

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor Prof. Dr. Nicolai Maass)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Korrelation der tumorassoziierten Lymphozyten und Makrophagen mit der Überlebensrate
von Ovarialkarzinom-Patienten**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt
von
Friederike Mengelkamp
aus Marburg a. d. Lahn

Kiel 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Arnold, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jost Philipp Schäfer, Klinik für Radiologie und Neuroradiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 12.05.2021

gez.: Prof. Dr. Christel Eckmann-Scholz

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie, Inzidenz	1
1.2 Ätiologie, Risikofaktoren	1
1.3 Einteilung der Tumore des Ovars	2
1.3.1 TNM- und FIGO-Klassifikation	3
1.4 Klinik	5
1.4.1 Symptome, Früherkennung und Diagnostik	5
1.4.2 Prognosefaktoren	6
1.4.3 Therapie	7
1.5 Tumorimmunologie	8
1.5.1 Der Einfluss von TILs und TAMs	8
1.5.2 PD-L1	10
1.6 Fragestellung	11
2. Methoden	12
2.1 Patientenkollektiv und erhobene Daten	12
2.2 Gewebe	12
2.3 Immunhistochemie	13
2.4 Färbung der Präparate	13
2.5 Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbung	15
3. Ergebnisse	17
3.1 Patientencharakteristika	17
3.2 Auswertung immunhistochemische Färbung	19
3.2.1 Korrelation Antikörper	21
3.2.2 Assoziation Antikörper und FIGO	22
3.2.3 Assoziation Antikörper und Grading	22
3.2.4 Assoziation Antikörper und Platinsensitivität	23
3.2.5 Überlebenszeitanalyse	23
3.2.6 Assoziation Antikörper, klinische Parameter und tumorbedingter Tod	24

4. Diskussion	25
5. Zusammenfassung	29
6. Literaturverzeichnis	31
7. Danksagungen	35
8. Akademischer Lebenslauf	36
9. Publikation	37

Abbildungsverzeichnis

Abb.1. Immunhistochemische Färbung	20
Abb.2. Verteilung der Zelltypen	20
Abb.3. Heatmap der paarweisen Spearman Korrelationskoeffizienten der Zelltypzählungen	21

Tabellenverzeichnis

Tab.1. Einteilung der Tumorstadien gemäß des FIGO-und TNM-System	4
Tab.2. Verwendete Primärantikörper	14
Tab.3. Score für PD-L1 Auswertung	15
Tab.4. Übersicht der klinisch-pathologischen Parameter	18
Tab.5. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung	19
Tab.6. Assoziation zwischen Antikörpern und FIGO Stadium (Wilcoxon Test)	22
Tab.7. Assoziation zwischen Antikörpern und Grading (Wilcoxon Test)	22
Tab.8. Assoziation zwischen Antikörpern und Platinsensitivität (Wilcoxon Test)	23
Tab.9. Ergebnisse univariantes Cox-Regressionsmodell Korrelation Antikörper/Rezidiv	23
Tab.10. Ergebnisse univariantes Cox-Regressionsmodell Korrelation Antikörper, klinische Parameter & tumorbedingter Tod	24

Abkürzungsverzeichnis

BRCA	Breast cancer
CA 125	Cancer-Antigen 125
CPS	Combined positive score
FIGO	Fédération internationale de gynécologie et obstétrique
HBOC	Hereditary breast ovarian cancer syndrome
HGSC	High-grade serous carcinoma
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome
HPF	High-power-field
HRR	Homologous Recombination Repair
i.v.	Intravenös
IC	Immuncells
OS	Overall survival
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PD-L1	Programmed cell death-ligand 1
PFS	Progression free survival
RTU	Ready to use
STIC	Serous tubal intraepithelial carcinoma
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TC	Tumorcells
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
Treg	Regulatorische T-Zellen
UICC	Union International Contre le cancer
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Inzidenz

Das Ovarialkarzinom gehört auf Grund seiner hohen Mortalitätsrate zu einer der gefährlichsten Erkrankungen bei Frauen.

Nach Schätzungen des Robert Koch Instituts traten im Jahr 2014 allein in Deutschland 7250 Neuerkrankungen mit insgesamt 5354 Todesfällen auf. Das Ovarialkarzinom ist mit 5,6% aller Sterbefälle durch Krebs nach dem Brustkrebs die häufigste tödliche gynäkologische Krebserkrankung. Das relative 5-Jahres-Überleben liegt schätzungsweise bei 41% (1).

1 von 72 Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom und 75% der Fälle werden erst in einem fortgeschrittenem Stadium entdeckt (1,2).

1.2 Ätiologie, Risikofaktoren

Insbesondere die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist noch immer ungeklärt.

Laut Fathalla scheint ein Zusammenhang zwischen der wiederkehrenden Ovulation und der Entstehung des Ovarialkarzinoms zu bestehen. Die sogenannte „incessant ovulation“ Theorie besagt, dass das Oberflächenepithel durch die wiederholte Ovulation verletzt und auf Grund von fehlerhaften Reparaturmechanismen die Entstehung eines Ovarialkarzinoms gefördert wird. (3,4)

Aktuelle Studien unterstützen außerdem die Entstehungstheorie der STIC-Läsionen, die als Vorläuferläsionen für Typ-2-Ovarialkarzinome mit Entstehungsort in der Tube fungieren können. (5,6)

Auch eine genetische Prädisposition ist möglich und gehört zu den etablierten Risikofaktoren. In Verbindung mit einem frühen Erkrankungsalter müssen besonders zwei bestimmten Tumorsyndromen besondere Beachtung geschenkt werden: das familiäre Brust- und Eierstockkrebssyndrom („hereditary breast ovarian cancer syndrome“, HBOC) und das familiäre nichtpolypöse Kolonkarzinomsyndrom (HNPCC, „hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome“, auch als Lynch-Syndrom bekannt).

Genetische Veränderungen beim familiären Brust- und Eierstockkrebssyndrom kommen vor allem in den Genen BRCA1 und BRCA2 vor, darüber hinaus gibt es aber noch weitere Risikogene, die aber deutlich seltener betroffen sind. Trägerinnen einer BRCA1-Mutation

haben bis zu ihrem 69. Lebensjahr ein kumulatives Risiko von 39% an Eierstockkrebs zu erkranken, bei BRCA2-Mutationsträgerinnen ist das Risiko mit 11-22% deutlich niedriger. (2) Des Weiteren können Umwelteinflüsse, Ernährungsfaktoren, Fettleibigkeit und das fortschreitende Lebensalter das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, beeinflussen (7,8).

1.3 Einteilung der Tumore des Ovars

Das Ovarialkarzinom kann anhand seiner histologischen, genetischen und biologischen Merkmale genauer eingeteilt und klassifiziert werden. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Erfolgsaussichten in Bezug auf Therapie und Prognosefaktoren wichtig. (2,9)

Die Tumore des Ovars werden entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation (2014) eingeteilt. Kurman und Shih schlagen eine duale Einteilung der Ovarialkarzinome vor (10).

Auf das Organ begrenzte und sich aus Vorstufen entwickelnde Tumore (low-grade seröse Karzinome, endometriode Karzinome, seromuzinöse Karzinome, muzinöse Karzinome, klarzellige Karzinome, maligne Brennertumore) werden den Typ I-Tumoren zugeordnet (ca.25% aller Ovarialkarzinome).

Typ II- Tumore (ca. 75% aller Ovarialkarzinome) sind hingegen hoch-maligne Tumore. Sie wachsen schnell, aggressiv und werden meist erst spät erkannt (high-grade seröse Karzinome, alle gemischten Karzinome mit Ausnahme des seromuzinösen Typs und alle Karzinosarkome) (2). Da keine Fälle von Borderlinetumoren in dieser Arbeit untersucht wurden, wird auf diese auch nicht weiter im Detail eingegangen.

1.3.1 TNM-und FIGO-Klassifikation

Nach intraoperativer Ausdehnung des Tumors und Bestätigung des histopathologischen Befundes durch einen Pathologen, lässt sich das Ovarialkarzinom in verschiedene Stadien einteilen.

Die Einteilung in Stadien von Ovarialkarzinomen wird durch die FIGO-Klassifikation (Fédération internationale de gynécologie et obstétrique) vorgenommen und überschneidet sich mit der TNM-Klassifikation der UICC (Union International Contre le cancer).

FIGO-Stadien werden aufgrund des therapeutischen Vorgehens in zwei übergeordneten Gruppen zusammengefasst:

- Frühe Ovarialkarzinome (FIGO IA-IIA)
- Fortgeschrittene Ovarialkarzinome (FIGO IIB-IV)

Eine Unterteilung ist insofern sinnvoll, da die aktuellen S3-Leitlinie für diese beiden Gruppen unterschiedliche Handlungsempfehlungen vorsieht (2).

Tabelle 1 zeigt die Stadieneinteilung gemäß dem FIGO-und TNM-System als Übersicht.

Tabelle 1. Einteilung der Tumorstadien gemäß des FIGO-und TNM-System (2).

TNM	FIGO	Definition
TX		Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
T0		Kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor auf die Ovarien beschränkt
T1a	IA	auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1b	IB	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1c	IC	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte:
T1c1	IC1	iatrogene Kapsel- (Serosa-)ruptur
T1c2	IC2	präoperative Kapsel- (Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
T1c3	IC3	maligne Zellen im Ascites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
T2b	IIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3 und/ oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3		Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Metastasen ≤ 10mm
N1b	IIIAii	Metastasen > 10mm
T3a jedes N	IIIA2	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b jedes N	IIIB	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c jedes N	IIIC	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
M1a	IVA	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

1.4 Klinik

1.4.1 Symptome, Früherkennung und Diagnostik

Die Früherkennung eines Ovarialkarzinoms gestaltet sich schwierig.

