung gewichtet	Assoziation mit höherem FIGO-Stadium, negativ mit OS	“High Expression”: 44,16%
De la Fuente, 2020	130	Clone 22C3 M3653 Agilent und Clone 22C3 M365529	Alle serös, high-grade, FIGO III-IV	TMA, 6-8 Cores pro Patientin, aus HT und Met gemischt	Einteilung in Prozentbereiche (0%, < 1%, 1–4%, $\geq 5\%$) TAM- Positivität definiert als $\geq$ 1% PD-L1-pos. Makrophagen in ≥ 2 Cores	positiv	20% in TAMs, in Tumorzellen fast gar nicht, daher nicht ausgewertet
Bekos, 2021	111	Clone E1L3N, Cell Signaling Technology, Danvers, MA	57% high-grade serös	TMA	Optimaler Cut-Off bei 15% gesetzt. Dann Einteilung in low / high	negativ	Peritonealmetastasen: 9% high, 91% low (HT nicht angegeben)
Parvathareddy, 2021	194	Clone E1L3N, Cell Signaling Technology, Danvers, MA	64,4% high- grade-serös. >90% stage III- IV	TMA	Positiv, wenn prozentualer Anteil der PD-L1-pos. Zellen $\geq 5\%$ keine Unterscheidung zwischen Tumorzellen und Immunzellen	keine	32,5% in HT 45,9% in Metastasen

Im Einklang mit bisherigen Studien (Bekos et al., 2021; Leffers et al., 2009) wurden auch in diesem Kollektiv insgesamt höhere Anteile exprimierender Zellen für CD8 und FOXP3 im Metastasengewebe als im Haupttumorgewebe gefunden. Auch die Expression von PD-L1 auf TILs war im hier untersuchten Kollektiv im Metastasengewebe höher als im Haupttumorgewebe, für die Expression auf Tumorzellen zeigen sich bei insgesamt sehr niedrigen Raten kaum Unterschiede. Bisherige vergleichende Studien für die Expression von PD-L1 zeigten zum Teil höhere Expressionen im Haupttumor (Bachmayr-heyda et al., 2013; Dötzer et al., 2019), zum Teil höhere Expressionen im Metastasengewebe (Gottlieb et al., 2017; Parvathareddy et al., 2021). In der Gesamtschau dieser Beobachtungen scheint metastatisches Gewebe eine stärkere Infiltration durch Immunzellen aufzuzeigen als das Haupttumorgewebe. Mögliche Erklärungsansätze wären einerseits Veränderungen der Tumor-Immunsystem-Interaktion im Rahmen des Metastasierungsprozesses. Andererseits bestehen bereits physiologisch besondere immunologische Voraussetzungen in Peritoneal- und Omentumgewebe (siehe Abschnitt „Einleitung“).

Die Überlebenszeitanalyse der verschiedenen klinischen Parameter bestätigt weitestgehend lange gesicherte prognostische Faktoren.

Dass kein Zusammenhang zwischen dem Anteil von Immunzellen mit CD3-Expression im Haupttumorgewebe mit dem Überleben gefunden wurde, steht im Widerspruch mit einigen bisherigen Studien, aber im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien (Literaturverweise siehe Tabelle 30, Seite 91). Als Erklärungsansatz für diese inhomogene Datenlage könnten hier unterschiedliche Studiendesigns infrage kommen. Insbesondere ist in den meisten Studien keine explizite Angabe dazu zu finden, ob ausschließlich Ovarialtumorgewebe oder auch metastatisches Gewebe untersucht wurde. In einer Arbeit wurde explizit genannt, dass sowohl Ovarialtumor- als auch Metastasengewebe eingeschlossen wurde und anschließend eine gemischte Auswertung unter Bildung eines Modalwerts durchgeführt wurde. Dabei konnte eine positive Assoziation der CD3-Expression mit dem Überleben gefunden werden (Martin de la Fuente et al., 2020). Denkbar wäre also als eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse, dass auch in einigen der anderen Studien metastatisches Gewebe mitbeurteilt wurde.

Die CD3-Expression im Tumorepithel sowohl der Omentum- als auch der Peritonealmetastasen konnte in dieser Arbeit mit dem Gesamtüberleben positiv korreliert werden, was bislang nicht in der Literatur vorbeschrieben war. Diese Diskrepanz zwischen der prognostischen Bedeutung der Infiltration mit CD3-positiven Zellen in Haupttumor und Metastasen unterstreicht die Wichtigkeit einer differenzierten Betrachtung dieser unterschiedlichen Lokalisationen.

Auch für die Infiltration mit CD8-positiven Zellen konnten für die Metastasenlokalisationen deutlichere Zusammenhänge mit dem Überleben festgestellt werden als für den Haupttumor. Allerdings ist hier für das Omentum lediglich eine Assoziation der stromalen Infiltration durch CD8-positive Zellen mit dem Überleben gezeigt worden, im Epithel ist der Zusammenhang im Peritoneum deutlich und im Haupttumor als Tendenz zu erkennen. Dies deckt sich nur eingeschränkt mit der Studie von Leffers et al, die einen positiven Zusammenhang mit dem Überleben nur für CD8-Expression im Infiltrat des Haupttumors, nicht aber der Omentummetastasen zeigte (Leffers et al., 2009). Insgesamt deutet sich aber für alle Lokalisationen eine positive prognostische Bedeutung an, was sich mit den bisherigen Erkenntnissen aus anderen Studien deckt (Bekos et al., 2021).

Für die Infiltration mit FOXP3-positiven regulatorischen T-Zellen deutet sich in allen Lokalisationen entweder mit dem OS oder PFS allenfalls eine Tendenz zu einer positiven

Korrelation an. Dies passt zu der Uneinigkeit bezüglich der prognostischen Bedeutung in bisherigen Studien: Während einige Untersuchungen ebenfalls auf einen positiven Zusammenhang hindeuten (Leffers et al., 2009; Milne et al., 2012), konnte in anderen kein Effekt beobachtet werden (Barnett et al., 2010; Shah et al., 2008). Einerseits ist die immunsuppressive Wirkung der Tregs bekannt, was eine negative prognostische Bedeutung vermuten ließe. Andererseits sind sie als Teil des Immuninfiltrats ein Indikator für die gesamte Immunogenität des Tumors: Die Abwesenheit intratumoraler Tregs kann in einigen Fällen darin begründet sein, dass überhaupt keine Tumordinfiltration durch das Immunsystem stattfindet, was sich wiederum ungünstig auf die Prognose auswirkt. Eine differenziertere Analyse gelingt durch die Betrachtung der CD8/FOXP3-Ratio, die die Infiltration der proinflammatorischen CD8-Zellen mit berücksichtigt.

Anders als in einigen vorherigen Studien (Knutson et al., 2015; Leffers et al., 2009) und im Einklang mit einer anderen Studie (Shah et al., 2008) konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang der CD8/FOXP3-Ratio mit dem Überleben gefunden werden. Diese Diskrepanz könnte einerseits auf die limitierte Kollektivgröße, andererseits auch auf die unterschiedliche Darstellung bzw. Ermittlung des Scores zurückzuführen sein. Die in dieser Arbeit vorliegenden semiquantitativen, ordinalskalierten Daten ließen nur eine unpräzise Darstellung des Scores zu, wodurch etwaige Effekte durchaus maskiert sein könnten. Ein Hinweis auf eine Korrelation des Überlebens mit einer erhöhten Infiltration durch sowohl CD8- als auch FOXP3-positive Zellen deutet sich an, was wiederum vereinbar ist mit einer positiv mit dem Überleben assoziierten höheren Gesamtimmuninfiltration.

Für die Expression von PD-L1 zeichnet sich eine prognostische Bedeutung vor allem im Haupttumor- und Peritonealgewebe ab. Auf den Immunzellen scheint eine Expression hier tendenziell mit einem verbesserten OS und PFS einherzugehen, während in Omentummetastasen keinerlei Zusammenhang mit dem Überleben festgestellt wurde. Die Expression auf Tumorzellen scheint im Haupttumorgewebe sogar eher negativ mit dem Überleben zusammenzuhängen. Dieses uneindeutige Ergebnis fügt sich in die heterogene Studienlage zu dieser Fragestellung (siehe Tabelle 28). Aufgrund der immunsuppressiven Rolle von PD-L1 wäre eine negative prognostische Bedeutung intuitiv naheliegend. Aber auch hier kann die PD-L1-Expression wiederum als Surrogatmarker für die gesamte Immuninfiltration und eine Interferon-getriggerte Immunantwort gegen den Tumor diskutiert werden, weshalb eine differenziertere Betrachtung mit Berücksichtigung der Infiltration durch

proinflammatorische CD8-positive Zellen anhand der Bildung von immunologischen Subtypen erfolgte (s.u.).

Die starke Korrelation der CD3-Expression mit der CD8- sowie der FOXP3-Expression ist in der Koexpression der jeweiligen Marker auf Tregs und zytotoxischen Zellen begründet. Die Korrelation der CD8- mit der FOXP3-Expression lässt sich dadurch erklären, dass im Zuge der Immuninfiltration natürlicherweise sowohl Tregs als auch zytotoxische T-Zellen an den Tumorlokus gelangen. Hier sind verschiedene Chemokine beteiligt, die durch Bindung an entsprechende Rezeptoren auf den Immunzellen chemotaktisch eine Art Rekrutierung in den Tumorlokus vermitteln. Im Ovarialkarzinom kommt dabei dem CXCR3- Chemokinsystem mit seinen Liganden CXCL9 und CXCL10 eine besondere Bedeutung zu (Bronger et al., 2016). Es wurde in präklinischen Untersuchungen gezeigt, dass dieses sowohl bei der Rekrutierung von T-Zellen insgesamt als auch von Tregs beteiligt ist (Barnett et al., 2010).

Auch die Expression von PD-L1 geht physiologischerweise mit einer insgesamten Immunreaktion einher. Bemerkenswert ist an dieser Stelle, dass die Korrelation von PD-L1 mit den anderen Immunmarkern deutlich stärker auf den Immunzellen als auf den Tumorzellen ausgeprägt ist. Dies kann allerdings auch auf die sehr geringen Expressionsraten insbesondere auf Tumorzellen zurückzuführen sein. Die Tatsache, dass die genannten Korrelationen je nach Lokalisation teils unterschiedlich stark ausgeprägt sind, erhärtet die Vermutung, dass in den verschiedenen Lokalisationen ganz unterschiedliche Immunmilieus zu finden sind, in denen das Zusammenspiel der verschiedenen Aspekte des Immunsystems sich unterscheidet. Für eine differenziertere Betrachtung der prognostischen Bedeutung der einzelnen Marker scheint aufgrund der oben genannten Zusammenhänge die Bildung von Scores und Ratios notwendig (s.u.).

