

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Dynamik des intratumoralen Immuninfiltrats während der
Progression des high-grade serösen Ovarialkarzinoms

Dynamics of the intratumoral immune response during
progression of high-grade serous ovarian cancer

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mandy Vanessa Stanske

aus Berlin

Datum der Promotion: 21. Juni 2020

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	3
2. Abstract	4
3. Manteltext.....	6
3.1 Einleitung.....	6
3.2 Methodik	11
3.3 Ergebnisse.....	17
3.4 Diskussion	20
3.5 Literaturverzeichnis.....	26
4. Eidesstattliche Versicherung	31
5. Anteilserklärung.....	32
6. Auszug aus der Journal Summary List.....	33
7. Druckexemplar der Originalpublikation.....	34
8. Lebenslauf.....	44
9. Komplette Publikationsliste	46
10. Danksagung	47

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation die Sprachform des generischen Maskulinums verwendet. Sofern nicht anders dargestellt, ist die männliche Form geschlechtsunabhängig zu verstehen.

1. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
BRCA	Tumorsuppressorgen Breast Cancer early onset
BRCA _{mt}	BRCA mit Mutation
BRCA _{wt}	BRCA Wildtyp
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
EOC	epithelial ovarian cancer
FFPE	formalinfixiert und paraffineingebettet
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GCIG	Gynecologic Cancer Intergroup
HGSOC	high-grade seröses Ovarialkarzinom
IRS	Immunoreactivity Score
MHC	Major Histocompatibilitycomplex
NACT	neoadjuvante Chemotherapie
OCTIPS	Ovarian Cancer Therapy – Innovative Models Prolong Survival
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PFS1	Progressionsfreies Überleben nach Primärtumor
PFS2	Progressionsfreies Überleben nach erstem Rezidiv
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
TCRB	T-Cell Receptor β
TILs	Tumordinfiltrierende Lymphozyten
TMA	Tissue Microarray
TP53	Tumorsuppressorgen 53

2. Abstrakt

Abstrakt – Deutsch

Einleitung: Das Ovarialkarzinom geht mit der höchsten Mortalität aller gynäkologischen Tumore einher. Zur schlechten Prognose tragen insbesondere die Rezidivtumore bei, die zwar einen Großteil der Patientinnen betreffen, über deren Biologie jedoch bislang nur wenig bekannt ist. Ein adäquates Therapiemanagement wird unter anderem durch eine hohe intratumorale genetische Vielfalt erschwert. Auch die anti-tumorale Immunantwort gilt als prognostischer Faktor und stellt einen möglichen Ansatzpunkt für innovative Therapiekonzepte dar. Jedoch ist die Heterogenität des Immuninfiltrates bisher nur unzureichend erforscht. Unsere Arbeit untersucht die Dynamik des Immuninfiltrats während der Tumorprogression erstmals in gepaarten Primär- und Rezidivtumoren des high-grade serösen Ovarialkarzinoms (HGSOC).

Methodik: Wir untersuchten die Dichte CD3+, CD4+, CD8+ tumorinfiltrierender Lymphozyten (TILs) und MHC1, 2 Expression in 113 gepaarten primären und rezidierten HGSOCs immunhistochemisch an Tissue Microarrays (TMAs). Die TILs Quantifizierung erfolgte erstmals über eine neue, automatisierte Bildanalysesoftware (CD3 Quantifier), die im Rahmen dieser Arbeit validiert und weiterentwickelt wurde. Alle Patientinnen waren Teil des EU-finanzierten OCTIPS FP7 Projekts.

Ergebnisse: Wir fanden eine signifikante Korrelation der TILs Dichte und MHC Expression zwischen Primär- und Rezidivtumor. Die anti-tumorale Immunantwort zeigte sich im Verlauf stabil, jedoch ergaben sich in einigen Tumoren Hinweise auf eine verstärkte Immunantwort im Rezidiv. Die meisten immunologischen Marker verloren im Rezidivtumor ihren prognostischen Wert.

Schlussfolgerung: Die aufgeführten Ergebnisse zeigen eine homogene Immunantwort im Verlauf des HGSOC erstmals im Vergleich zwischen Primär- und Rezidivtumor. Dass eine erhöhte Immuninfiltration im Rezidiv nicht mit einer verbesserten Prognose einhergeht, lässt zudem vermuten, dass eine Effektivität der anti-tumoralen Immunantwort im Laufe der Tumorprogression nicht zwingend gegeben ist. Unsere Arbeit zeigt, dass eine Gewebeprobe des Primärtumors auch für die immunologische Untersuchung des Rezidivs verwendet werden könnte und somit Rückschlüsse auf das bislang nur unzureichend erforschte rezidierte Ovarialkarzinom zulässt.