Die aktuell zur Verfügung stehenden Methoden zur Früherkennung wie die transvaginale Sonographie oder die Bestimmung des Tumormarkers CA 125 sind nicht für ein generelles Screening geeignet.

Als routinemäßige Vorsorge erscheinen beide Methoden ungeeignet, da sie zu falsch-positiven Ergebnissen und folglich zu unnötigen operativen Eingriffen führen können.

Es konnte in mehreren randomisierten Multicenterstudien kein Effekt auf die Überlebensrate nachgewiesen werden. (2)

Auch die PLCO (Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening) – Studie (11) von Buys et al. legt nahe, dass durch die oben genannten Untersuchungsmethoden keine Reduktion der krankheitsspezifischen Mortalität erreicht wird.

Aufgrund der langen symptomfreien Zeit wird das fortgeschrittene Ovarialkarzinom zu ca. 75% erst spät diagnostiziert. Die Symptome sind oft unspezifisch und lassen keine direkte Schlussfolgerung zu. Dennoch sollten bei folgenden Symptomen bei Frauen ab dem 50. Lebensjahr weiterführende Untersuchungen vorgenommen werden: (2,11–13)

- Völlegefühl
- Blähungen
- Unklare abdominale Schmerzen oder Beschwerden
- Zunahme der Miktionsfrequenz

Für die Untersuchung des Ovarialtumors in seiner Morphologie, Organzugehörigkeit, Größe gilt derzeit immer noch die transvaginale Sonographie als das wichtigste diagnostische Mittel, da es ubiquitär verfügbar ist. Zur zusätzlichen diagnostischen Abklärung können die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie und die Positronenemissionstomographie eingesetzt werden.

Es darf aber nicht vergessen werden, dass das operative Staging nicht durch bildgebende Verfahren ersetzt werden kann. (2)

1.4.2 Prognosefaktoren

Aufgrund der geringen 5-Jahres-Überlebensrate ist es wichtig, prognostische Faktoren zu erforschen und zu definieren.

Aktuell gelten das Tumorstadium, der postoperative Tumorrest, das Alter, der Allgemeinzustand, der histologische Typ, das Tumorgrading und eine leitliniengerechte Therapie als anerkannte Prognosefaktoren (2).

Als entscheidend wichtigster Prognosefaktor muss die möglichst vollständige Entfernung des Tumors hervorgehoben werden, da dieser als einziger Prognosefaktor beeinflussbar ist. Die optimale Tumorsektion hat einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. Die vollständige chirurgische Entfernung des Tumors wird angestrebt, ist aber nicht immer möglich. Eine erfolgreiche Resektion des Tumors hängt vor allem von den chirurgischen Erfahrungen des Operateurs, der Infrastruktur und Kapazität des Operationszentrums ab (12,13,14).

Eine vollständige Resektion ist erreicht, wenn makroskopisch kein sichtbarer Tumor mehr nachzuweisen ist. Verbleibender Resttumor wird nach seinem größten Durchmesser definiert. Residualtumore einer Größe von einem Zentimeter oder kleiner werden als optimale Tumorsektion definiert. Tumorreste, deren größter Durchmesser mehr als einen Zentimeter beträgt, werden als suboptimale Tumorsektion klassifiziert. Der prognostische Wert einer vollständigen Entfernung wurde mehrmals veröffentlicht und in einer Metaanalyse bestätigt (12,15).

Zusätzliche zeigt die prospektive randomisierte Studie von Bristow et al. den signifikanten positiven Einfluss eines optimalen Debulking bezogen auf den weiteren Krankheitsverlauf (15).

1.4.3 Therapie

Für die Therapieentscheidung unterteilt die aktuelle S3-Leitlinie das Ovarialkarzinom in zwei Stadien.

Das frühe, nur auf das Becken beschränkte, und das fortgeschrittene Ovarialkarzinom. Zunächst ist bei dem frühen Ovarialkarzinom ein umfassendes operatives Staging wichtig, dieses findet über eine Längsschnittlaparotomie statt, um die gesamte Abdominalhöhle inspizieren zu können. Zusätzlich erfolgt die Entnahme einer Peritoneozytologie (2). Studien haben gezeigt, dass Patientinnen, die einem komplettem operativen Staging unterzogen wurden, deutlich bessere Werte beim progressionsfreien (PFS) und Gesamtüberleben (OS) haben, 5-Jahres-PFS: 79% und 5-Jahres-OS: 89%. Im Vergleich dazu werden bei einem inkompletten Staging Werte von 5-Jahres-PFS: 61% und 5-Jahres-OS: 71% erzielt (16).

Wie bereits oben erwähnt, ist die vollständige makroskopische Resektion des Tumors positiv mit dem Überleben assoziiert. Somit ist ganz klar das Ziel der Primäroperation bei einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom die komplette Entfernung des Tumors.

Du Bois et al. haben in ihrer Studie gezeigt, dass ein optimales Debulking häufiger durch einen Gynäkologen erreicht wird, als durch andere, nicht spezialisierte Operateure (17).

Die aktuelle S3-Leitlinie sieht vor, dass bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom im Stadium IA Grad1 nach komplettem operativem Staging keine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden soll. Patientinnen im Stadium IC oder IA/B und Grad 3 sollen eine platinhaltige Chemotherapie über 6 Zyklen erhalten. Patientinnen im Stadium IA G2, IB G1/2 kann eine platinhaltige Chemotherapie angeboten werden. Beim fortgeschrittenem Ovarialkarzinom besteht die derzeitige Standard-Chemotherapie im Anschluss an die Operation aus 6 Zyklen Carboplatin (AUC5) / Paclitaxel (175mg/m² über 3 Stunden i.v.). Da nicht alle Tumorsubtypen mit dem gleichen Erfolg auf die Standardtherapie ansprechen, ist es zwingend notwendig die subtyp-spezifische Therapien weiter zu entwickeln. (2)

In den letzten 10 Jahren wuchs die Evidenz für die Verwendung des BRCA-Mutationsstatus als Biomarker für das Ansprechen auf die Therapie, den prognostischen Ausgang und die Eignung für zielgerichtete Wirkstoffe wie die PARP-Inhibitoren. BRCA-Mutationstests gehören jetzt zu einem routinemäßigen Bestandteil der optimalen Behandlung von an Ovarialkarzinom erkrankten Patienten. Zunehmend werden auch die Lynch- und andere (HRR)-Gene einbezogen, insbesondere da immer mehr Medikamente für den Einsatz bei diesen Patienten zugelassen werden. (18)

1.5 Tumorimmunologie

Das Konzept, dass das Immunsystem Tumore erkennen und eliminieren kann, existiert seit fast 100 Jahren. Die Hypothese wurde erstmals 1909 (19) vorgeschlagen, es fiel in der Vergangenheit aber schwer, die Gültigkeit zu ermitteln.

Es wird mittlerweile angenommen, dass das Immunsystem nicht nur vor einer Tumorentwicklung schützen kann, sondern auch die Fähigkeit hat, das Tumorwachstum zu fördern bzw. zu modellieren. Dem Immunsystem wird somit eine doppelte Wirkung auf die Entwicklung von Tumoren zugesprochen (20).

1.5.1 Der Einfluss von TILs und TAMs

Es wird immer deutlicher, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) mit einem positiven Verlauf der Tumorerkrankung assoziiert sind.

Zhang et al. berichten in ihrer Studie über einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von CD3+ TILs und einem positiven klinischen Ergebnis bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (21).

Sato et al. zeigen in einer Studie, dass das vermehrte Vorkommen von intraepithelialen CD8+ TILs und ein hohes Verhältnis von CD8+ zu regulatorischen T-Zellen (Treg) mit einer günstigen Prognose bei Eierstockkrebs verbunden sind (22,23).

Die günstige Prognose der intraepithelialen CD8+ Zellen wurde durch weitere Studien bestätigt (24,25) .

Tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) tendieren im Gegensatz den TILs zu einer schlechteren Prognose (23,24), was darauf deuten lässt, dass sie eine immunsuppressive Rolle spielen könnten. So ist denkbar, dass TILs und TAMs interagieren und die immunologischen Voraussetzungen im Ovarialkarzinom gestalten.

Mhaweck-Fauceglia et al. (23) untersuchten in Ihrer Studie die Rolle von TILs und TAMs bei familiär bedingten Ovarialkarzinomen. Ziel der Studie war es, das Vorkommen von TILs (CD3+, CD8+, CD25+, FOXP3+) und TAMs (CD68+, CD163+), die Interaktion zwischen TILs und TAMs und deren Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung zu zeigen.

Es stellte sich heraus, dass das FIGO-Stadium negativ mit der CD8+ T-Zellhäufigkeit und positiv mit CD163+ Zellen assoziiert war. Andererseits korrelierten high-grade Tumore positiv mit CD3+, CD68+, CD163+ und Treg-Zellen.

Insgesamt konnten in der Studie 67 von 73 Patientenfälle vollständig ausgewertet werden.

Bei der Auswertung der einzelnen Parameter wie Alter, FIGO-Stadium, Überleben zeigten sich diverse Zusammenhänge. So wurde festgestellt, dass das fortgeschrittene Alter signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist.