Die in dieser Arbeit beschriebene Korrelation der CD3-, CD8- und PD-L1-Expression zwischen den verschiedenen Lokalisationen steht im Widerspruch zu zwei bisherigen Studien zu dieser Fragestellung. In einer Arbeit wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der PD-L1-Expression in Haupttumor und Metastasen gefunden (Parvathareddy et al., 2021). Eine andere Arbeit konnte eine Korrelation nur für die PD-L1-Expression auf Tumorzellen zeigen, die Infiltration durch CD8-positive sowie PD-L1-exprimierende TILs unterschied sich. Andererseits konnten Gottlieb et al eine Korrelation zwischen der Infiltration durch PD-L1-exprimierende TILs in Haupttumor und Metastasen finden. Mögliche Erklärungen für diese uneindeutige Studienlage liegen in einer unterschiedlichen Zusammensetzung der jeweils

untersuchten Kollektive oder in den unterschiedlichen Quantifizierungsmethoden. Insbesondere bezüglich der PD-L1-Expression kann auch die in dem hier untersuchten Kollektiv deutlich geringer gemessene Ausprägung eine Rolle spielen.

Dötzer et al. beschrieben in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen der Heterogenität im Immuninfiltrat zwischen Haupttumor und Metastasen und dem Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie. In der vorliegenden Arbeit wurde die prognostische Bedeutung der Heterogenität per Überlebenszeitanalyse untersucht. Insbesondere zeichnet sich ein prognostischer Vorteil für Fälle mit zwischen Haupttumor und Peritonealmetastasen homogen gestalteter CD3- und CD8-Expression ab. Für CD8 besteht auch ein Zusammenhang zwischen der Homogenität der Expression zwischen Peritoneal- und Omentummetastasen und dem Überleben. Für die FOXP3- und PD-L1-Expression kann keine prognostische Bedeutung des Heterogenitätsindex abgeleitet werden. Um auch innerhalb der Fälle mit einer homogenen Expression zwischen solchen mit an beiden Lokalisationen hoher und solchen mit an beiden Lokalisationen geringer Expression unterscheiden zu können, kann die Überlebenszeitanalyse eines Heterogenitätsscores betrachtet werden. Hier zeichnet sich ein Überlebensvorteil für diejenigen Fälle ab, die eine homogen hohe Expression von CD3 bzw. CD8 aufweisen im Vergleich zu den homogen niedrig exprimierenden Fällen. Dies passt zusammen mit der bereits vielfach bestätigten Hypothese, dass eine hohe Immuninfiltration generell prognostisch vorteilhaft ist (s.o.).

Um das Immunmilieu differenzierter zu beschreiben, wurde eine Einteilung in vier immunologische Subtypen nach Teng et al. vorgenommen (Typ I PD-L1+/CD8+, Typ II PD-L1-/CD8-, Typ III PD-L1+/CD8-, Typ IV PD-L1-/CD8+) (Teng et al., 2015). In einer Übersichtsarbeit zu dieser Klassifikation wurde über die vier Typen folgender Erklärungsversuch postuliert: In Tumoren mit Immunmilieu vom Typ I (PD-L1+/CD8+) liegt eine Immuninfiltration vor, die durch Hochregulation von PD-L1 durch den Tumor begrenzt wird. Im Falle von Typ II liegt keine Infiltration vor und somit auch kein Trigger zur Hochregulation von PD-L1. Bei einer Typ-III-Konstellation wird bei Abwesenheit eines Immuninfiltrats von einer intrinsischen PD-L1-Hochregulation in den Tumorzellen ausgegangen. Bei einer Typ-IV-Konstellation wiederum besteht die Vermutung, dass der Tumor in der Lage ist, das bestehende Immuninfiltrat durch andere Mechanismen als eine PD-L1-Hochregulation zu begrenzen.

Im hier untersuchten Kollektiv ergab sich die in

Tabelle 29 angegebene Verteilung der vier Subtypen. In allen Lokalisationen war hier Typ IV am häufigsten vertreten, gefolgt von Typ I und an dritter Stelle Typ II und mit nur einzelnen Fällen von Typ III. Die Prädominanz der Typen I und IV stimmt mit einer bisherigen Studie zum HGSOC (J. R. Webb et al., 2016) überein, wenngleich dort Typ I mit 57,4% der Fälle deutlich häufiger vorkam als Typ IV (37,4% der Fälle). Dies könnte zu Teilen durch die bereits oben diskutierte verhältnismäßig geringe Ausprägung der PD-L1-Expression in unserer Arbeit erklärt sein. Hervorzuheben ist an dieser Stelle auch, dass in unserer Arbeit der Unterschied zwischen der Häufigkeit von Typ I und IV in den Metastasenlokalisationen deutlich geringer ausfällt als im Haupttumorgewebe. In der oben genannten Studie wurde nicht explizit angegeben, ob ausschließlich Ovarialtumor- oder auch Metastasengewebe untersucht worden ist. Der verhältnismäßig geringe Anteil an Typ II (5,1% der Fälle) in der genannten Studie passt zu der Tatsache, dass auch in der hier vorliegenden Arbeit Typ II der zweitseltenste war, wenngleich mit etwas höherer Häufigkeit als in der Studie. Dies ist insbesondere in Gegenüberstellung zu bisherigen Untersuchungen zum malignen Melanom bemerkenswert, wo dieser Typ als der häufigste (mit ca. 41%, gefolgt von Typ I mit ca. 38%) beschrieben ist, wohingegen Typ IV nur in etwa 20% der Fälle vorkommt (Teng et al., 2015).

Im Vergleich zwischen den Lokalisationen stimmen die prozentualen Anteile der verschiedenen immunologischen Typen in etwa mit den prozentualen Anteilen einer PD-L1-Expression überein, die ebenso wie Typ I am häufigsten im Peritonealgewebe und am seltensten im Haupttumor zu finden waren.

Prognostisch entspricht der Score etwa den Beobachtungen bei der separaten Analyse der Marker. CD8-Positivität als auch PD-L1-Positivität gehen einher mit einem besseren Überleben, eine Positivität beider Marker zeichnet sich als günstigster immunologischer Subtyp ab. Hier ist jedoch die Beurteilbarkeit stark eingeschränkt aufgrund der teils sehr geringen Fallzahlen in den Subgruppen und der sehr groben Einteilung in dichotomisierte Kategorien.

Tabelle 29: Abs. und rel. Anzahl der jeweiligen immunologischen Subtypen nach Teng nach Lokalisation, T = Subtyp nach Teng et al

T	Tumorepithel						Stroma					
	Haupttumor		Peritoneum		Omentum		Haupttumor		Peritoneum		Omentum	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
I	56	23,5	61	45,2	50	35,7	52	22,5	64	48,1	47	35,6
II	43	18,1	16	11,9	16	11,4	28	12,1	4	3,0	4	3,0
III	2	0,8	4	3,0	4	2,9	4	1,7	0	0,0	1	0,8
IV	137	57,6	54	40,0	70	50,0	147	63,6	65	48,9	80	60,6
ges.	238		135		140		231		133		132	

8 Zusammenfassung

Ziel dieser explorativen Arbeit war es, eine differenzierte Charakterisierung des Immunmilieus und der PD-L1-Expression in Haupttumor- und Metastasengewebe beim *high-grade* serösen Ovarialkarzinom darzustellen und dies prognostisch einzuordnen (Haupttumor meint dabei Tumor am Ovar). Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass im hier untersuchten Kollektiv eine Immuninfiltration im Tumorgewebe häufig ist und auch die Expression von PD-L1 zumindest in einem Teil der Fälle vorhanden ist. In diesem Kollektiv wurde eine höhere Immuninfiltration tendenziell mit einem besseren Überleben korreliert. Insgesamt scheint die Immuninfiltration im Metastasengewebe tendenziell höher zu sein als im Ovarialtumorgewebe. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwar ein Zusammenhang bezüglich der Zusammensetzung des Immuninfiltrats sowie der PD-L1-Expression zwischen Haupttumor und Metastasen besteht, dass jedoch in einem beträchtlichen Teil der Fälle Unterschiede vorliegen, weshalb insbesondere bei histologischen Charakterisierungen in therapieentscheidenden Situationen eine differenzierte Analyse mit gegebenenfalls separater Bewertung von Ovarialtumorgewebe und metastatischem Gewebe erfolgen sollte.

Limitierende Faktoren dieser Studie sind unter anderem das retrospektive Design, die begrenzte Fallzahl, die eingeschränkte Qualität des Materials sowie die Wahl von TMAs statt Full-Face-Schnitten. Da die Studie jedoch als explorative Arbeit zu verstehen ist, können die Ergebnisse als Grundlage für weitere Untersuchungen wegweisend sein. Insbesondere wäre in zukünftigen, prospektiven Studien interessant, auch den prädiktiven Stellenwert für das Ansprechen auf eine Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren getrennt nach Lokalisationen zu untersuchen. Für das langfristige Ziel einer personalisierten Therapiegestaltung sollte die Expressionsanalyse nicht nur auf den Haupttumor begrenzt werden, sondern eine vergleichende Analyse auch des Metastasengewebes erfolgen.

9 Anhang

Tabelle 30: Auswahl an Publikationen zur Expression von CD3, CD8 und FOXP3 in HGSOE.