Abstract – English

Introduction: Epithelial ovarian cancer (EOC) is associated with the highest mortality rate among all gynecological cancer. Poor prognosis is especially attributed to recurrent disease, which a majority of women develop, but which to date is only poorly understood. To make matters worse, EOC is known for a high intratumoral genetic variability that impedes an adequate therapeutic management. Apart from that, the anti-tumoral immune response is perceived as a pivotal prognostic factor and a potential base for immunotherapy. Still, research on the heterogeneity of intratumoral immunoinfiltration remains scant. In this study we analyze the dynamic of the intratumoral immune response during progression of high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) and therefore compare paired tumor samples of primary and recurrent disease for the first time.

Methods: We systematically analyzed the densities of CD3+, CD4+, CD8+ tumorinfiltrating lymphocytes (TILs) and MHC1, 2 expression by immunohistochemistry on tissue microarrays (TMAs) in 113 paired samples of primary and recurrent HGSOC. TILs quantifying was performed using a new automated software (CD3 Quantifier) for the first time. As part of this study the software was validated and further developed by comparative analyses. All patients had been included to the EU-funded OCTIPS FP7 project.

Results: Our analysis revealed a correlation of TILs density and MHC expression between primary and recurrent HGSOC. The anti-tumoral immune response remained stable during tumor progression, however, part of the tumors showed an enhanced immunogenicity in recurrent tumors. Most of the immunological markers lost their prognostic impact in recurrent disease.

Conclusion: We are the first ones to show a homogenous intratumoral immune response across primary and recurrent tumors in HGSOC. A higher anti-tumoral immune response was not associated with a better prognosis in recurrent tumor. Thus, we assume an immune response during tumor progression might not necessarily be effective. Our findings suggest that tissue samples of a primary lesion could also be used for the immunological analysis of the recurrent tumor. This would allow to gain further insights into the investigation of the so far poorly understood recurrent EOC.

3. Manteltext

Die nachfolgende Arbeit bezieht sich auf die Publikation "Dynamics of the Intratumoral Immune Response during Progression of High-Grade Serous Ovarian Cancer", veröffentlicht in Neoplasia, Volume 20, Ausgabe 3, März 2018, Seiten 280-288.

3.1 Einleitung

Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist der Tumor des weiblichen Genitaltraktes mit der höchsten Mortalität und steht mit einem Gesamtanteil von 5,2% an fünfter Stelle aller Krebstodesursachen bei Frauen (1). Das therapeutische Management beinhaltet die radikale operative Zytoreduktion in Kombination mit zytotoxischer Chemotherapie auf Platinbasis, dabei stellt die primäre oder sekundäre Platinresistenz, die ein Großteil der Patientinnen entwickelt, ein bedeutendes Problem dar (2, 3). Bei etwa 90% der ovariellen Krebserkrankungen handelt es sich um Karzinome (epithelial ovarian cancer, EOC). Den häufigsten histologischen Subtypen stellt das high-grade seröse Ovarialkarzinom (HGSOC) dar, das eine 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich 43% aufweist (4). Aufgrund später, unspezifischer Symptomatik und fehlender Screeningmethoden wird die Diagnose häufig erst in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien gestellt (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) III/IV), was wesentlich zur schlechten Prognose beiträgt (3, 4).

Rezidiertes Ovarialkarzinom

Ein bedeutendes Problem stellt die hohe Rezidivrate des Ovarialkarzinoms dar. Etwa 22% der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom entwickeln innerhalb der ersten 6 Monate nach operativer Zytoreduktion ein Rezidiv, weitere 54% erleiden nach 6 Monaten einen Rückfall (5). Doch obwohl die Anzahl der betroffenen Patientinnen hoch ist, ist die Datenlage zur Biologie des rekurrenten Ovarialkarzinoms bislang schlecht.(6–8).

Prognostische Faktoren

Neben dem klinischen Stadium nach FIGO und den histologischen Subtypen, stellt der postoperative Tumorrest einen der wichtigsten prognostischen Faktoren des Ovarialkarzinoms dar (3, 9).

Neben klinischen Aspekten konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass auch die anti-tumorale Immunreaktion die Prognose des Ovarialkarzinoms maßgeblich beeinflusst und insbesondere die Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten (TILs) mit einem verlängerten Überleben assoziiert ist (10–12). Patientinnen mit einer hohen Anzahl von CD3+ und CD8+ TILs überlebten im Schnitt signifikant länger als Patientinnen mit wenig TILs, ebenso zeigte sich ein verlängertes progressionsfreies Überleben. Des Weiteren waren Tumore mit einer hohen TILs Dichte mit einem besseren Ansprechen auf Chemotherapie assoziiert, was möglicherweise ein Faktor der verbesserten Prognose sein könnte. Dies traf vor allem auf TILs zu, die in direktem Kontakt zum Tumorgewebe standen, nicht jedoch auf stromale Lymphozyten (10–13).