Berücksichtigt man die TIL- und TAM-Zählungen war die Treg Auswertung der einzige Parameter, der signifikant mit dem Gesamtüberleben assoziiert werden konnte. Das Ergebnis der Treg Auswertung scheint mit einer günstigen Prognose verbunden zu sein (23).

Wie bereits weiter oben beschrieben, ist die Infiltration des Ovarialtumors durch T-Lymphozyten positiv mit dem Überleben der Patienten verbunden.

Dieser positiven Korrelation stehen mehrere immunsuppressive Mechanismen gegenüber.

Zu diesen gehören Treg-Zellen, diese können eine periphere Toleranz vermitteln und somit eine Immunantwort unterdrücken (26,27).

Treg-Zellen werden durch Chemokine angelockt, die von Tumorzellen und Makrophagen produziert werden, sie unterdrücken dann T-Effektorlymphozyten, indem sie transformierenden Wachstumsfaktor (TGF-) und Interleukin 10 (IL-10) freisetzen, oder durch direkten Zell-Zell-Kontakt (28,29). Treg-Zellen haben somit normalerweise immunsuppressive Eigenschaften, und verhindern unerwünschte Autoimmunreaktionen (30).

Das Ovarialkarzinom koordiniert all diese Mechanismen des Immunsystems, um eine stabile Mikroumgebung für den Tumor zu schaffen (30,22).

1.5.2 PD-L1

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit das Auftreten des Checkpoint-Inhibitors Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) untersucht, da frühere Berichte daraufhin deuten, dass eine PD-L1-Überexpression und das Auftreten von TILs als prognostische Faktoren für das Überleben bei an einem Ovarialkarzinom Erkrankten dienen könnten (32–34).

PD-1 ist ein Oberflächenrezeptor, der durch aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und viele weitere Immunzellen exprimiert wird, er scheint von zwei bekannten Liganden der in Tumormikroumgebung relevantere zu sein.

PD-L1 kann von Tumorzellen, TAMs, myeloisch abgeleiteten Suppressorzellen (MDSCs), dendritischen Zellen (DCs), T- und B-Zellen exprimiert werden (35,36). Die Bindung von PD-L1 an PD-1 hemmt die Signalisierung des T-Zell-Rezeptors durch den Einsatz von SHP-1 und -2-Phosphatasen, was zu einer reduzierten T-Zell Proliferation und Zytokin-Produktion sowie einer erhöhten Anfälligkeit für Apoptose führt (37). Die Unterbrechung der PD-L1/PD1-Interaktion mit Antikörpern gegen beide Moleküle kann die T-Zell-Funktion wiederherstellen, was wieder zu einer verbesserten Immunabwehr gegen Tumore führt (38).

Das Verständnis der PD-L1 Expression ist noch unvollständig, aber es wurden einige Faktoren identifiziert, die auf die Expression Einfluss zu haben scheinen.

Das kanonische T-Zell-basierte Zytokin-Interferon-Gamma (INF- γ) kann die PD-L1-Expression auf verschiedenen Zelltypen induzieren. Dadurch entsteht eine wichtige negative Rückkopplungsschleife, in der aktivierte T-Zellen durch die Freisetzung von INF- γ die Expression von PD-L1 auf Zielzellen induzieren, was wiederum die Aktivierung der T-Zellen dämpft. Adaptive Resistenz ist ein Phänomen, das gezeigt hat, dass TIL die PD-L1-Expression durch Tumorzellen induzieren, was zu einer verminderten Anti-Tumor-Immunität führt (39). Die PD-L1 Expression kann sich je nach Zelltyp unterscheiden und ist sehr komplex. Der Einfluss bzw. die Bedeutung von PD-L1 im Ovarialkarzinom wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Hamanishi et al. zeigten in ihrer Studie zur PD-L1- Expression im Ovarialkarzinom, dass PD-L1 ein tumorintrinsic Expressionsmuster hatte, das bedeutet, es wurde hauptsächlich von Tumorzellen exprimiert und umgekehrt mit TIL korreliert. Zusätzlich fanden sie heraus, dass PD-L1 mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (40).

In der Studie von Webb et al. hingen wird deutlich, dass die PD-L1 Expression bei TAMs häufiger war, als bei Tumorzellen und dass obwohl PD-L1 ein negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung ist, trotzdem mit einer prognostisch günstigen TIL-Antwort verbunden ist (35).

1.6 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen Zusammenhang zwischen tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL), tumorassoziierten Makrophagen (TAM), und der Überlebensrate bei an Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen zu evaluieren. Ein Nachweis wäre für weiterführende Therapiemaßnahmen von Bedeutung, da so dem Immunsystem eine wichtige regulatorische Rolle bei der Behandlung von Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden könnte. Zusätzlich wurden die in der Arbeit verwendeten Fälle auf das Vorhandensein des Checkpoint-Inhibitors PD-L1 (programmed death-ligand 1) getestet, um auch hier einen eventuellen Zusammenhang mit der Überlebensrate zu zeigen.

2 Methoden

2.1 Patientenkollektiv und erhobene Daten

Die in dieser Arbeit verwendeten Präparate und Daten stammen von Patientinnen, die im Zeitraum von 1996-2013 in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH Kiel behandelt wurden.

Das Kollektiv umfasst 69 Fälle mit histopathologisch gesichertem Ovarialkarzinom, Borderlinetumore wurden aus dieser Arbeit ausgeschlossen.

Folgende Daten wurden erhoben und ausgewertet:

- Geburtsdatum
- Alter bei Erstdiagnose
- Alter bei Rezidiv, Zeitpunkt des Rezidivs (Monate nach Operation)
- FIGO-Stadium (frühe Ovarialkarzinome: FIGO IA-IIA, fortgeschrittene Ovarialkarzinome: IIB-IV)
- Histopathologischer Differenzierungsgrad (Grading)
- Ansprechen auf Chemotherapie (Platinsensitivität: sensibel, intermediär, refraktär)
- Überleben (tumorbedingt verstorben, nicht tumorbedingt verstorben, lebt rezidivfrei, lebt mit Erkrankung, verstorben unbekannter Grund)

Das Gesamtüberleben wurde durch den Zeitpunkt der Operation bis zum Zeitpunkt des Todes der Patientin oder das Ende des Erfassungszeitraumes bestimmt. Zensusdatum war der 31.12.2016.

2.2 Gewebe

Das verwendete Gewebe stammt aus formalinfixierten in Paraffin eingebetteten Gewebeproben der entsprechenden OP-Resektate. Die Gewebeproben wurden durch einen Pathologen erneut begutachtet und klassifiziert. Für die Herstellung der 3µm dicken Schnitte wurden die Paraffinblöcke auf -20°C abgekühlt und am Mikrotom (Modell 2050 Supercut, Reichert-Jung, Nussloch) geschnitten, anschließend wurden die entstandenen Schnitte auf Superfrost-Objektträgern (Höhe 0,15 cm, Breite 7,5 cm) fixiert.

2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient der Darstellung von Proteinen.

Die Grundlage der immunhistochemischen Färbung ist eine Antikörper-Antigenreaktion eines spezifischen Antikörpers gegen ein Antigen, welches dargestellt werden soll. Die Antigene sind Proteine, die mit ihren speziellen Gewebeeigenschaften, den sogenannten Epitopen, eine Antikörperbindung auslösen.

Um den Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar zu machen, muss an den Antikörper ein zusätzliches Detektionssystem gekoppelt sein, so dass beispielsweise eine Farbreaktion an dem Ort, wo sich der Komplex bildet, ausgelöst wird.

Für diese Arbeit wurde eine indirekte Färbemethode gewählt, die sogenannte (Strept-) Avidin-Biotin-Komplex-Methode.

Der primäre spezifische monoklonale Antikörper bindet an das Epitop des nachzuweisenden Antigens. In einem zweiten Schritt wird ein biotinmarkierter (biotinylierter) Sekundärantikörper an den primären Antikörper gebunden, dann reagiert der enzymmarkierte (Strept-) Avidin-Komplex mit dem biotinylierten Sekundärantikörper.

Um den gebildeten Komplex sichtbar zu machen, muss eine Farbreaktion ablaufen. Hierfür wandelt das Enzym Meerrettichperoxidase das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) mit dem zugefügten Wasserstoffperoxid-Substrat in einen Farbkomplex um. Das Chromogen oxidiert und lagert sich als brauner Farbstoff an dem gesamten Komplex ab.

2.4 Färbung der Präparate

Als Übersichtsfärbung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) an den ausgewählten Schnitten nach einem etablierten Standardprotokoll durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte in ein Xylol gelegt, darauf folgte die Inkubation im Ethanolbad mit absteigender Konzentration (100%, 96%, 70%). Es folgte das Waschen unter fließendem Wasser. Danach wurden die Schnitte mit Hämalaun nach Mayer (Roth, Deutschland) und nach einem erneuten Waschen, mit 1 %-iger Eosinlösung G (Walter CML, Deutschland) gefärbt. Nach dem abschließenden Waschen, zur Entfernung der rückständigen Färbelösung, wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe inkubiert (70%, 96%, 100%, 100%). Anschließend wurden die Schnitte mit Xylol behandelt.

Die immunhistochemischen Färbungen von CD3+, CD8+, CD68+, CD163+, CD25+, FOXP3+ und PD-L1 wurden mit Hilfe des vollautomatischen Färbeautomaten Ventana BenchMark ULTRA IHC/ISH der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für die Detektion wurde für alle Antikörper das OptiView DAB ICH Detection Kit verwendet.