Autor, Publikationsjahr	Probenmaterial	Definition „TILs positiv“	Untersuchtes Infiltrat	Assoziation mit Überleben
Ma, 1991	Cryosections (HE-Färbung, ANAE als Marker)	Cells/HPF: mild (<5), moderat (5-15), marked (>15)	TILs	positiv
Zhang, 2003	Cryosections	Any cells/HPF	CD3 e	positiv
Raspolini, 2004	Paraffin-embedded	Any cells/HPF	CD3	positiv
Sato, 2005	Paraffin-embedded	Upper two tertiles (N3.3 cells/20× HPF)	CD3 e	Keine
			CD8 e	positiv
			Tregs (3)	negativ
Hamanishi, 2007	Paraffin-embedded	≥5 cells/0.0625 mm ²	CD8 e	positiv
			CD8 s	keine
Tomsova, 2008	Paraffin-embedded	>Median (125 cells/mm ²)	CD3 e	positiv
			CD3 s	keine
Shah, 2008	Paraffin-embedded	(semiquantitative Untersuchung)	CD3	Keine
			CD8	
			FOXP3	
			CD8/FOXP3 Ratio	
Adams, 2009	Cryosections	Any cells/HPF (CD3) >10 cells/HPF (CD8 und FOXP3)	CD3 e	keine
			CD8 e	positiv
			FOXP3	Negativ (1)
Leffers, 2009	TMA of primary tumors and omental metastases	Upper two tertiles as number of cells/mm ²	CD8 e	Positiv
			FOXP3 e	positiv
			CD8/FOXP3 Ratio	positiv
Stumpf, 2009	TMA of primary tumors	Any cells/HPF	CD8 e	positiv
			CD8 s	keine
Clarke, 2009	TMA	Any cells/2 0.6 mm cores	CD8	positiv
			CD3	positiv
Milne, 2009	TMA	Any cells/HPF	CD3 e	positiv
			CD8 e	positiv
			FOXP3	positiv
Al Attar, 2009	TMA	E: low / high (</ ≥70 cell/mm ²) S: Any cells/HPF	CD3 e	positiv
			CD3 s	negativ
Barnett, 2009	Paraffin-embedded	(quantitative Untersuchung)	CD8	positiv
			FOXP3	keine
Knutson, 2015	Cryosections, Immunofluorescence	(quantitative Untersuchung)	CD8	positiv
			Tregs (2)	keine
			CD8/Treg Ratio	positiv
Goode, 2017	TMA	(semiquantitative Untersuchung, cells/HPF)	CD8	positiv
Montfort, 2020	TMA	(quantitative Untersuchung)	CD8 e	positiv
			CD8 s	Keine
De la Fuente	TMA, 6-8 Cores pro Patientin, aus HT und Metastasen gemischt	High: ≥ 50% der Cores mit ≥2% CD3+ pos Zellen	CD3	positiv

(1) nur in der multivariaten Überlebenszeitanalyse mit Berücksichtigung von R-Status, CD8, CD3, Ki67

(2) – Tregs : CD4+CD25+FOXP3+

(3) – Tregs: CD25+FOXP3+

Tabelle 30 zeigt alle Publikationen, die im Zeitraum bis 03/2022 in der Metadatenbank PubMed der nationalen medizinischen Bibliothek der Vereinigten Staaten durch die kombinierte Suche der Begriffe „Ovarian Cancer“ und „TILs“ gefunden wurden und die mittels histologischer Färbungen die Infiltrate durch CD3-, CD8 oder FOXP3-positiver TILs untersuchten und darauf basierend Überlebenszeitanalysen durchführten.

Tabelle 31: Auswahl an Publikationen zum Vergleich des Immunmilieus in Haupttumor und Metastasen des HGSOc.

Autor, Publikationsjahr	n	sonstiges	Untersuchtes Infiltrat	Assoziation mit Überleben
Leffers, 2008	306 (nur P: 159, O: 36, beide: 111)	Anteile von CD8 und FOXP3 in O höher als in Primarius	CD8 HT	Positiv
			CD8 OM	keine
			FOXP3 HT	In adv. St. pos. für Presence, aber nicht für quantitativ
			FOXP3 OM	In adv. St. Pos.
			CD8/FOXP3	positiv
Dötzer, 2019	49	Expressionen korreliert nur mit Platin sensitivity PD-L1 mit FIGO assoziiert, Expr. Höher in OM als in HT	PD-L1	Nicht untersucht
Bekos, 2021	111 (nur P: 44, nur Met: 14 beide: 53)	Met + HT Expression hängt nur für PD-L1 in TZ zusammen, alles andere ohne Korrelation	PD-L1 Met	negativ
			PD-L1 HT	negativ
			CD8 HT	Nur in multivariater Analyse signifikant
Parvathareddy, 2021	194	Unterschied zwischen der Expression in HT und Met signifikant	PD-L1 HT und MET	keine
Gottlieb, 2016	61, davon 21 auch Metastasen	Zusammenhang zwischen HT und Metastasen	PD-L1 Met und HT	Nicht untersucht

Tabelle 31 zeigt alle Publikationen, die im Zeitraum bis 03/2022 in der Metadatenbank PubMed der nationalen medizinischen Bibliothek der Vereinigten Staaten durch die kombinierte Suche der Begriffe „Ovarian Cancer“ und „TILs“ gefunden wurden und die mittels histologischer Färbungen die Infiltrate durch CD3-, CD8, PD-L1- oder FOXP3-positiver TILs (bzw. die PD-L1-Expression der Tumorzellen) untersuchten und vergleichende Analysen zwischen Ovarialtumor- und Metastasengewebe durchführten.

9.1 Protokoll Hämalaun/Eosin - Färbung

- 3 x 10 Min. Xylol für versiegelte Schnitte, sonst nur 2x 10 Min.)
- 5 Min. 2 x Isopropanol, 1 x 96%, 1 x 70% Alkohol
- 2 x 2-3 Min. mit TBS spülen
- 6 Min. Hämalaun nach Mayer von Roth T865.2
- 10 Min. bläuen (laufendes Leitungswasser)
- mit destilliertem Wasser spülen

- 1 Min. Eosin (Eosin G Lösung 1% wässrig, Roth Art.Nr.: 3137.2 1:10 mit Aqua Dest verdünnt + 1 Tr. Eisessig, Merck 1.00063.1000)
- A.Dest kurz spülen
- 1 Min. 96% Alkohol
- 2 x 3 Min. Isopropanol
- 2 x 3 Min. Xylol
- mit Pertex (Medite 41-4012-00) eindecken

TBS: 60,5g TRIZMA-Base (Sigma T – 1503) in 700 ml Aqua Dest lösen, mit 2 N Salzsäure auf pH 7,6 einstellen 90g NaCl (Merck 1.06404) lösen, ad 1000ml Aqua Dest, pH überprüfen

Gebrauchslösung: Stocklsg. 1:10 mit Aqua Dest verdünnen

9.2 Färbeprotokoll PD-L1 Original

Prozedur: XT VENTANA PD-L1(SP263) Assay (Zusammenfassung)
BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul
Experimentelle Pathologie, Ismaninger Str.22 Muenchen

Protokoll-Nr.	Protokollname	erstellt am
1	PDL1 SP263	29.12.2016

- 1 Primär Antikörper [Ausgewählt]
- 2 Hämatoxylin II [Ausgewählt]
- 3 1 Tropfen HEMATOXYLIN II auftragen, Coverslip auftragen, und für [8 Minuten] inkubieren.

AK: Ventana SP263 Rabbit Monoclonal Primary Antibody
 ~ 16,1 µg/ml
 Lot 429026
 Ref 790-4905
 - Vorverdünnt -

Protokoll-Nr. 1 : PDL1 SP263 (29.12.2016)
Prozedur: XT VENTANA PD-L1(SP263) Assay
BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul

Schritt-Nr	Protokollschritt
1	***** EZ Prep Auswählen *****
2	***** Getrimete Schritte Starten *****
3	***** Mischer Aus *****
4	Aufheizen des Objektträgers bis 75 °C, und für 4 Minuten inkubieren
5	EZPrep Vol. ausgleichen
6	Objektträger waschen
7	EZPrep Vol. ausgleichen
8	Objektträger waschen
9	EZPrep Vol. ausgleichen
10	Coverslip auftragen
11	Aufheizen des Objektträgers bis 76 °C, und für 4 Minuten inkubieren
12	Objektträger waschen
13	Deparaffinierung Vol. ausgleichen
14	Coverslip auftragen
15	Objektträger-Heizung ausschalten
16	***** Mischer An *****
17	Objektträger waschen
18	Cell Conditioner Nr.1 lang auftragen
19	Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip lang
20	Aufheizen des Objektträgers bis 95 °C, und für 4 Minuten inkubieren
21	Inkubieren für 4 Minuten
22	Aufheizen des Objektträgers bis 100 °C, und für 8 Minuten inkubieren
23	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
24	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
25	Inkubieren für 8 Minuten
26	Inkubieren für 8 Minuten
27	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
28	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
29	Inkubieren für 8 Minuten
30	Inkubieren für 8 Minuten
31	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
32	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
33	Inkubieren für 8 Minuten
34	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
35	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
36	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
37	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
38	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
39	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
40	Objektträger-Heizung ausschalten
41	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
42	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
43	Spülen mit Reaktionspuffer
44	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
45	Coverslip auftragen

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
 Experimentelle Pathologie, Ismaninger Str.22 Muenchen
 NexES v10.6

Gedruckt 28.11.2018 14:45:34
 Seite 1 von 3

Protokoll-Nr. 1 : PDL1 SP263 (29.12.2016)

Prozedur: XT VENTANA PD-L1(SP263) Assay

BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul

Schritt-Nr	Protokollschritt
46	***** SSC Wash Auswählen *****
47	***** Synchronisieren der Prozeduren
48	Aufwärmen der Objektträger auf 37 °C
49	Spülen mit Reaktionspuffer
50	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
51	1 Tropfen OV PEROX IHBTR auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
52	Spülen mit Reaktionspuffer
53	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
54	Coverslip auftragen
55	Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
56	Spülen mit Reaktionspuffer
57	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
58	Coverslip, einen Tropfen von V-PDL1 (SP263) C auftragen und für 0 Stunden 16 Min inkubieren
59	Spülen mit Reaktionspuffer
60	Apply 460ul + VA Reaction Buffer
61	Coverslip auftragen
62	Spülen mit Reaktionspuffer
63	Apply 460ul + VA Reaction Buffer
64	Coverslip auftragen
65	Spülen mit Reaktionspuffer
66	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
67	Coverslip, einen Tropfen von OV HQ UNIV LINKR auftragen und für 8 Minuten inkubieren
68	Spülen mit Reaktionspuffer
69	Apply 460ul + VA Reaction Buffer
70	Coverslip auftragen
71	Spülen mit Reaktionspuffer
72	Apply 460ul + VA Reaction Buffer
73	Coverslip auftragen
74	Spülen mit Reaktionspuffer
75	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
76	Coverslip, einen Tropfen von OV HRP MULTIMER auftragen und für 8 Minuten inkubieren
77	Spülen mit Reaktionspuffer
78	900 ul Reaktionspuffer auftragen
79	Coverslip auftragen
80	Spülen mit Reaktionspuffer
81	Apply 460ul + VA Reaction Buffer
82	Coverslip auftragen
83	Spülen mit Reaktionspuffer
84	Apply 460ul + VA Reaction Buffer
85	Coverslip auftragen
86	Spülen mit Reaktionspuffer
87	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
88	1 Tropfen OV H2O2 und einen Tropfen OV DAB auftragen, LCS auftragen und für 8 Minuten inkubieren.
89	Spülen mit Reaktionspuffer
90	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