Wenig Informationen bezüglich prognostischer Faktoren existieren hingegen für das rezidierte Ovarialkarzinom, sodass bislang nur ein geringer klinischer Nutzen aus den vorhandenen Daten gezogen werden kann. Klinische Aspekte, wie die Zeit bis zum Auftreten des ersten Rezidivs und die Anzahl der Läsionen, werden als mögliche prognostische Faktoren für das rezidierte Ovarialkarzinom diskutiert (14), jedoch ist eine systematische Evaluation des intratumoralen Immuninfiltrats bislang ausgeblieben. Eine Operation ist aufgrund fortgeschrittener Erkrankung oft nicht mehr sinnvoll und die chirurgische Zytoreduktion wird typischerweise nur bei platin sensitiven Karzinomen empfohlen (8), sodass sich die Probengewinnung rezidivierender Tumore nach wie vor schwierig gestaltet.

Immuntherapie in der Krebsbehandlung

Dass ein erhöhtes intratumorales Immuninfiltrat mit verbessertem Überleben assoziiert ist, lässt vermuten, dass das Immunsystem dazu in der Lage ist, Krebszellen zu erkennen und zu attackieren, was wiederum einen Ansatzpunkt für moderne therapeutische Strategien darstellt. Immuncheckpoint-Inhibitoren finden bereits klinische Anwendung in der Behandlung multipler solider Tumore. So wurde beispielsweise bereits im Jahre 2010 erstmals eine Tumorregression und verlängertes

Überleben bei Patienten mit metastasiertem Melanom durch die Blockierung des immunregulatorischen cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) und die damit einhergehende verringerte Proliferationshemmung aktivierter T-Zellen mittels Ipilimumab beschrieben (15, 16). Studien über die mögliche Anwendung von Ipilimumab in der Behandlung des Ovarialkarzinoms haben bereits begonnen (17). Auch der adoptive Zelltransfer mit TILs als immunmodulatorischer Therapieansatz wurde im metastasiertem Melanom erfolgreich durchgeführt und zeigte bei bis zu 50% der Patienten eine Tumorregression (18). Nachfolgende Studien konnten auch beim Ovarialkarzinom eine Assoziation mit verlängertem Überleben beobachten (19). Jedoch existieren auch Mechanismen, durch die Tumorzellen dazu in der Lage sind eine gezielte Immunantwort zu umgehen. Diese sogenannten "Escape-Mechanismen" stellen einen kritischen Faktor in der Effektivität von Immuntherapien dar. Das auf nahezu allen kernhaltigen menschlichen Zellen exprimierte Major Histocompatibilitycomplex Klasse 1 (MHC1)-Molekül präsentiert intrazellulär synthetisierte Peptide, die sowohl körpereigen, als auch körperfremd (beispielsweise viral) sein können. In der Tumorimmunologie kann es so über die Präsentation tumoraler Peptide als Vermittler der zytotoxischen T-zellinduzierten Tumoreliminierung fungieren (20, 21). MHC2 wiederum findet sich vorrangig auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und ist in der Aktivierung von T-Helferzellen beteiligt. Die typischerweise hohe genetische Instabilität der Tumorzellen kann über gehäufte Mutationen zu veränderten Antigenvarianten führen, die sich einer Kontrolle des Immunsystems entziehen (22). Des Weiteren findet sich im Ovarialkarzinom und anderen malignen Tumoren häufig eine Störung der Antigenpräsentation selbst, insbesondere durch eine Herabregulation der MHC-Expression, und es kommt zu einer Störung der Aktivierung der anti-tumoralen Immunantwort (20, 21, 23). MHC1-negative Tumore neigen eher zu vermehrtem Wachstum und zur Metastasierung, während eine hohe Expression von sowohl MHC1 als auch MHC2 in einer Vielzahl von Studien mit verbessertem Outcome und Therapieansprechen assoziiert war (20, 21, 23–26).