Tabelle 2. Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Polyklonal/monoklonal	Spezies	Hersteller	Verdünnung
CD3 (CONFIRM anti-CD3 (2GV6))	monoklonal	Rabbit	Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana)	RTU
CD8 (CONFIRM anti-CD8 (SP57))	monoklonal	Rabbit	Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana)	RTU
CD68 (CONFIRM anti-CD68 (KP-1))	monoklonal	Mouse	Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana)	RTU
CD163 (CONFIRM anti-CD163 (MRQ26))	monoklonal	Mouse	Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana)	RTU
CD25 (Purified anti-human CD25 (BC96))	monoklonal	Mouse	BioLegend Inc., San Diego, CA	1:25
FOXP3 (Purified anti-human FOXP3 (259D))	monoklonal	Mouse	BioLegend Inc., San Diego, CA	1:100
PD-L1 (VENTANA PD-L1 (SP142))	monoklonal	Rabbit	Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana)	RTU

2.5 Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Alle Auszählungen erfolgten in den Arealen der Primärtumore.

Für die Auswertung wurden pro Schnitt fünf Gesichtsfelder des 40x Objektivs, sog. HPFs (High-power-field) ausgewählt und die dort angefärbten Tumorzellen im Stroma bzw. Epithel gezählt. Die HPFs wurden markiert und auf die Präparate der unterschiedlichen Antikörper übertragen. Anschließend wurden der Mittelwert sowie der Median der fünf HPFs bestimmt. Die PD-L1 Auswertung erfolgte nach drei unterschiedlichen Scores: Tumorzellen in % (TC), Immunzellen in % (IC) und combined positive Score (CPS). Die Einteilung erfolgte nach folgendem Schema (Tabelle3):

Tabelle 3. Score für PD-L-1 Auswertung.

Score		Tumorzellen in %
TC	0	< 1%
	1	1-5%
	2	5-50%
	3	> 50%

Score		Immunzellen in %
IC	0	< 1%
	1	1-5%
	2	5-50%
	3	> 50%

Score	
CPS	Anzahl der positiven Zellen x100 dividiert durch die Anzahl der Tumorzellen

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Institut für Medizinische Informatik und Statistik (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel) und wurde von Frau Dr. Silke Szymczak durchgeführt. Für die statistischen Analysen wurden die Mediane verwendet, da dieses Maß nicht empfindlich gegenüber Ausreißern in einzelnen HPFs ist. Zusätzlich wurde der FIGO-Score dichotomisiert (frühe, späte Ovarialkarzinome) und bei der Platinsensitivität nur die beiden extremen Gruppen (sensibel, refraktär) verwendet. Die Korrelation zwischen den verschiedenen Antikörpern im Epithel und Stroma wurde anhand von paarweisen Spearman Rangkorrelationskoeffizienten bestimmt und als Heatmap visualisiert. Für die Assoziation zwischen den Antikörper-Färbungen und den klinischen Parametern FIGO-Stadium, Grading

und Platinsensitivität wurde jeweils ein Wilcoxon Test durchgeführt. Für den Zusammenhang zwischen der Antikörper-Färbung sowie klinischen Parametern wie Alter, FIGO und Grading und der Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs bzw. bis zum tumorbedingten Tod wurden univariate Cox-Regressionsmodelle geschätzt. Alle Analysen wurden mit der statistischen Software R (Version 3.4.2) durchgeführt und P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Insgesamt konnten 69 Patientenfälle ausgewertet werden.

Das Alter bei Erstdiagnose lag zwischen 29 und 83 Jahren, im Durchschnitt hatten die Patientinnen ein Alter von 60 Jahren. Über die Hälfte der Patienten war an einem serösen Ovarialkarzinom erkrankt (70,2%), und überwiegend lag ein FIGO IIIc Status vor (44,1%). 62,7% der Karzinome hatten eine high Grade Morphologie.

Die Platinsensitivität, sofern Angaben zur Verfügung standen, unterschieden sich bei den Patienten in sensibel (50%), intermediär (17,9%) und refraktär (32,1%).

Fast die Hälfte der Patienten verstarben tumorbedingt (43,5%), zusätzlich verstarben Patienten aus unbekanntem Gründen (7,2%) und nicht tumorbedingt (5,8%). Deutlich weniger als die Hälfte der dokumentierten Fälle leben rezidivfrei (31,9%) bzw. leben mit der Erkrankung (5,8%). Bei einem Teil der Patienten lagen keine näheren Angaben bzgl. des Überlebens vor (5,8%).

Tabelle 4. Übersicht der klinisch-pathologischen Parameter

Variable	Kategorie	Anzahl	Relativer Anteil (%)
Gesamtzahl	n/a	69	100
Alter bei Erstdiagnose (in Jahren)	Median (min – max)	60 (29 – 83)	
	Mittelwert	60	
Alter bei Rezidiv (in Jahren)	Median (min – max)	60 (31 – 84)	
	Mittelwert	59,4	
Zeit von OP bis zum Rezidiv (Monate)	Median (min – max)	35 (0 – 150)	
	Mittelwert	30,9	
Zeit bis zum Tod durch Tumor (Monate)	Median (min – max)	35 (0 – 204)	
	Mittelwert	47,5	
Überleben	Tumorbedingt verstorben	30	43,5
	Nicht tumorbedingt verstorben	4	5,8
	Lebt rezidivfrei	22	31,9
	Lebt mit Erkrankung	4	5,8
	Verstorben unbekannter Grund	5	7,2
	Lost to Follow-Up	4	5,8
	Gesamt	69	
Histologischer Subtyp	Serös	47	70,2
	Endometrioid	6	9,0
	solide	3	4,5
	gemischt	8	11,9
	Sonderform	3	4,5
	Gesamt	67	
FIGO	Ia	3	4,4
	Ib	0	0
	Ic	5	7,3
	IIa	0	0
	IIb	2	2,9
	IIc	5	7,3
	IIIa	1	1,5
	IIIb	5	7,3
	IIIc	30	44,1
	IV	17	25,0
Gesamt	68		
Grading	Low grade	25	37,3
	High grad	42	62,7
	Gesamt	67	
Platinsensitivität	Sensibel	14	50
	Intermediär	5	17,9
	refraktär	9	32,1
	Gesamt	28	

3.2 Auswertung immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung wurde ausgewertet, in dem die positiv angefärbten Zellen pro HPF ausgezählt wurden. Insgesamt wurden 69 Fälle ausgewertet. Pro Fall und Antikörper wurden fünf HPFs ausgezählt, anschließend wurden der Median und Mittelwert bestimmt und dokumentiert. Für alle Folgeauswertungen wurde der Median benutzt.

Die PD-L-1 Färbung zeigte zwar positive Ergebnisse, diese traten aber in zu geringer Menge auf, als dass sie zu einem aussagekräftigen statistischen Wert geführt hätten.

Eine Übersicht bildet Tabelle 5.

Tabelle 5. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung.

Antikörper	Lokalisation	Median	Mittelwert
CD 3	intraepithelial (Stroma)	7 (21)	27,4 (24,3)
CD8	Intraepithelial (Stroma)	2 (15)	18,1 (19,1)
CD68	Intraepithelial (Stroma)	34 (12)	33,0 (15,1)
CD163	Intraepithelial (Stroma)	8 (43)	25,8 (41,0)
CD25	intraepithelial	2	2,7
FOXP3	intraepithelial	2	2,0
CD25 & FOXP3 (Doppelfärbung)	intraepithelial	3	2,9

Die Antikörper CD3+, CD8+, CD68+, CD163+ wurden als Einzelfärbungen durchgeführt und zeigten gute Färbeergebnisse, mit eindeutig erkennbaren positiven Zellen. Der Großteil der positiven Zellen konnte im Stroma detektiert werden. Besonders bei CD68+ (34) und CD163+ (8) konnten einige Zellen intraepithelial als positiv gezählt werden.

CD25+ und FOXP3+ wurde als Doppelfärbung durchgeführt, auch hier waren positive Zellen zu identifizieren, jedoch fiel die Anzahl intraepithelial eher gering aus (3).

Abbildung 1. zeigt die immunhistochemische Färbung für CD3+, CD8+, CD68+, CD163+ und die Doppelfärbung von CD25+ und FOXP3+. Auf den Abbildungen 1 (a-d) sind die positiven Zellen braun angefärbt. Die Pfeile in Abbildung 1 (e) zeigen auf beispielhafte einzeln bzw. doppelt angefärbte FOXP3+ und CD25+ Zellen.