X

Optiview DAB
IHC Detection
Ventana
(→ sensitive)

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
Experimentelle Pathologie, Ismaninger Str.22 Muenchen
NexES v10.6

Gedruckt 28.11.2018 14:45:34
Seite 2 von 3

Protokoll-Nr. 1 : PDL1 SP263 (29.12.2016)

Prozedur: XT VENTANA PD-L1(SP263) Assay

BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul

Schritt-Nr	Protokollschritt
91	1 Tropfen OV.COPPER auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
92	Spülen mit Reaktionspuffer
93	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
94	Coverslip auftragen
95	Objekträger-Heizung ausschalten
96	***** Optionalen Waschvorgang Auswählen *****
97	***** SSC.Wash Auswählen *****
98	Aufwärmen der Objekträger auf 37 °C
99	Spülen mit Reaktionspuffer
100	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
101	1 Tropfen HEMATOXYLIN II auftragen, Coverslip auftragen, und für [8 Minuten] inkubieren.
102	Spülen mit Reaktionspuffer
103	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
104	Coverslip auftragen
105	Spülen mit Reaktionspuffer
106	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
107	1 Tropfen BLUING REAGENT auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
108	Spülen mit Reaktionspuffer
109	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
110	Coverslip auftragen
111	Objekträger-Heizung ausschalten
112	***** Getimete Schritte Starten *****
113	Spülen mit Reaktionspuffer

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
Experimentelle Pathologie, Ismaninger Str.22 München
NexES v10.6

Gedruckt 28.11.2018 14:45:34
Seite 3 von 3

9.3 Färbeprotokoll weitere Biomarker Original

fr. Janna

Prozedur: XT ultraView DAB v3 (Zusammenfassung)
BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul
Experimentelle Pathologie, Ismaninger Str.22 Muenchen

- 1 Paraffin [Ausgewählt]
2 Entparaffinierung [Ausgewählt]
3 Hitzevorbehandlung [Ausgewählt]
4 Cell Conditioner 1 [Ausgewählt]
5 Mildes CC1 [Ausgewählt]
6 Standard CC1 [Ausgewählt]
7 Titration [Ausgewählt]
8 ***** Handauftrag (Primär Antikörper), und für [0 Stunden 32 Min] inkubieren *****
9 Gegenfärbung [Ausgewählt]
10 1 Tropfen von [COUNTERSTAIN 2] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [8 Minuten] inkubieren.
11 Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]
12 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.

PD-1 1:50

CD 56 1:100

CD 8 1:100

CD 4 1:20

CD 3 1:500

FoxP3 1:200

alle Protokoll - Nr. 301

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
Experimentelle Pathologie, Ismaninger Str.22 Muenchen
NexES v10.6

Gedruckt 13.09.2017 12:33:28
Seite 1 von 1

für Janna

Protokoll-Nr. 301 : T CeP CC1 (24.04.2017)

Prozedur: XT ultraView DAB v3

BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul

Schritt-Nr	Protokollschritt
1	***** EZ Prep Auswählen *****
2	***** Getimete Schritte Starten *****
3	***** Mischer Aus *****
4	Aufheizen des Objektträgers bis 75 °C, und für 4 Minuten inkubieren
5	EZPrep Vol. ausgleichen
6	Objektträger waschen
7	EZPrep Vol. ausgleichen
8	Objektträger waschen
9	EZPrep Vol. ausgleichen
10	Coverslip auftragen
11	Aufheizen des Objektträgers bis 76 °C, und für 4 Minuten inkubieren
12	Objektträger waschen
13	Deparaffinierung Vol. ausgleichen
14	Coverslip auftragen
15	Objektträger-Heizung ausschalten
16	***** Mischer An *****
17	[Kurz- 8 Minuten Conditioning]
18	Objektträger waschen
19	Cell Conditioner Nr.1 lang auftragen
20	Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip lang
21	***** SSC Wash Auswählen *****
22	Aufheizen des Objektträgers bis 95 °C, und für 8 Minuten inkubieren
23	[Mild - 30 Minuten Conditioning]
24	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
25	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
26	Aufheizen des Objektträgers bis 100 °C, und für 4 Minuten inkubieren
27	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
28	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
29	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
30	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
31	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
32	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
33	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
34	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
35	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
36	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
37	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
38	[Standard - 60 Minuten Conditioning]
39	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
40	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
41	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
42	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
43	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
44	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
45	Cell Conditioner Nr.1 auftragen

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
Experimentelle Pathologie, Ismaninger Str.22 Muenchen
NexES v10.6

Gedruckt 13.09.2017 12:33:53
Seite 1 von 3

Protokoll-Nr. 301 : T CeP CC1 (24.04.2017)

Prozedur: XT ultraView DAB v3

BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul

Schritt-Nr	Protokollschritt
46	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
47	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
48	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
49	Cell Cond Nr.1 kurz auftragen
50	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
51	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
52	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
53	Objekträger-Heizung ausschalten
54	Inkubieren für 8 Minuten
55	Spülen mit Reaktionspuffer
56	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
57	Coverslip auftragen
58	Spülen mit Reaktionspuffer
59	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
60	Coverslip auftragen
61	***** Synchronisieren der Prozeduren
62	Aufheizen des Objekträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
63	Spülen mit Reaktionspuffer
64	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
65	1 Tropfen UV INHIBITOR auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
66	Spülen mit Reaktionspuffer
67	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
68	Coverslip auftragen
69	Aufheizen des Objekträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
70	Spülen mit Reaktionspuffer
71	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
72	Coverslip auftragen
73	***** Handauftrag (Primär Antikörper), und für [0 Stunden 32 Min] inkubieren *****
74	Spülen mit Reaktionspuffer
75	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
76	Coverslip auftragen
77	Aufheizen des Objekträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
78	Spülen mit Reaktionspuffer
79	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
80	1 Tropfen UV HRP UNIV MULT auftragen, Coverslip auftragen, und für 8 Minuten inkubieren.
81	Spülen mit Reaktionspuffer
82	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
83	Coverslip auftragen
84	Spülen mit Reaktionspuffer
85	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
86	1 Tropfen UV DAB und einen Tropfen UV DAB H2O2 auftragen, LCS auftragen und für 8 Minuten inkubieren.
87	Spülen mit Reaktionspuffer
88	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
89	1 Tropfen UV COPPER auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
90	Spülen mit Reaktionspuffer

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
Experimentelle Pathologie, Ismaninger Str.22 Muenchen
NexES v10.6

Gedruckt 13.09.2017 12:33:53
Seite 2 von 3

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: FIGO-Klassifikation (2014)	8
Tabelle 2: Deskriptive Daten zum Kollektiv.....	24
Tabelle 3: Färbeprotokoll T CeP CC1 Nr. 301.....	25
Tabelle 4: Färbeprotokoll PDL SP263 Nr. 1	26
Tabelle 5: Kategorienbildung für jeweilige dichotome Nominalskalen.....	31
Tabelle 6: Schema für die Bildung einer CD8/FOXP3-Ratio	33
Tabelle 7: Schema für die Bildung eines CD8/FOXP3-Scores.....	33
Tabelle 8: Schema für die Bildung von immunologischen Typen I - IV	34
Tabelle 9: Schema für die Bildung eines Heterogenitäts-Index	34
Tabelle 10: Schema für die Bildung eines Heterogenitäts-Scores	35
Tabelle 11: Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen.....	36
Tabelle 12: Verwendete Reagenzien für die immunhistochemischen Färbungen.....	36
Tabelle 13: CD3-Expression nach Lokalisation.....	39
Tabelle 14: Anzahl der Fälle mit als positiv/"high" gewerteter CD3-Expression nach Lokalisation ...	40
Tabelle 15: CD8-Expression nach Lokalisation.....	40
Tabelle 16: Anzahl der Fälle mit als positiv/"high" gewerteter CD8-Expression nach Lokalisation ...	40
Tabelle 17: FOX-P3-Expression nach Lokalisation.....	41
Tabelle 18: Anzahl der Fälle mit als positiv gewerteter FOXP3-Expression nach Lokalisation	41
Tabelle 19: PD-L1-Expression nach Lokalisation	42
Tabelle 20: Anzahl der Fälle mit als positiv gewerteter PD-L1-Expression nach Lokalisation.....	42
Tabelle 21: Übersicht über die Zusammenhänge mit dem Gesamtüberleben.....	44
Tabelle 22: Übersicht über die Zusammenhänge mit dem progressionsfreien Überleben.....	44
Tabelle 23: Anzahl der jeweiligen immunologischen Subtypen nach Teng nach Lokalisation.....	73
Tabelle 24: Anteile der Fälle, die "positiv"/"high" für CD3 gewertet wurden nach Lokalisation	79
Tabelle 25: Anteile der Fälle, die "positiv"/"high" für CD8 gewertet wurden nach Lokalisation	79
Tabelle 26: Anteile der Fälle, die "positiv" für FOXP3 gewertet wurden nach Lokalisation	79
Tabelle 27: Anteile der Fälle, die "positiv" für PD-L1 gewertet wurden nach Lokalisation	79
Tabelle 28: Auswahl an Publikationen zur PD-L1-Expression in HGSOC	82
Tabelle 29: Anzahl der jeweiligen immunologischen Subtypen nach Teng nach Lokalisation.....	89
Tabelle 30: Auswahl an Publikationen zur Expression von CD3, CD8 und FOXP3 in HGSOC.	91
Tabelle 31: Auswahl an Publikationen zum Vergleich von Haupttumor und Metastasen.	92