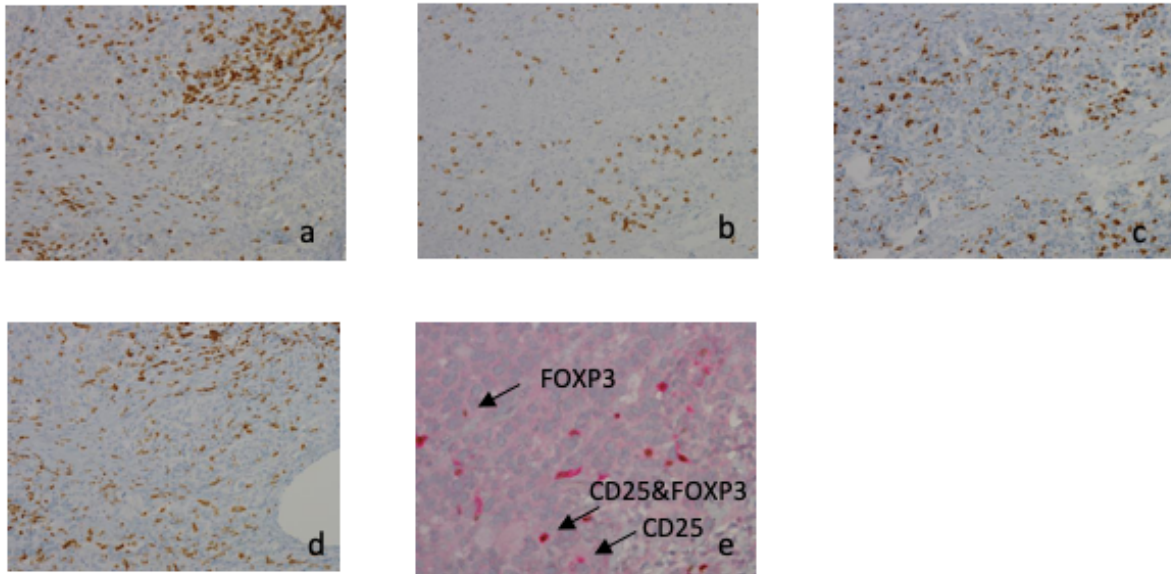


Abbildung 1. Immunhistochemische Färbung für (a) CD3+ (b) CD8+ (c) CD68+ (d) CD163+ (e) Doppelfärbung FOXP3 (braun) & CD 25+ (rot)

In Abbildung 2 ist die Verteilung der verschiedenen Antikörper systematisch aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass CD163+ im Stroma die meisten positiven Ergebnisse zu verzeichnen hatte. Im Gegensatz dazu wurden von CD25+ und FOXP3+ sowohl bei der Einzel- als auch bei der Doppelfärbung nur sehr wenige Zellen gezählt.

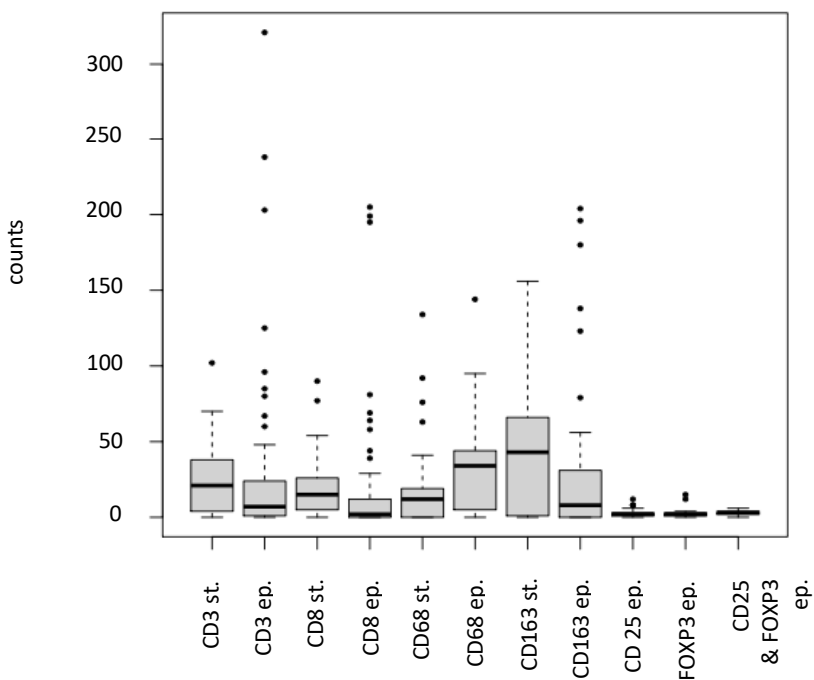


Abbildung 2. Verteilung der Zelltypen.

3.2.1. Korrelation der Antikörper

Die Ergebnisse der Auszählungen der einzelnen Antikörper wurden mit einander korreliert (Abbildung 3).

Es konnte eine starke positive Korrelation zwischen CD3+ und CD8+ im Stroma sowie intraepithelial festgestellt werden. Die Färbungen von CD8+/CD163+ und CD3+/CD68+ waren intraepithelial ebenfalls positiv miteinander korreliert.

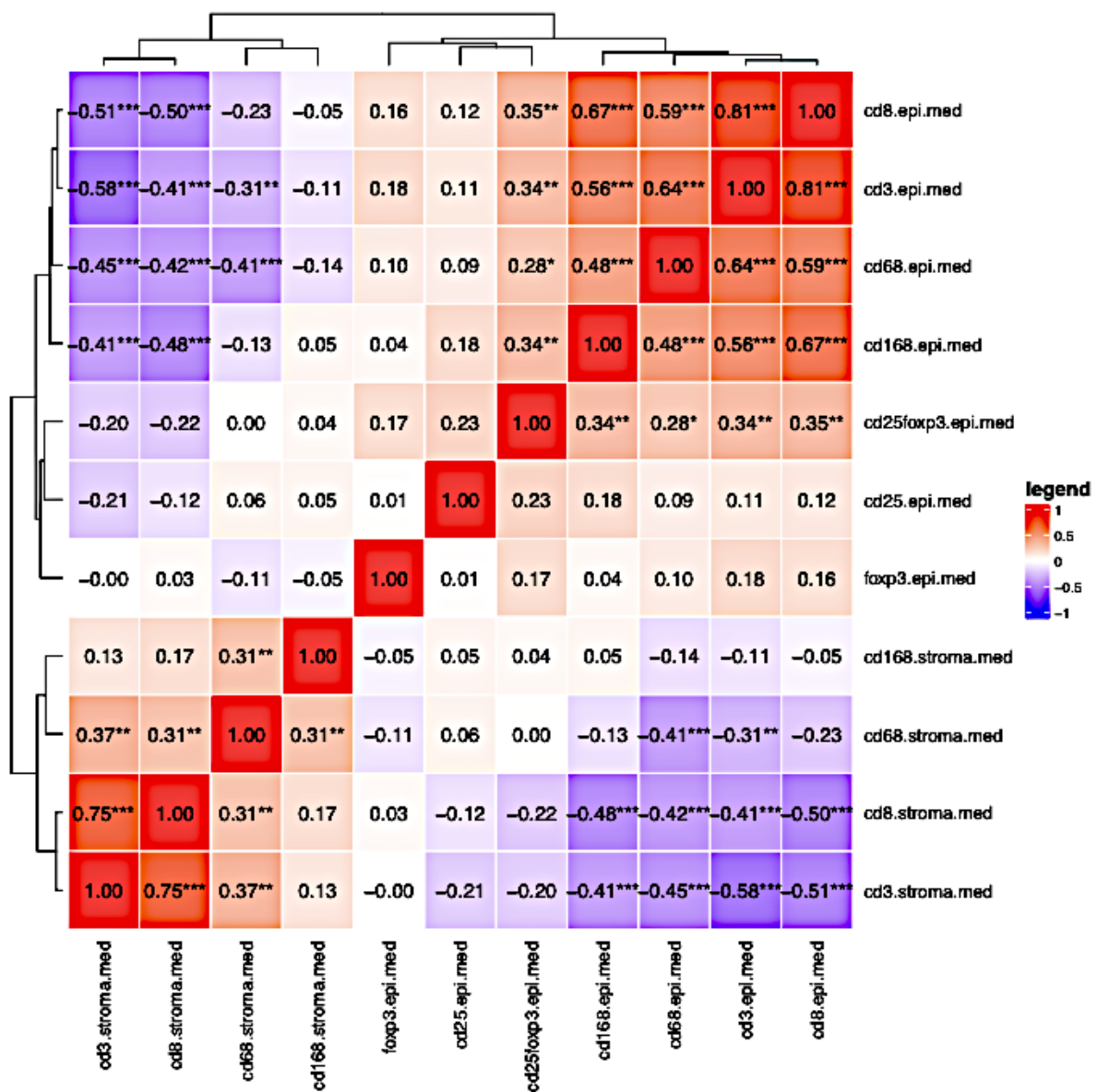


Abbildung 3. Heatmap der paarweisen Spearman Korrelationskoeffizienten (farbkodiert) der Zelltypzählungen. Sterne kennzeichnen P-Wert (*: < 0,05, **: < 0,01, ***: < 0,0001).

3.2.2. Assoziation Antikörper und FIGO

Es wurde der Zusammenhang zwischen den einzelnen Antikörpern und dem FIGO-Stadium untersucht. Tabelle 6 zeigt, dass kein P-Wert unter 5% liegt und somit kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte.

Tabelle 6. Assoziation zwischen Antikörpern und FIGO Stadium (Wilcoxon Test).

Variable	No.1	No.2	Med.1	Med.2	Estimate	P-value
CD3 stroma.	15	53	12.0	22.00	-7.0	0.154
CD3 epi.	15	53	10.0	7.00	2.0	0.346
CD8 stroma.	15	53	11.0	15.00	-6.0	0.134
CD8 epi.	15	53	7.0	2.00	3.0	0.314
CD68 stroma.	15	53	0.0	14.00	-7.0	0.0502
CD68 epi.	15	53	34.0	35.00	-1.0	0.778
CD163 stroma.	15	53	59.0	40.00	11.0	0.252
CD163 epi.	15	53	17.0	5.00	7.0	0.234
CD25 epi.	15	53	3.0	2.00	0.0	0.389
FOXP3 epi.	15	53	2.0	2.00	1.0	0.193
CD25&FOXP3 epi.	15	53	4.0	3.00	1.0	0.0896

3.2.3. Assoziation Antikörper und Grading

Es zeigte sich eine signifikant stärkere CD68+ Positivität intraepithelial bei Tumoren mit höherem Grading (P-Wert = 0,0448) (Tabelle 7).

Tabelle 7. Assoziation zwischen Antikörpern und Grading (Wilcoxon Test).

Variable	No.1	No.2	Med.1	Med.2	Estimate	P-value
CD3 stroma.	25	42	20.0	23.00	-4.0	0.443
CD3 epi.	25	42	3.0	10.00	-1.9	0.423
CD8 stroma.	25	42	23.0	14.50	5.0	0.142
CD8 epi.	25	42	1.0	4.50	-1.0	0.119
CD68 stroma.	25	42	13.0	8.00	0.0	0.905
CD68 epi.	25	42	26.0	35.50	-11.0	0.0448
CD163 stroma.	25	42	43.0	38.50	5.0	0.371
CD163 epi.	25	42	3.0	14.50	-4.0	0.147
CD25 epi.	25	42	3.0	2.00	1.0	0.0559
FOXP3 epi.	25	42	2.0	2.00	-0.0	0.708
CD25&FOXP3 epi.	25	42	3.0	3.00	-0.0	0.638

3.2.4. Assoziation Antikörper und Platinsensitivität

Die Untersuchung der Assoziation zwischen den Antikörpern und dem Ansprechen auf eine platinbasierte Chemotherapie zeigte keine signifikante Korrelation (Tabelle 8).

Tabelle 8. Assoziation zwischen Antikörpern und Platinsensitivität (Wilcoxon Test).

Variable	No.1	No.2	Med.1	Med.2	Estimate	P-value
CD3 stroma.	14	9	15.0	22.0	-11.3	0.268
CD3 epi.	14	9	4.5	1.00	2.0	0.125
CD8 stroma.	14	9	12.5	20.00	-6.4	0.548
CD8 epi.	14	9	2.0	0.00	0.0	0.443
CD68 stroma.	14	9	13.5	14.00	0.0	0.848
CD68 epi.	14	9	28.0	24.00	-0.0	1
CD163 stroma.	14	9	41.0	43.00	-0.0	0.949
CD163 epi.	14	9	4.0	3.00	0.0	0.701
CD25 epi.	14	9	2.5	1.00	1.0	0.0651
FOXP3 epi.	14	9	1.0	1.00	0.0	0.895
CD25&FOXP3 epi.	14	9	2.0	2.00	-0.0	1

3.2.5. Überlebenszeitanalyse (Assoziation Antikörper und Zeit bis zum Rezidiv)

Es zeigte sich bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Antikörper und Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs eine signifikant höheres Rezidivrisiko für Patientinnen mit stärkerer Anfärbung von CD68+ intraepithelial (P-Wert = 0,02). Ein noch stärkerer Zusammenhang lässt sich zwischen FIGO und der Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs erkennen (P-Wert = 0,00337) (Tabelle 9).

Tabelle 9. Ergebnisse univariates Cox-Regressionsmodell Korrelation Antikörper/Rezidiv.

Variable	n	n.event	HR	CI.l	CI.u	P-value
Age	69	31	0,989	0,956	1,023	0,513
CD3 stroma.	69	31	1,009	0,993	1,025	0,275
CD3 epi.	69	31	1,001	0,996	1,006	0,655
CD8 stroma.	69	31	0,999	0,982	1,016	0,929
CD8 epi.	69	31	1,002	0,995	1,008	0,583
CD68 stroma.	69	31	0,993	0,978	1,009	0,406
CD68 epi.	69	31	1,011	1,002	1,021	0,02
CD163 stroma.	69	31	0,999	0,989	1,010	0,879
CD163 epi.	69	31	1,001	0,994	1,008	0,771
CD25 epi.	69	31	0,998	0,854	1,167	0,981
FOXP3 epi.	69	31	0,851	0,687	1,069	0,172
CD25&FOXP3 epi.	69	31	0,915	0,709	1,180	0,492
FIGO	68	31	8,640	2,043	36,531	0,00337
Grading	67	30	1,092	0,518	2,302	0,816

3.2.6. Assoziation Antikörper, klinische Parameter und tumorbedingter Tod

Schlussendlich wurden das Alter bei Erstdiagnose, FIGO-Stadium, Grading und die Antikörper im Zusammenhang mit dem tumorbedingten Tod statistisch untersucht. Es wurde ein univariates Cox-Regressionsmodell angewendet. Besonders FIGO erreicht hier einen signifikanten Wert (P-Wert = 0,0107) (Tabelle 10).

Tabelle 10. Ergebnisse univariates Cox-Regressionsmodell Korrelation Antikörper, klinische Parameter & tumorbedingter Tod.

Variable	n	n.event	HR	CI.l	CI.u	P-value
Age	69	30	1,013	0,977	1,050	0,484
CD3 stroma.	69	30	1,015	0,999	1,031	0,0654
CD3 epi.	69	30	0,998	0,992	1,005	0,623
CD8 stroma.	69	30	1,008	0,992	1,025	0,313
CD8 epi.	69	30	0,999	0,991	1,007	0,828
CD68 stroma.	69	30	0,993	0,977	1,010	0,438
CD68 epi.	69	30	1,005	0,993	1,017	0,41
CD163 stroma.	69	30	0,995	0,984	1,006	0,397
CD163 epi.	69	30	1,001	0,993	1,008	0,891
CD25 epi.	69	30	1,122	0,960	1,311	0,147
FOXP3 epi.	69	30	0,848	0,654	1,100	0,215
CD25&FOXP3 epi.	69	30	1,012	0,769	1,331	0,934
FIGO	68	30	13,466	1,828	99,184	0,0107
Grading	67	29	0,945	0,434	2,057	0,886

4 Diskussion

Das Vorkommen von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (CD3+, CD8+), Treg (CD25+, FOXP3) und tumorassoziierten Makrophagen (CD68+, CD163+) im Ovarialkarzinom ist mittlerweile sehr gut untersucht und in der Literatur ausführlich beschrieben (23). Der Zusammenhang zwischen Ovarialkarzinom und PD-L1 Expression wurde in jüngster Vergangenheit häufiger untersucht (35).

Diese Dissertation wurde vor dem Hintergrund der Arbeit von Mhaweck-Fauceglia et al. erstellt, um die Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Mhaweck-Fauceglia et al. untersuchten allerdings nicht die PD-L1 Expression im Ovarialtumor.

Die statistische Auswertung ergab, dass CD3+ und CD8+ stromal sowie im Epithel eine starke Korrelation aufwiesen. Dieses Ergebnis scheint mit den Untersuchungen von Zhang et al. erklärbar zu sein, in ihrer Arbeit wurden zum ersten Mal CD3+ T-Lymphozyten intratumoral bei HGSC mit proportionaler erhöhter Expression von Interferon- γ , Interleukin-2 und Chemokinen identifiziert (21). Später untersuchten Helal et al. tumorinfiltrierende entzündliche Infiltrate in zahlreichen gutartigen und bösartigen Eierstocktumoren und zeigten auf, dass die CD8+ zytotoxische T- Lymphozyten signifikant höher in bösartigen Eierstocktumoren und vor allem in serösen Ovarialkarzinomen vorkommen (41). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CD8+/ CD163+ sowie CD3+/ CD68+ intraepithelial miteinander positiv assoziiert waren. Dieses Ergebnis stimmt mit denen der Arbeit von Mhaweck-Fauceglia et al. überein (23). Es konnte keine direkte Korrelation zwischen den Antikörpern und dem FIGO Stadium festgestellt werden, FIGO korrelierte allerdings positiv mit einem höheren Rezidivrisiko und dem tumorbedingten Tod. Hier weicht das Ergebnis von Mhaweck-Fauceglia et al. ab, die Zellhäufigkeit von CD8+ Zellen korrelierte negativ mit dem FIGO-Stadium und das FIGO-Stadium korrelierte jedoch positiv mit dem Auftreten von CD163+ (23).

In beiden Arbeiten konnte eine positive Korrelation zwischen CD68+ und dem Grading des Tumors nachgewiesen werden. Bei Mhaweck-Fauceglia et al. ergab sich zusätzlich eine positive Korrelation zwischen dem Grading und CD3+, CD163+ und Treg-Zellen.

Eine Assoziation zwischen Antikörpern und platinbasierter Chemotherapie konnte nicht nachgewiesen werden, Mhaweck-Fauceglia et al. hat hierzu keine Untersuchungen vorgenommen.

Frühe Rezidive korrelieren mit dem verstärkten positiven Auftreten von CD68 intraepithelial und dem FIGO-Stadium, auch hierzu machen Mhawech-Fauceglia et al. keine Angaben (23). Abschließend wurden die Zusammenhänge zwischen Alter bei Erstdiagnose, FIGO-Stadium, Grading, Antikörperverteilung und tumorbedingten Tod untersucht. Statistisch zeigte sich nur bei FIGO ein signifikanter Wert. Die Arbeit von Mhawech-Fauceglia et al. hingegen zeigte, dass das Vorkommen von Treg mit einer positiven Prognose für den Krankheitsverlauf assoziiert zu sein scheint. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis haben auch spätere Studien über ein signifikant verringertes Sterberisiko bei Patienten mit einer höheren intraepithelialen CD3-Expression berichtet (40,41).