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die in dieser Arbeit relevanten TILs, Biomarker und Interaktionen.....	13
Abbildung 2: Schema zur semiquantitativen Auswertung.	28
Abbildung 3: Orientierungshilfe für die semiquantitative Auswertung (für CD3 und CD8).....	29
Abbildung 4: Beispiele für vergebene Scores (FOXP3)	29
Abbildung 5: Beispiele für vergebene Scores (PD-L1).....	30
Abbildung 6: Expression der untersuchten Immun-Marker nach Lokalisation.....	38
Abbildung 7: Überlebenskurven (OS) in Abhängigkeit klinischer Parameter	43
Abbildung 8: Überlebenskurven (OS) in Abhängigkeit der CD3-Expressionsrate.....	46
Abbildung 9: Überlebenskurven (PFS) in Abhängigkeit der CD3-Expressionsrate	47
Abbildung 10: Überlebenskurven (OS) in Abh. der CD3-Expressionsrate nach Resektionsstatus.....	48
Abbildung 11: Überlebenskurven (OS) in Abhängigkeit der CD8-Expressionsrate.....	50
Abbildung 12: Überlebenskurven (PFS) in Abhängigkeit der CD8-Expressionsrate	51
Abbildung 13: Überlebenskurven (OS) in Abh. der CD8-Expressionsrate nach Resektionsstatus.....	52
Abbildung 14: Überlebenskurven (OS) in Abh. der FOXP3-Expressionsrate (dichotomisiert)	54
Abbildung 15: Überlebenskurven (OS) in Abhängigkeit der FOXP3-Expressionsrate (gruppiert).....	55
Abbildung 16: Überlebenskurven (OS) in Abh. der FOXP3-Expressionsrate nach Resektionsstatus..	56
Abbildung 17: Überlebenskurven (OS) in Abhängigkeit der PD-L1-Expressionsrate	58
Abbildung 18: Überlebenskurven (PFS) in Abhängigkeit der PD-L1-Expressionsrate.....	59
Abbildung 19: Überlebenskurven (OS) in Abh. der PD-L1-Expressionsrate nach Resektionsstatus ...	60
Abbildung 20: Korrelationstabeln der verschiedenen Immunmarker miteinander	61
Abbildung 21: Korrelationstafel der CD3-Expression zwischen verschiedenen Lokalisationen.....	63
Abbildung 22: Sankey-Diagramm zur CD3-Expression (Epithel).....	64
Abbildung 23: Sankey-Diagramm zur CD3-Expression (Stroma).....	64
Abbildung 24: Korrelationstabeln der CD8-Expression zwischen verschiedenen Lokalisationen.....	65
Abbildung 25: Sankey-Diagramm zur CD8-Expression (Epithel).....	66
Abbildung 26: Sankey-Diagramm zur CD8-Expression (Stroma).....	66
Abbildung 27: Sankey-Diagramm zur FOXP3-Expression (Epithel).	67
Abbildung 28: Sankey-Diagramm zur FOXP3-Expression (Stroma).	68
Abbildung 29: Korrelationstafel der FOXP3-Expression zwischen verschiedenen Lokalisationen	68
Abbildung 30: Korrelationstafel der PD-L1-Expression zwischen verschiedenen Lokalisationen	69
Abbildung 31: Sankey-Diagramm zur PD-L1-Expression (Immunzellen).....	70
Abbildung 32: Sankey-Diagramm zur PD-L1-Expression (Tumorzellen).....	70
Abbildung 33: Überlebenskurven in Abhängigkeit des Heterogenitätsindex	71
Abbildung 34: Überlebenskurven in Abhängigkeit des Heterogenitätsscores	72

Abbildung 35: Immunologische Typen nach Lokalisation	73
Abbildung 36: Überlebenskurven in Abhängigkeit des immunologischen Typs.....	74
Abbildung 37: Sankey-Diagramm zur CD3/CD8-Ratio (Epithel).	75
Abbildung 38: Sankey-Diagramm zur CD3/CD8-Ratio (Stroma).	76
Abbildung 39: Überlebenskurven in Abh. der CD8/FOXP3-Ratio im Omentummetastasengewebe...	77
Abbildung 40: Überlebenskurven in Abh. des CD8/FOXP3-Scores in Peritonealmetastasen.....	77
Abbildung 41: Übersicht zu den Expressionsraten von PD-L1 in verschiedenen Studien.....	80

12 Literaturverzeichnis

- Abiko, K., Mandai, M., Hamanishi, J., Yoshioka, Y., Matsumura, N., & Baba, T. (2013). PD-L1 on Tumor Cells Is Induced in Ascites and Promotes Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer through CTL Dysfunction. *Clin Cancer Res*, 19(6), 1363–1375. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2199>
- Adams, S. F., Levine, D. A., Cadungog, M. G., Hammond, R., Facciabene, A., Olvera, N., Rubin, S. C., Boyd, J., & Coukos, G. (2009). Intraepithelial T Cells and Tumor Proliferation. *Cancer*, 115(13), 2891–2902. <https://doi.org/10.1002/cncr.24317>
- Akkaya, B., & Shevach, E. M. (2022). Regulatory T cells: Master Thieves of the Immune System. *Cellular Immunology*, 355. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104160>.Regulatory
- Al-Attar, A., Shehata, M., Durrant, L., Moseley, P., Deen, S., & Chan, S. (2010). T cell density and location can influence the prognosis of ovarian cancer. *Pathology and Oncology Research*, 16(3), 361–370. <https://doi.org/10.1007/s12253-009-9230-5>
- Aust, S., Felix, S., Auer, K., Bachmayr-heyda, A., Kenner, L., Dekan, S., Meier, S. M., Gerner, C., Grimm, C., & Pils, D. (2017). Absence of PD-L1 on tumor cells is associated with reduced MHC I expression and PD-L1 expression increases in recurrent serous ovarian cancer. *Sci Rep*, 7(7), 42929. <https://doi.org/10.1038/srep42929>
- Bachmayr-heyda, A., Aust, S., Heinze, G., Polterauer, S., Grimm, C., Braicu, E. I., Sehouli, J., Lambrechts, S., Vergote, I., Mahner, S., Pils, D., Schuster, E., Thalhammer, T., Horvat, R., Denkert, C., Zeillinger, R., & Castillo-tong, D. C. (2013). Prognostic impact of tumor infiltrating CD8 + T cells in association with cell proliferation in ovarian cancer patients - a study of the OVCAD consortium. *BMC Cancer*, 13, 422. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-422>
- Baci, D., Bosi, A., Gallazzi, M., Rizzi, M., & Noonan, D. M. (2020). The Ovarian Cancer Tumor Immune Microenvironment (TIME) as Target for Therapy: A Focus on Innate Immunity Cells as Therapeutic Effectors. *Int J Mol Sci*, 21(9), 1–24.
- Balogun, N., Forbes, A., Widschwendter, M., & Lanceley, A. (2012). Noninvasive nutritional management of ovarian cancer patients: Beyond intestinal obstruction. *International Journal of Gynecological Cancer*, 22(6), 1089–1095. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e318256e4d3>
- Bankhead, C. R., Kehoe, S. T., & Austoker, J. (2005). Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 112(7), 857–865. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00572.x>
- Barbolina, M. V. (2018). Molecular Mechanisms Regulating Organ-Specific Metastases in Epithelial Ovarian Carcinoma. *Cancers (Basel)*, 10(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cancers10110444>

- Barnett, J. C., Bean, S. M., Whitaker, R. S., Kondoh, E., Baba, T., Fujii, S., Marks, J. R., Dressman, H. K., Murphy, S. K., & Berchuck, A. (2010). Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (Treg) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecologic Oncology*, 116(3), 556–562. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.11.020>
- Bekos, C., Pils, D., Dekan, S., Hofstetter, G., Horak, P., Reinthaller, A., Polterauer, S., Schwameis, R., & Aust, S. (2021). PD-1 and PD-L1 expression on TILs in peritoneal metastases compared to ovarian tumor tissues and its associations with clinical outcome. *Scientific reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-85966-0>
- Bell, D., Berchuck, A., Birrer, M., Chien, J., Cramer, D. W., Dao, F., Dhir, R., Disaia, P., Gabra, H., Glenn, P., Godwin, A. K., Gross, J., Hartmann, L., Huang, M., Huntsman, D. G., Iacocca, M., Imielinski, M., Kalloger, S., Karlan, B. Y., ... Thomson, E. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474(7353), 609–615. <https://doi.org/10.1038/nature10166>
- Brestoff, J. R., Kim, B. S., Saenz, S. A., Stine, R. R., Monticelli, L. A., Sonnenberg, G. F., Thome, J. J., Farber, D. L., Lutfy, K., Seale, P., & Artis, D. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature*, 519(7542), 242–246. <https://doi.org/10.1038/nature14115>.Group
- Bronger, H. (2021). Immunology and Immune Checkpoint Inhibition in Ovarian Cancer - Current Aspects. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 81(10), 1128–1144. <https://doi.org/10.1055/a-1475-4335>
- Bronger, H., Singer, J., Windmüller, C., Reuning, U., Zech, D., Delbridge, C., Dorn, J., Kiechle, M., Schmalfeldt, B., Schmitt, M., & Avril, S. (2016). CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer. *Br J Cancer*, 115(5), 553–563. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.172>
- Buttmann-Schweiger, N., & Kraywinkel, K. (2019). Epidemiologie von Eierstockkrebs in Deutschland. *Der Onkologe*, 25, 92–98. <https://doi.org/10.1007/s00761-018-0507-8>
- Cai, J., Tang, H., Xu, L., Wang, X., Yang, C., Ruan, S., Guo, J., & Hu, S. (2012). Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. *Carcinogenesis*, 33(1), 20–29. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr230>
- Cannistra, S. A. (2004). Cancer of the ovary. In *New England Journal of Medicine* (Bd. 351, Nummer 24, S. 2519–2529). <https://doi.org/10.1056/NEJMra041842>
- Chene, G., Lamblin, G., Bail-carval, K. Le, Chabert, P., Golfier, F., Dauplat, J., Deligdisch, L., Penault-llorca, F., & Mellier, G. (2015). Salpingectomy prophylactique ou annexectomie prophylactique dans la prévention du cancer de l’ovaire ? [Prophylactic salpingectomy or salpingo-oophorectomy as an ovarian cancer prevention?]. *La Presse Medicale*, 44(3), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.07.024>
- Christian, H., Visetsouk, M. R., Fleszar, A. J., & Kreeger, P. K. (2020). The Many Microenvironments of Ovarian Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1296, 199–213. https://doi.org/10.1007/978-3-030-59038-3_12
- Cipolletta, D., Cohen, P., Spiegelman, B. M., Benoist, C., & Mathis, D. (2014). Appearance and disappearance of the mRNA signature characteristic of Treg cells in visceral adipose