Viele Studien haben sich mit dem Einfluss von TAMs auf den Verlauf der Erkrankung befasst und machen deutlich, dass zwischen den verschiedenen TAMs unterschieden werden muss (44,45). Makrophagen sind in zwei funktionell unterschiedliche Formen polarisiert, M1 und M2, als Reaktion auf unterschiedliche Mikroumgebungen.

Tumorassoziierte Makrophagen haben im Allgemeinen den Phänotyp M2 und fördern die Tumorprogression. CD68+ und CD163+ fungieren dabei als M2-Marker (42).

Auch die Pilotstudie von Vankerckhoven et. zeigte, dass zwischen den verschiedenen TAMs unterschieden werden muss (45). So kann die Mehrzahl der Makrophagen aufgrund ihres Aktivierungsstatus in diese zwei Phänotypen eingeteilt werden. Die klassisch aktivierten Makrophagen (M1, Typ1) exprimieren eine breite Reihe von proinflammatorischen immunstimulierenden Effektormolekülen und weisen eine starke antitumorale Aktivität auf. Im Gegensatz hierzu zeichnen sich die alternativ aktivierten Makrophagen (M2, TypII) durch einen tumorfördernden Phänotyp aus (46). Neueste Daten zeigen, dass TAM nicht immer in einen reinen M1- oder reinen M2-Phänotyp charakterisiert werden können (47).

In unserer Studie wurde nicht differenzierter auf die Verhältnisse der unterschiedlichen Phänotypen zueinander eingegangen. Diverse Studien lassen aber vermuten, dass das Verhältnis der verschiedenen Phänotypen der TAMs von besonderer Bedeutung für die Prognose ist.

Eine Studie von Zhang et al. zeigt, dass ein erhöhtes M1/M2-Verhältnis mit einer verbesserten Prognose bei Ovarialkarzinom-Patientinnen korreliert, was auf die Bedeutung dieses Gleichgewichtes zwischen immunstimulierenden M1- und tumorfördernden M2-Makrophagen hinweist (48).

Dieses Ergebnis wird zusätzlich durch die Meta-Analyse von Yuan et al. unterstützt, die verdeutlicht, dass ein höheres M1/ M2- Verhältnis im Tumorgewebe mit einem günstigen Gesamtüberleben verbunden ist.

Insgesamt scheint ein vermehrtes Vorkommen von M2-TAMs die Prognose von Patientinnen mit Ovarialkarzinom zu verschlechtern (49).

Yuan et al. zeigten auch, dass ein vermindertes progressionsfreies Überleben mit einer hohen Dichte an CD 163+ und einem höheren Verhältnis von CD163+/ CD68+ assoziiert waren. Zusätzlich wurde eine hohe Dichte von CD163+ und CD68+ im fortgeschrittenen Ovarialkarzinom beobachtet

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Infiltration von CD163+ mit einer schlechten Prognose verbunden ist und ein hohes M1/ M2-Makrophagenverhältnis im Tumorgewebe eine bessere Prognose bedeutet (49).

Aufgrund der statistisch nicht auswertbaren Ergebnisse der PD-L1 Färbung konnten hierzu keine Ergebnisse definiert werden.

Diverse Studien untersuchten die Zusammenhänge von PD-L1, TILs und TAMs in Ovarialkarzinomen und deren Einfluss auf die Prognose.

De la Fuente et al. haben das Vorhandensein von im Tumorepithel befindlichen Makrophagen (CD68+ & CD163+), Lymphozyten (CD3+), die zelltypische Expression von PD-L1 und PD-1 und deren Einfluss auf das 5-Jahres-Gesamtüberleben im fortgeschrittenen HGSC untersucht.

In dieser Studie zeigte sich, dass PD-L1 hauptsächlich von Makrophagen, PD-1 von Lymphozyten und beide nicht von Tumorzellen exprimiert wurde. Frauen mit höherer CD3+, PD-L1 und PD-1 Expression hatten einen Überlebensvorteil (50).

Die spärliche Expression von PD-L1 in HGSC-Tumorzellen ist im Gegensatz zu anderen Malignomen (51) weiterhin ein ungelöstes Problem. Dennoch deutet der beobachtete Überlebensvorteil darauf hin, dass das Potential der Tumorummunität in Untergruppen der HGSC genutzt werden könnte (50).

Webb et al. fanden eine stark positive Assoziation zwischen PD-L1-Expression und dem Vorhandensein mehrerer TIL-Subtypen, darunter CD8+, CD103+, PD-1 und FoxP3+ TIL heraus. In HGSC (High-grade serous carcinoma) war die Positivität von PD-L1 mit einer günstigen Prognose verbunden. So wurde PD-L1, obwohl es ein negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung ist, mit einer prognostisch günstigen TIL-Antworten assoziiert.

Die Ergebnisse stehen laut den Autoren im Einklang mit dem Konzept der adaptiven Resistenz, bei dem aktivierte T-Zellen negative Rückkopplungsmechanismen in der Tumormikroumgebung auslösen, was zu einem immunologischen Stillstand führt (35).

Webb et al. widersprechen damit der Studie von Hamanishi et al., in der die PD-L1-Expression umgekehrt mit den TIL und dem Überleben korrelierte.

Wenn man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit betrachtet, fällt auf, dass viele Untersuchungen zu keinem eindeutigen Ergebnis gekommen sind. Mögliche Limitationen ergeben sich durch überaltertes Probenmaterial, da das OP-Material teilweise schon sehr lange gelagert wurde, oder ein zu langes Intervall zwischen Schnitten, Testung und Färbung lag.

Im Hinblick auf den Vergleich zu der Arbeit von Mhawech-Fauceglia et al. fällt auf, dass das Kollektiv nur aus hereditär bedingten Fällen bestand. In unserer Studie wies der Großteil der Patientinnen keine familiäre Belastung auf.

Unsere Ergebnisse stimmen insoweit mit den publizierten Ergebnissen überein, dass TILs und TAMs für Ovarialkarzinom-Patientinnen von prognostischem Wert sein könnten. Die positive Korrelation der Epithelfärbung gibt einen Hinweis darauf, dass die intraepitheliale Immunantwort beim Ovarialkarzinom eine Rolle spielt.

Es bedarf vieler weiterer und weitaus mehr differenzierter Studien, um die Rolle des Immunsystems in Bezug auf das Ovarialkarzinom weiter zu entschlüsseln.

5 Zusammenfassung

Aufgrund seiner hohen Mortalitätsrate gehört das Ovarialkarzinom zu einer der gefährlichsten Erkrankungen bei Frauen.

Das Immunsystem mit seinen Makrophagen und Lymphozyten scheint hierbei einen wichtigen regulatorischen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung zu haben.

Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen tumorinfiltrierenden Lymphozyten, tumorassoziierten Makrophagen und der Überlebensrate bei an Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen besteht.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit das Auftreten des Checkpoint-Inhibitors Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) untersucht, da eine PD-L1-Überexpression als prognostischer Faktor dienen könnte.

Die Ovarialkarzinomfälle, die für diese Arbeit verwendet wurden, stammen aus dem Archiv des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins und wurden retrospektiv untersucht.

Die Verifizierung der histopathologischen Diagnose erfolgte erneut durch einen Pathologen, anschließend wurden die immunhistochemischen Untersuchungen durchgeführt.

Für die Detektion der tumorinfiltrierenden Lymphozyten wurden die Antikörper CD3+/CD8+, für die regulatorischen T-Zellen wurden CD25+/FOXP3 und für die tumorassoziierten Makrophagen wurden die Antikörper CD68+ und CD163+ verwendet. Zusätzlich erfolgte eine Färbung mit PD-L1.

Die Ergebnisse wurden mikroskopisch und anschließend statistisch ausgewertet.

Die PD-L1 Färbung zeigte zwar positive Ergebnisse, diese traten aber in zu geringer Menge auf, als dass sie zu einem aussagekräftigen statistischen Wert führten.

Die Auswertung ergab, dass CD3+ und CD8+ stromal sowie intraepithelial eine starke Korrelation aufwiesen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass CD8+/CD163+ sowie CD3+/CD68+ intraepithelial miteinander positiv assoziiert waren.

CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten kommen vor allem in serösen Ovarialkarzinomen vor.

Es lässt darauf schließen, dass das Ovarialkarzinom vom Immunsystem relativ früh erkannt wird und möglicherweise die zytotoxischen T-Lymphozyten bei der Tumorzelleliminierung eine entscheidende Rolle spielen.

CD68+ und CD163+ sind Marker des M2-Typs der tumorassoziierten Makrophagen und zeichnen sich als tumorfördernde Phänotypen aus.

Es konnte eine Korrelation zwischen CD68+ und dem Grading des Tumors nachgewiesen werden und zusätzlich korrelierten das frühe Auftreten von Rezidiven mit einem verstärkten positiven Auftreten von CD68+ intraepithelial.

Vor allem ein gehäuftes Auftreten der M2-Makrophagen verschlechtert die Prognose der betroffenen Patientinnen. Es wird immer deutlicher, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten mit einem positiven Verlauf der Tumorerkrankung assoziiert sind und Makrophagen mit einem schlechteren Verlauf in Verbindung gebracht werden, wobei hier zwischen den einzelnen Phänotypen der Makrophagen unterschieden werden muss.