- tissue: age, diet, and PPAR γ effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(2), 482–487.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1423486112>
- Clark, T. G., Stewart, M. E., Altman, D. G., Gabra, H., & Smyth, J. F. (2001). A prognostic model for ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 85(7), 944–952.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6692030>
- Clarke, B., Tinker, A. V, Lee, C., Subramanian, S., Rijn, M. Van De, Turbin, D., Kalloger, S., Han, G., Ceballos, K., Cadungog, M. G., Huntsman, D. G., Coukos, G., & Gilks, C. B. (2009). Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma : novel associations with stage , tumor type , and BRCA1 loss. *Mod Pathol*, 22(3), 393–402.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.191>
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., ... Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, 10(9), 942–949.
<https://doi.org/10.1038/nm1093>
- Darb-Esfahani, S., Kunze, C. A., Kulbe, H., Sehouli, J., Wienert, S., Lindner, J., Budczies, J., Bockmayr, M., Dietel, M., Denkert, C., Braicu, I., & Jöhrens, K. (2016). Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget*, 7(2), 1486–1499. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6429>
- de Vries, J. E., Yssel, H., & Spits, H. (1989). Interplay between the TCR/CD3 Complex and CD4 or CD8 in the Activation of Cytotoxic T Lymphocytes. *Immunological Reviews*, 109(1), 119–142. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1989.tb00022.x>
- Disis, M. L., Taylor, M. H., Kelly, K., Beck, J. T., Gordon, M., Moore, K. M., Patel, M. R., Chaves, J., Park, H., Mita, A. C., Hamilton, E. P., Annunziata, C. M., Grote, H. J., & Heydebreck, A. Von. (2019). Efficacy and Safety of Avelumab for Patients With Recurrent or Refractory Ovarian Cancer Phase 1b Results From the JAVELIN Solid Tumor Trial. *JAMA Oncology*, 8050(3), 393–401.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.6258>
- Diskin, B., Adam, S., Cassini, M. F., Sanchez, G., Liria, M., Aykut, B., Buttar, C., Li, E., Sundberg, B., Salas, R. D., Chen, R., Wang, J., Kim, M., Saad Farooq, M., Nguy, S., Fedele, C., Ho Tang, K., Chen, T., Wang, W., ... Miller, G. (2020). PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nature Immunology*, 21(4), 442–454.
<https://doi.org/10.1038/s41590-020-0620-x>
- Donnell, J. S. O., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(3), 151–167. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>
- Dötzer, K., Schlüter, F., Schoenberg, M. B., Bazhin, A. V, von Koch, F. E., Schnelzer, A., Anthuber, S., Grab, D., Czogalla, B., Burges, A., Werner, J., Mahner, S., & Mayer, B. (2019). Immune Heterogeneity Between Primary Tumors and Corresponding Metastatic

- Lesions and Response to Platinum Therapy in Primary Ovarian Cancer. *Cancers*, 11(9), 1250. <https://doi.org/10.3390/cancers11091250>
- Drakes, M. L., Mehrotra, S., Aldulescu, M., Potkul, R. K., Liu, Y., Grisoli, A., Joyce, C., O'Brien, T. E., Stack, S., & Stiff, P. J. (2018). Stratification of ovarian tumor pathology by expression of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand-1 (PD-L1) in ovarian cancer. *J Ovarian Res*, 11(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13048-018-0414-z>
- du Bois, A., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., & Pfisterer, J. (2009). Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzin. *Cancer*, 115(6), 1234–1244. <https://doi.org/10.1002/cncr.24149>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting : from immuno- surveillance to tumor escape. *Nat Immunol.*, 3(11), 991–998.
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 329–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>
- Fan, C. (Ava), Reader, J., & Roque, D. M. (2018). Review of Immune Therapies Targeting Ovarian Cancer. In *Current Treatment Options in Oncology* (Bd. 19, Nummer 12). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11864-018-0584-3>
- Farhood, B., Najafi, M., & Mortezaee, K. (2019). CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8509–8521. <https://doi.org/10.1002/jcp.27782>
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2020). Ovarian Cancer Incidence and Mortality. *International Agency for Research on Cancer (IARC) GLOBOCAN*, 5–6.
- Ford, C. E., Werner, B., Hacker, N. F., & Warton, K. (2020). The untapped potential of ascites in ovarian cancer research and treatment. *Br J Cancer*, 123(1), 9–16. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0875-x>
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2015). Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*, 28(6), 690–714. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.10.012>
- Gavin, M. A., Rasmussen, J. P., Fontenot, J. D., Vasta, V., Manganiello, V. C., Beavo, J. A., & Rudensky, A. Y. (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*, 445(7129), 771–775. <https://doi.org/10.1038/nature05543>
- Gockley, A. A., & Elias, K. M. (2018). Fallopian tube tumorigenesis and clinical implications for ovarian cancer risk-reduction. In *Cancer Treatment Reviews* (Bd. 69, S. 66–71). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.06.004>

- Gottlieb, C. E., Mills, A. M., Cross, J. V., & Ring, K. L. (2017). Tumor-associated macrophage expression of PD-L1 in implants of high grade serous ovarian carcinoma: A comparison of matched primary and metastatic tumors. *Gynecologic Oncology*, 144(3), 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.12.021>
- Hamanishi, J., Mandai, M., Ikeda, T., Minami, M., Kawaguchi, A., Murayama, T., Kanai, M., Mori, Y., Matsumoto, S., Chikuma, S., Matsumura, N., Abiko, K., Baba, T., Yamaguchi, K., Ueda, A., Hosoe, Y., Morita, S., Yokode, M., Shimizu, A., ... Konishi, I. (2015). Safety and antitumor activity of Anti-PD-1 antibody, nivolumab, in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(34), 4015–4022. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.3397>
- Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K., Higuchi, T., Yagi, H., Takakura, K., Minato, N., Honjo, T., & Fujii, S. (2007). Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor- infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *PNAS*, 104(9).
- Harter, P., Sehouli, J., Lorusso, D., Reuss, A., Vergote, I., Marth, C., Kim, J.-W., Raspagliesi, F., Lampe, B., Aletti, G., Meier, W., Cibula, D., Mustea, A., Mahner, S., Runnebaum, I. B., Schmalfeldt, B., Burges, A., Kimmig, R., Scambia, G., ... du Bois, A. (2019). A Randomized Trial of Lymphadenectomy in Patients with Advanced Ovarian Neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 380(9), 822–832. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1808424>
- Höhn, A. K., Einkenkel, J., Wittekind, C., & Horn, L. C. (2014). Neue FIGO-Klassifikation des Ovarial-, Tuben und primären Peritonealkarzinoms. *Pathologe*, 35(4), 322–326. <https://doi.org/10.1007/s00292-014-1908-0>
- Huang, A. C., & Zappasodi, R. (2022). A decade of checkpoint blockade immunotherapy in melanoma: understanding the molecular basis for immune sensitivity and resistance. *Nature Immunology*, 23(5), 660–670. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01141-1>
- Hwang, W., Adams, S. F., Tahirovic, E., Hagemann, I. S., & Coukos, G. (2012). Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*, 124(2), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.09.039>
- James, N. E., Woodman, M., & Ribeiro, J. R. (2022). Prognostic immunologic signatures in epithelial ovarian cancer. *Oncogene*, 41(10), 1389–1396. <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02181-5>
- Jiménez-Sánchez, A., Memon, D., Pourpe, S., Veeraraghavan, H., Li, Y., Vargas, H. A., Gill, M. B., Park, K. J., Zivanovic, O., Konner, J., Ricca, J., Zamarin, D., Walther, T., Aghajanian, C., Wolchok, J. D., Sala, E., Merghoub, T., Snyder, A., & Miller, M. L. (2017). Heterogeneous Tumor-Immune Microenvironments among Differentially Growing Metastases in an Ovarian Cancer Patient. *Cell*, 170(5), 927-938.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.025>
- Jones, M. R., Kamara, D., Karlan, B. Y., Pharoah, P. D. P., & Gayther, S. A. (2017). Genetic epidemiology of ovarian cancer and prospects for polygenic risk prediction. In *Gynecologic Oncology* (Bd. 147, Nummer 3, S. 705–713). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.10.001>

- Karwacz, K., Bricogne, C., Macdonald, D., Arce, F., Bennett, C. L., Collins, M., & Escors, D. (2011). PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8⁺ T cells. *EMBO Mol Med*, 3(10), 581–592. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100165>
- Kastelein, A. W., Vos, L. M. C., de Jong, K. H., van Baal, J. O. A. M., Nieuwland, R., van Noorden, C. J. F., Roovers, J. P. W. R., & Lok, C. A. R. (2019). Embryology, anatomy, physiology and pathophysiology of the peritoneum and the peritoneal vasculature. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Bd. 92, S. 27–36). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.09.007>
- Khalique, L., Ayhan, A., Whittaker, J. C., Singh, N., Jacobs, I. J., Gayther, S. A., & Ramus, S. J. (2009). The clonal evolution of metastases from primary serous epithelial ovarian cancers. *International Journal of Cancer*, 124(7), 1579–1586. <https://doi.org/10.1002/ijc.24148>
- Kim, K. H., Choi, K. U., Kim, A., Lee, S. J., Lee, J. H., Suh, D. S., Kwon, B., & Hwang, C. (2019). PD-L1 expression on stromal tumor-infiltrating lymphocytes is a favorable prognostic factor in ovarian serous carcinoma. *J Ovarian Res*, 21(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0526-0>
- Knutson, K. L., Maurer, M. J., Preston, C. C., Moysich, K. B., Goergen, K., Hawthorne, K. M., Cunningham, J. M., Odunsi, K., Hartmann, L. C., Kalli, K. R., Oberg, A. L., & Goode, E. L. (2015). Regulatory T cells, inherited variation, and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(12), 1495–1504. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1753-x>
- Kobayashi, H., Yamada, Y., Sado, T., Sakata, M., Yoshida, S., Kawaguchi, R., Kanayama, S., Shigetomi, H., Haruta, S., Tsuji, Y., Ueda, S., & Kitanaka, T. (2008). A randomized study of screening for ovarian cancer: A multicenter study in Japan. *International Journal of Gynecological Cancer*, 18(3), 414–420. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.01035.x>
- Konecny, G. E., Wang, C., Hamidi, H., Winterhoff, B., Kalli, K. R., Dering, J., Ginther, C., Chen, H. W., Dowdy, S., Cliby, W., Gostout, B., Podratz, K. C., Keeney, G., Wang, H. J., Hartmann, L. C., Slamon, D. J., & Goode, E. L. (2014). Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(10), dju249. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju249>
- Krebs in Deutschland für 2017/2018, 3.21 Eierstöcke. (2017). In *Krebs in Deutschland* (13., S. 102–105). och-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
- Kuhns, M. S., Davis, M. M., & Garcia, K. C. (2006). Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity*, 24(2), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.006>
- Lee, E. K., & Konstantinopoulos, P. A. (2019). Combined PARP and Immune Checkpoint Inhibition in Ovarian Cancer. *Trends in Cancer*, 5(9), 524–528. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.06.004>