Diese Arbeit skizziert den Einfluss des Immunsystems auf den Verlauf und die Prognose des Ovarialkarzinoms. In Zukunft muss die Rolle des Immunsystems noch wesentlich differenzierter betrachtet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Krebs - Krebs in Deutschland [Internet]. [cited 2019 Aug 24]. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html
2. S3-Leitlinie Maligne Ovarialtumoren. 2019;152.
3. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet Lond Engl*. 1971 Jul 17;2(7716):163.
4. Fathalla MF. Incessant ovulation and ovarian cancer – a hypothesis re-visited. *Facts Views Vis ObGyn*. 2013;5(4):292–7.
5. Karst AM, Levanon K, Drapkin R. Modeling high-grade serous ovarian carcinogenesis from the fallopian tube. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 3;108(18):7547–52.
6. Jarboe E, Folkins A, Nucci MR, Kindelberger D, Drapkin R, Miron A, et al. Serous Carcinogenesis in the Fallopian Tube: A Descriptive Classification. *Int J Gynecol Pathol*. 2008 Jan;27(1):1–9.
7. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol*. 2000 Aug;19(1):3–10.
8. Runnebaum IB, Stickeler E. Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001 Feb;127(2):73–9.
9. Kurman R, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Lyon IARC Press. 2014 Jan 1;
10. Kurman RJ, Shih I-M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol*. 2016 Apr 1;186(4):733–47.
11. Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, et al. Effect of Screening on Ovarian Cancer Mortality: The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2011 Jun 8;305(22):2295–303.
12. Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Kalsi JK, et al. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2016 Mar 5;387(10022):945–56.
13. Bankhead CR, Kehoe ST, Austoker J. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2005;112(7):857–65.
14. Bois A du, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. *Cancer*. 2009;115(6):1234–44.

15. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival Effect of Maximal Cytoreductive Surgery for Advanced Ovarian Carcinoma During the Platinum Era: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 1;20(5):1248–59.
16. Trimbos B, Timmers P, Pecorelli S, Coens C, Ven K, van der Burg M, et al. Surgical Staging and Treatment of Early Ovarian Cancer: Long-term Analysis From a Randomized Trial. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2010 Jul 7;102(13):982–7.
17. Bois A du, Rochon J, Pfisterer J, Hoskins WJ. Variations in institutional infrastructure, physician specialization and experience, and outcome in ovarian cancer: A systematic review. *Gynecol Oncol*. 2009 Feb 1;112(2):422–36.
18. Amin N, Chaabouni N, George A. Genetic testing for epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2020 May 1;65:125–38.
19. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung [Internet]. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*. 1909 [cited 2019 Aug 26]. Available from: <https://www.ntvg.nl/artikelen/ueber-den-jetzig-stand-der-karzinomforschung>
20. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. THE RENAISSANCE OF CANCER IMMUNOSURVEILLANCE IFN- γ , Perforin, and Lymphocytes in Tumor. In 2004.
21. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jan 16;348(3):203–13.
22. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 20;102(51):18538.
23. Mhawech-Fauceglia P, Wang D, Ali L, Lele S, Huba MA, Liu S, et al. Intraepithelial T cells and tumor-associated macrophages in ovarian cancer patients. *Cancer Immun* [Internet]. 2013 Jan 15 [cited 2019 Aug 22];13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3559189/>
24. Stumpf M, Hasenburger A, Riener M-O, Jütting U, Wang C, Shen Y, et al. Intraepithelial CD8-positive T lymphocytes predict survival for patients with serous stage III ovarian carcinomas: relevance of clonal selection of T lymphocytes. *Br J Cancer*. 2009 Nov 3;101(9):1513–21.
25. Adams SF, Levine DA, Cadungog MG, Hammond R, Facciabene A, Olvera N, et al. Intraepithelial T Cells and Tumor Proliferation: Impact on the Benefit from Surgical Cytoreduction in Advanced Serous Ovarian Cancer. *Cancer*. 2009 Jul 1;115(13):2891–902.
26. Shah CA, Allison KH, Garcia RL, Gray HJ, Goff BA, Swisher EM. Intratumoral T cells, tumor-associated macrophages, and regulatory T cells: association with p53 mutations, circulating tumor DNA and survival in women with ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008 May;109(2):215–9.

27. Salvi S, Segalla F, Rao S, Arienti F, Sartori M, Bratina G, et al. Overexpression of the T-cell receptor beta-chain variable region TCRBV14 in HLA-A2-matched primary human melanomas. *Cancer Res.* 1995 Aug 1;55(15):3374–9.
28. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):942–9.
29. Leffers N, Gooden MJM, de Jong RA, Hoogeboom B-N, ten Hoor KA, Hollema H, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Mar;58(3):449–59.
30. Barnett B, Kryczek I, Cheng P, Zou W, Curiel TJ. Regulatory T Cells in Ovarian Cancer: Biology and Therapeutic Potential. *Am J Reprod Immunol.* 2005;54(6):369–77.
31. Yigit R, Massuger LFAG, Figdor CG, Torensma R. Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination. *Gynecol Oncol.* 2010 May;117(2):366–72.
32. Zhu J, Wen H, Bi R, Wu Y, Wu X. Prognostic value of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in ovarian clear cell carcinoma. *J Gynecol Oncol.* 2017 Jul 3;28(6):0.
33. Santoiemma PP, Jr DJP. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther.* 2015 Jun 3;16(6):807–20.
34. Pinto MP, Balmaceda C, Bravo ML, Kato S, Villarroel A, Owen GI, et al. Patient inflammatory status and CD4+/CD8+ intraepithelial tumor lymphocyte infiltration are predictors of outcomes in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2018 Oct 1;151(1):10–7.
35. Webb JR, Milne K, Kroeger DR, Nelson BH. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2016 May 1;141(2):293–302.
36. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol.* 2013 Dec;14(12):1212–8.
37. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):114–25.
38. Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2015 Aug 1;23:32–8.
39. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci Transl Med.* 2012 Mar 28;4(127):127ra37-127ra37.

40. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Feb 27;104(9):3360–5.
41. Helal TE-A, Alla AEK, Laban MA, Fahmy RM. Immunophenotyping of tumor-infiltrating mononuclear cells in ovarian carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2004 Jun;10(2):80–4.
42. Expression of M2-Polarized Macrophages is Associated with Poor Prognosis for Advanced Epithelial Ovarian Cancer - Chunyan Lan, Xin Huang, Suxia Lin, Huiqiang Huang, Qichun Cai, Ting Wan, Jiabin Lu, Jihong Liu, 2013 [Internet]. [cited 2020 Jun 30]. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.7785/tcrt.2012.500312>
43. Li J, Wang J, Chen R, Bai Y, Lu X. The prognostic value of tumor-infiltrating T lymphocytes in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017 Jan 31;8(9):15621–31.
44. Hwang W-T, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2012 Feb 1;124(2):192–8.
45. Vankerckhoven A, Wouters R, Mathivet T, Ceusters J, Baert T, Van Hoylandt A, et al. Opposite Macrophage Polarization in Different Subsets of Ovarian Cancer: Observation from a Pilot Study. *Cells*. 2020 Feb;9(2):305.
46. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*. 2010 Apr 2;141(1):39–51.
47. Cassetta L, Fragkogianni S, Sims AH, Swierczak A, Forrester LM, Zhang H, et al. Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets. *Cancer Cell*. 2019 Apr 15;35(4):588-602.e10.
48. Zhang M, He Y, Sun X, Li Q, Wang W, Zhao A, et al. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J Ovarian Res*. 2014 Feb 8;7(1):19.
49. Yuan X, Zhang J, Li D, Mao Y, Mo F, Du W, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2017 Oct 1;147(1):181–7.
50. Martin de la Fuente L, Westbom-Fremer S, Arildsen NS, Hartman L, Malander S, Kannisto P, et al. PD-1/PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes are prognostically favorable in advanced high-grade serous ovarian carcinoma. *Virchows Arch* [Internet]. 2020 Jan 24 [cited 2020 Mar 4]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02751-6>
51. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol*. 2017 Feb 1;12(2):208–22.

7 Danksagungen

Abschließend möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit fertigzustellen.

Bei Prof. Dr. Norbert Arnold bedanke ich mich für die Bereitstellung und Betreuung des Themas sowie bei Sigrid Hamann für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katharina Tiemann für die konstruktive Zusammenarbeit und die sehr gute fachliche Betreuung. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. Silke Szymczak für die statistische Unterstützung.

Ich danke allen Mitdoktoranden und Masterstudenten für den uneingeschränkten Austausch von Informationen und die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit: Dr. Jacob Kölln, Carolin Köhlmoos, Lene Fabricius.

Meiner Familie möchte ich besonders für die Ermöglichung des Studiums danken, denn ohne euch wäre der Weg zum Ziel sehr steinig geworden.

8 Akademischer Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Friederike Mengelkamp
Geburtsdatum: 23.12.1988
Geburtsort: Marburg an der Lahn

Schulische Ausbildung

1995-1999 Grund- und Hauptschule Suchsdorf, Kiel
1999-2008 Gymnasium Kronshagen

Studium

2009-2010 Semmelweis Universität, Budapest
2011-2016 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Seit 2016 Promotionsstudentin an der CAU zu Kiel

Berufliche Ausbildung

2017-2019 Assistenz Zahnärztin
Seit 2019 Angestellte Zahnärztin

9 Publikation

Mengelkamp, F., Szymczak S., Hilpert F., Bauerschlag D., Maass N., Röcken C., Tiemann K., Arnold N. Association between survival in ovarian cancer patients and tumor associated lymphocytes and macrophages. 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik. medgen 2019 Jan 31; 109-110