- Leffers, N., Gooden, M. J. M., De Jong, R. A., Hooijboom, B. N., Ten Hoor, K. A., Hollema, H., Boezen, H. M., Van Der Zee, A. G. J., Daemen, T., & Nijman, H. W. (2009). Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 58(3), 449–459. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0583-5>
- Lengyel, E. (2010). Ovarian Cancer Development and Metastasis. *The American Journal of Pathology*, 177(3), 1053–1064. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100105>
- Li, C., Jiang, P., Wei, S., Xu, X., & Wang, J. (2020). Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Mol Cancer*, 19(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01234-1>
- Li, J., Wang, J., Chen, R., Bai, Y., & Lu, X. (2017). The prognostic value of tumor-infiltrating T lymphocytes in ovarian cancer. *Oncotarget*, 8(9), 15621–15631. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14919>
- Liebermann-Meffert, D. (2000). The greater omentum. Anatomy, embryology, and surgical applications. *Surg Clin North Am*, 80(1), 275–293. [https://doi.org/10.1016/s0039-6109\(05\)70406-0](https://doi.org/10.1016/s0039-6109(05)70406-0)
- Liu, J. F., Gordon, M., Veneris, J., Braiteh, F., Balmanoukian, A., Eder, J. P., Oaknin, A., Hamilton, E., Wang, Y., Sarkar, I., Molinero, L., Fassò, M., O'Hear, C., Lin, Y. G., & Emens, L. A. (2019). Safety, clinical activity and biomarker assessments of atezolizumab from a Phase I study in advanced/recurrent ovarian and uterine cancers. *Gynecologic Oncology*, 154(2), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.05.021>
- Ma, D., & Gu, M. (1991). Immune effect of tumor-infiltrating lymphocytes and its relation to the survival rate of patients with ovarian malignancies. *Journal of Tongji Medical University*, 11(4), 235–239. <https://doi.org/10.1007/BF02888158>
- Markman, M. (2019). The Evolving Arena of Ovarian Cancer Maintenance Therapy. *Oncology (Switzerland)*, 97(4), 202–205. <https://doi.org/10.1159/000501618>
- Martin de la Fuente, L., Westbom-fremer, S., Arildsen, N. S., Hartman, L., Malander, S., Kannisto, P., Måsbäck, A., & Hedenfalk, I. (2020). PD-1 / PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes are prognostically favorable in advanced high-grade serous ovarian carcinoma. *Virchows Arch*, 477(1), 83–91. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02751-6>
- Matulonis, U. A., Santin, A. D., Lisyanskaya, A. S., Pignata, S., Vergote, I., Raspagliesi, F., Sonke, G. S., Birrer, M., Provencher, D. M., Sehouli, J., & Colombo, N. (2019). Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer: results from the phase II KEYNOTE-100 study Original article. *Annals of Oncology*, 30(May), 1080–1087. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz135>
- Meindl, A., Rhiem, K., Engel, C., Ditsch, N., Kast, K., Hahnen, E., & Schmutzler, R. K. (2013a). Klinik und Genetik des familiären Brust- und Eierstockkrebses. *medizinische genetik* 2013 25:2, 25(2), 259–277. <https://doi.org/10.1007/S11825-013-0390-Z>

- Meindl, A., Rhiem, K., Engel, C., Ditsch, N., Kast, K., Hahnen, E., & Schmutzler, R. K. (2013b). Klinik und Genetik des familiären Brust- und Eierstockkrebses. In *Medizinische Genetik 2* (S. 259–277). <https://doi.org/10.1007/s11825-013-0390-z>
- Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Hallett, R., Ryan, A., Burnell, M., Sharma, A., Lewis, S., Davies, S., Philpott, S., Lopes, A., Godfrey, K., Oram, D., Herod, J., Williamson, K., Seif, M. W., Scott, I., Mould, T., Woolas, R., Murdoch, J., ... Jacobs, I. (2009). Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *The Lancet Oncology*, 10(4), 327–340. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70026-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70026-9)
- Meza-perez, S., & Randall, T. D. (2017). Immunological functions of the omentum. *Trends Immunol*, 38(7), 526–536. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.03.002> Immunological
- Mikula-Pietrasik, J., Uruski, P., Tykarski, A., & Książek, K. (2018). The peritoneal „soil“ for a cancerous „seed“: a comprehensive review of the pathogenesis of intraperitoneal cancer metastases. *Cell Mol Life Sci*, 75(3), 509–525. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2663-1>
- Milne, K., Alexander, C., Webb, J. R., Sun, W., Dillon, K., Kalloger, S. E., Gilks, C. B., Clarke, B., Köbel, M., & Nelson, B. H. (2012). Absolute lymphocyte count is associated with survival in ovarian cancer independent of tumorinfiltrating lymphocytes. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-33>
- Milne, K., Köbel, M., Kalloger, S., Barnes, R., Gao, D., Gilks, C., Watson, P., & Nelson, B. (2009). Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS One*, 4(7), e6412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006412>
- Montfort, A., Owen, S., Piskorz, A. M., Supernat, A., Moore, L., Al-khalidi, S., Böhm, S., Pharoah, P., McDermott, J., Balkwill, F. R., & Brenton, J. D. (2020). Combining measures of immune infiltration shows additive effect on survival prediction in high-grade serous ovarian carcinoma. *British Journal of Cancer*, March. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0822-x>
- Motohara, T., Masuda, K., Morotti, M., Zheng, Y., El-Sahhar, S., Kay, Y. C., Wietek, N., Alsaadi, A., Karaminejadranjbar, M., Hu, Z., Artibani, M., Santana Gonzalez, L., Katabuchi, H., Saya, H., & Ahmed, A. A. (2019). An evolving story of the metastatic voyage of ovarian cancer cells: cellular and molecular orchestration of the adipose-rich metastatic microenvironment. *Oncogene*, 38(16), 2885–2898. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0637-x>
- Napoletano, C., Bellati, F., Landi, R., Pauselli, S., Marchetti, C., Visconti, V., Sale, P., Liberati, M., Rughetti, A., Frati, L., Panici, P. B., & Nuti, M. (2010). Ovarian cancer cytoreduction induces changes in T cell population subsets reducing immunosuppression. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(12), 2748–2759. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2009.00911.X>
- Natarajan, P., Taylor, S. E., & Kirwan, J. M. (2018). Ovarian cancer: current management and future directions. In *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine* (Bd. 28,

- Nummer 6, S. 171–176). Churchill Livingstone.
<https://doi.org/10.1016/j.ogrm.2018.04.004>
- Nishio, S., & Ushijima, K. (2020). Clinical significance of primary debulking surgery and neoadjuvant chemotherapy-interval debulking surgery in advanced ovarian cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 50(4), 379–386.
<https://doi.org/10.1093/jjco/hyaa015>
- Ono, T., Azuma, K., Kawahara, A., Kakuma, T., Sato, F., & Akiba, J. (2020). Predictive value of CD8 / FOXP3 ratio combined with PD-L1 expression for radiosensitivity in patients with squamous cell carcinoma of the larynx receiving definitive radiation therapy. *Head Neck*, 42(12), 3518–3530. <https://doi.org/10.1002/hed.26416>
- Oosterling, S. J., van der Bij, G. J., Bögels, M., van der Sijp, J. R., Beelen, R. H. J., Meijer, S., & van Egmond, M. (2006). Insufficient ability of omental milky spots to prevent peritoneal tumor outgrowth supports omentectomy in minimal residual disease. *Cancer Immunol Immunother*, 55(9), 1043–1051. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0101-y>
- Parvathareddy, S. K., Siraj, A. K., Badawi, I. A. Al, Tulbah, A., Dayel, F. Al, & Kuraya, K. S. Al. (2021). Differential expression of PD - L1 between primary and metastatic epithelial ovarian cancer and its clinico - pathological correlation. *Scientific Reports*, 11(1), 3750. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83276-z>
- Peng, J., Hamanishi, J., Matsumura, N., Abiko, K., Murat, K., Baba, T., Yamaguchi, K., Horikawa, N., Hosoe, Y., Murphy, S. K., Konishi, I., & Mandai, M. (2015). Chemotherapy Induces Programmed Cell Death-Ligand 1 Overexpression via the Nuclear Factor- κ B to Foster an Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 75(23), 5034–5045. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3098>
- Peres, L. C., Cushing-haugen, K. L., Ko, M., Harris, H. R., Berchuck, A., Rossing, M. A., Schildkraut, J. M., & Doherty, J. A. (2019). Invasive Epithelial Ovarian Cancer Survival by Histotype and Disease Stage. *J Natl Cancer Inst*, 111(1), 60–68.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djy071>
- Preston, C. C., Maurer, M. J., Oberg, A. L., Visscher, D. W., Kalli, K. R., Lynn, C., Goode, E. L., & Knutson, K. L. (2013). FOXP3 - T Cells Correlate with Poor Clinical Outcome in Human Serous Ovarian Cancer. *PLoS One*, 8(11), e80063.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080063>
- Rangel-Moreno, J., Moyron-Quiroz, J. E., Carragher, D. M., Kusser, K., Hartson, L., Moquin, A., Randall, T. D., & Allergy, D. (2010). Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. *Immunity*, 30(5), 731–743. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.014>
- Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J. P., & Gögenur, I. (2021). Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer*, 124(2), 359–367.
<https://doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4>
- Raspollini, M. R., Castiglione, F., Degl'Innocenti, D. R., Amunni, G., Villanucci, A., Garbini, F., Baroni, G., & Taddei, G. L. (2005). Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes

- are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Annals of Oncology*, 16(4), 590–596. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi112>
- Riviere, P., Goodman, A. M., Okamura, R., Barkauskas, D. A., Whitchurch, T. J., Lee, S., Khalid, N., Collier, R., Mareboina, M., Frampton, G. M., Fabrizio, D., Sharabi, A. B., Kato, S., Jolla, L., Transplantation, M., Jolla, L., Division, B., & Angeles, L. (2020). High Tumor Mutational Burden Correlates with Longer Survival in Immunotherapy-Naïve Patients with Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther*, 19(10), 2139–2145. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0161.High>
- Salvador, S., Gilks, B., Ko, P. M., Huntsman, D., Rosen, B., & Miller, D. (2009). The Fallopian Tube : Primary Site of Most Pelvic High-grade Serous Carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*, 19(1), 58–64. <https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e318199009c>
- Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A. A., Frosina, D., Gnjjatic, S., Ambrosone, C., Kepner, J., Odunsi, T., Ritter, G., Lele, S., Chen, Y., Ohtani, H., Old, L. J., & Odunsi, K. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *PNAS*, 102(51), 18538–18543. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509182102>
- Seiz, L., Dorn, J., Kotzsch, M., Walch, A., Grebenchtchikov, N. I., Gkazepis, A., Schmalfeldt, B., Kiechle, M., Bayani, J., Diamandis, E. P., Langer, R., Sweep, F. C. G. J., Schmitt, M., & Magdolen, V. (2012). Stromal cell-associated expression of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) indicates poor prognosis of ovarian cancer patients. *Biological Chemistry*, 393(5), 391–401. <https://doi.org/10.1515/hsz-2011-0264>
- Shah, C. A., Allison, K. H., Garcia, R. L., Gray, H. J., Goff, B. A., & Swisher, E. M. (2008). Intratumoral T cells, tumor-associated macrophages, and regulatory T cells: Association with p53 mutations, circulating tumor DNA and survival in women with ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 109(2), 215–219. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.01.010>
- Sheppard, K., Fitz, L. J., Lee, J. M., Benander, C., George, J. A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J. M., Carter, L. L., Wood, C. R., & Chaudhary, D. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett*, 574(1–3), 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.083>
- Shetty, M. (2019). Imaging and Differential Diagnosis of Ovarian Cancer. In *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* (Bd. 40, Nummer 4, S. 302–318). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2019.04.002>
- Soong, T. R., Howitt, B. E., Horowitz, N., Nucci, M. R., & Crum, C. P. (2019). The fallopian tube, “precursor escape” and narrowing the knowledge gap to the origins of high-grade serous carcinoma. In *Gynecologic Oncology* (Bd. 152, Nummer 2, S. 426–433). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.11.033>
- Sopik, V., Iqbal, J., Rosen, B., & Narod, S. A. (2015). Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part I. Incidence. In *Gynecologic Oncology* (Bd. 138, Nummer 3, S. 741–749). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.06.017>

- Stewart, C., Ralyea, C., & Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. In *Seminars in Oncology Nursing* (Bd. 35, Nummer 2, S. 151–156). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001>
- Stumpf, M., Hasenburger, A., Riener, M. O., Jütting, U., Wang, C., Shen, Y., Orłowska-Volk, M., Fisch, P., Wang, Z., Gitsch, G., Werner, M., & Lassmann, S. (2009). Intraepithelial CD8-positive T lymphocytes predict survival for patients with serous stage III ovarian carcinomas: Relevance of clonal selection of T lymphocytes. *British Journal of Cancer*, 101(9), 1513–1521. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605274>
- Tarin, D., Price, J. E., Kettlewell, M. G. W., Souter, R. G., Vass, A. C. R., & Crossley, B. (1984). Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Research*, 44(8), 3584–3592.
- Teng, M. W. L., Ngiew, S. F., Ribas, A., & Smyth, M. J. (2015). Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Research*, 75(11), 2139–2145.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0255>
- Tomšová, M., Melichar, B., Sedláková, I., & Šteiner, I. (2008). Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 108(2), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.10.016>
- Tsiatas, M. L., Gyftaki, R., Liacos, C., Politi, E., Rodolakis, A., Dimopoulos, M. A., & Bamias, A. (2009). Study of T lymphocytes infiltrating peritoneal metastases in advanced ovarian cancer associations with vascular endothelial growth factor levels and prognosis in patients receiving platinum-based chemotherapy. *International Journal of Gynecological Cancer*, 19(8), 1329–1334.
<https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e3181b7a40e>
- Varga, A., Piha-Paul, S., Ott, P. A., Mehnert, J. M., Berton-Rigaud, D., Morosky, A., Yang, P., Ruman, J., & Matei, D. (2019). Pembrolizumab in patients with programmed death ligand 1–positive advanced ovarian cancer: Analysis of KEYNOTE-028. *Gynecologic Oncology*, 152(2), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.11.017>
- Vikas, P., Borchering, N., Chennamadhavuni, A., & Garje, R. (2020). Therapeutic Potential of Combining PARP Inhibitor and Immunotherapy in Solid Tumors. *Frontiers in Oncology*, 10, 570. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.00570>
- Wang, A. W., Prieto, J. M., Cauvi, D. M., Bickler, S. W., De, A., Medical, N., Diego, S., Surgery, A., Jolla, L., Jolla, L., Diego, S., & Jolla, L. (2020). The Greater Omentum-A Vibrant and Enigmatic Immunologic Organ Involved in Injury and Infection Resolution. *Shock*, 53(4), 384–390. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001428>
- Wang, C., Armasu, S., Kalli, K., Maurer, M., Heinzen, E., Keeney, G., Cliby, W., Oberg, A., Kaufmann, S., & Goode, E. (2017). Pooled Clustering of High-Grade Serous Ovarian Cancer Gene Expression Leads to Novel Consensus Subtypes Associated with Survival and Surgical Outcomes. *Clin Cancer Res*, 23(15), 4077–4085.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0246>
- Wang, J.-J., Siu, M. K.-Y., Jiang, Y.-X., Chan, D. W., Cheung, A. N.-Y., Ngan, H. Y.-S., & Chan, K. K.-L. (2020). Infiltration of T cells promotes the metastasis of ovarian cancer

- cells via the modulation of metastasis - related genes and PD - L1 expression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 69(11), 2275–2289. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02621-9>
- Wang, Q., Lou, W., Di, W., & Wu, X. (2017). Prognostic value of tumor PD-L1 expression combined with CD8+ tumor infiltrating lymphocytes in high grade serous ovarian cancer. *International immunopharmacology*, 52, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.08.017>
- Webb, J. R., Milne, K., Kroeger, D. R., & Nelson, B. H. (2016). PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 141(2), 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.03.008>
- Webb, P. M., & Jordan, S. J. (2017). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* (Bd. 41, S. 3–14). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006>
- Wolf, D., Wolf, A. M., Rumpold, H., Fiegl, H., Zeimet, A. G., Muller-Holzner, E., Deibl, M., Gastl, G., Gunsilius, E., & Marth, C. (2005). The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(23), 8326–8331. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1244>
- Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S. C., Kaiser, L. R., & June, C. H. (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Research*, 61(12), 4766–4772.
- Wooster, R., & Weber, B. L. (2003). Breast and ovarian cancer. In A. E. Guttmacher & F. S. Collins (Hrsg.), *New England Journal of Medicine* (Bd. 348, Nummer 23, S. 2339–2347). <https://doi.org/10.1056/NEJMra012284>
- Xue, C., Xu, Y., Ye, W., Xie, Q., Gao, H., Xu, B., Zhang, D., & Jiang, J. (2020). Expression of PD-L1 in ovarian cancer and its synergistic antitumor effect with PARP inhibitor. *Gynecologic oncology*, 157(1), 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.12.012>
- Yildirim, N., Akman, L., Acar, K., Demir, S., Ozkan, S., Alan, N., Zekioglu, O., Terek, M. C., Ozdemir, N., & Ozsaran, A. (2017). Do tumor-infiltrating lymphocytes really indicate favorable prognosis in epithelial ovarian cancer? *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 215, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.06.005>
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., Rubin, S. C., & Coukos, G. (2003). Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(3), 203–213. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020177>
- Zhang, L., Dermawan, K., Jin, M., Liu, R., Zheng, H., Xu, L., Zhang, Y., Cai, Y., Chu, Y., & Xiong, S. (2008). Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T

cells by paclitaxel-based chemotherapy. *Clinical Immunology*, 129(2), 219–229.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.07.013>

13 Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. med. Marion Kiechle, Direktorin der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, bedanken, die mir ermöglicht hat, diese Arbeit unter Ihrer Leitung durchzuführen.

Herrn PD Dr. med. Holger Bronger danke ich für das interessante Projektthema, die sehr gute Betreuung und die vielen hilfreichen und bereichernden Gespräche. Auch für die mühevollen Arbeit der Durchsicht möchte ich mich bedanken.

Prof. Dr. Aurelia Noske danke ich für die Mitbetreuung des Projekts und die Hilfsbereitschaft bezüglich jeglicher Nachfragen zu pathologischen Themen.

Ein besonderer Dank gilt dem Team der vergleichenden experimentellen Pathologie (CEP): PD Dr. med. vet. Katja Steiger für die Ermöglichung der Automatenfärbungen sowie Olga Seelbach und Marion Mielke für die Durchführungen im Labor.

Der gesamten Arbeitsgruppe Bronger und dem Laborteam der klinischen Forschung der Frauenklinik danke ich für die angenehme, kollegiale Atmosphäre. Ein besonderer Dank gilt Daniela Hellmann und Rosalinde Bräuer für die unmittelbare Unterstützung im Labor und die Erstellung der Tissue Micro Arrays. Besonders danke ich auch Dr. Tobias Dreyer für die Hilfsbereitschaft bei alltäglichen Fragen und die Einarbeitung.

Prof. Dr. rer. nat. habil. Viktor Magdolen danke ich für die Einladung zur wissenschaftlichen Weiterbildung im Doktorandenseminar und die dadurch gebotene Plattform zur konstruktiven Diskussion neuer Erkenntnisse.

Bei meinen Eltern, Geschwistern, Freundinnen und Freunden möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines gesamten Studiums.