Molekulare Besonderheiten des HGSOC und deren Einfluss auf die tumorale Immunogenität

Ovarialkarzinome sind bekannt für ihre hohe genomische intratumorale Vielfalt (27). Dennoch existieren einige Mutationen, die bevorzugt in spezifischen histologischen Subtypen des epithelialen Ovarialkarzinoms auftreten. So ist beispielsweise eine

Mutationen im Tumorsuppressorgen 53 (TP53) vor allem mit dem häufigen HGSOE-Subtypen assoziiert (28). Weiterhin zeigt das HGSOE häufig sporadische oder Keimbahnmutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und 2, die eine entscheidende Rolle in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielen (29). Patientinnen mit BRCA-mutiertem Ovarialkarzinom zeigen interessanterweise ein besseres Gesamtüberleben als Patientinnen mit dem BRCA-Wildtyp (28, 29). Es wird angenommen, dass ein Defekt in BRCA1/2 eine Hypersensibilität auf DNA-zerstörende Therapieansätze bedingt. Das passt zu den Beobachtungen, dass Mutationsträgerinnen besser auf platinhaltige Chemotherapeutika und bestimmte gezielte Therapieansätze, wie die Inhibierung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), ansprechen (29).

Das genomische Profiling ist ein Versuch diese genomische Vielfalt zu verstehen und zu kategorisieren. Tothill et al. untersuchten zu diesem Zweck 285 seröse und endometroide Ovarialkarzinome und teilten sie bezüglich ihres Genexpressionsprofils in sechs Subtypen ein. Ein signifikanter Unterschied ergab sich zwischen low-grade und high-grade serösen Karzinomen, des Weiteren waren die Subtypen mit unterschiedlichen Wachstumsmustern (wie Tumor-Stroma-Verhältnis) sowie mit einer unterschiedlichen Prognose assoziiert. Auch die Anzahl der TILs variierte zwischen den Gruppen, wobei höhere TILs Zahlen mit einem verbesserten Gesamt- und progressionsfreien Überleben korrelierten. Dies galt nicht für überwiegend stromale TILs und fügt die Ergebnisse damit in den bisherigen wissenschaftlichen Kontext ein (30). Dass sich die Subgruppen im Hinblick auf die Anzahl der TILs signifikant voneinander unterscheiden, legt die Vermutung nahe, dass die Genexpression einen Einfluss auf die Immunogenität eines Tumors haben könnte. Ebenso scheint die TILs Anzahl in Abhängigkeit einer durchgeführten Chemotherapien zu fluktuieren (31).

Intratumorale Heterogenität

Variable intratumorale Mutationen sind eine mögliche Ursache für das häufige Therapieversagen und die schlechte Prognose des Ovarialkarzinoms und stellen die Forschung vor eine große Herausforderung. Ergebnisse früherer Studien weisen darauf hin, dass es sich bei einem Tumor nicht um eine homogene Einheit, sondern viel eher um einen einzigartigen Komplex aus unterschiedlichen Klonen mit variablen Mutationen handelt. Multiple Biopsien desselben Tumors können ein unterschiedliches Mutationsprofil aufweisen, sodass eine einzelne Biopsie möglicherweise ein falsches

Bild über die Tumorzusammensetzung entstehen lässt und so ein adäquates Therapiemanagement erschwert (27, 32, 33). Es wird angenommen, dass die hohe Diversität das Resultat sowohl genetischer, als auch umweltbedingter Einflüsse ist. Genomische Instabilität, die häufig in malignen Zellen beobachtet werden kann, führt zu einer erhöhten Mutationsrate, die vor allem im zeitlichen Verlauf, mit der zunehmenden Anzahl an abgelaufenen Proliferationszyklen, ansteigt. Des Weiteren beeinflusst möglicherweise der daraus resultierende darwinische Selektionsdruck ebenfalls die klonale Diversität. Dass verschiedene Subklone innerhalb einer Region koexistieren können, legt jedoch auch nahe, dass nicht jede Mutation zwingend von klinischer Bedeutung ist. Abgesehen von genetischen Faktoren unterliegt das tumorale Mikromilieu vor allem im Laufe der Tumorprogression nicht derselben Ordnung, wie physiologisches Gewebe: So kann es vorkommen, dass eine einzelne Zelle einer Vielzahl sehr unterschiedlicher Umwelteinflüsse ausgesetzt ist. Beispielsweise können unstrukturierte und zum Teil insuffiziente Neovaskularisationen zu einem inkonstanten Angebot an Nährstoffen und Sauerstoff, mitunter auch zu passagerer Hypoxie, führen, was eine vermehrte phänotypische Heterogenität zur Folge haben könnte. Eine solche Variabilität in der Perfusion könnte außerdem zu einer ungleichen intratumoralen Verteilung von Medikamenten führen, sodass in einigen Tumorregionen keine therapeutische Dosis erreicht wird und so eine Resistenzentwicklung begünstigt werden könnte (32).

Multiple Ansätze für gezielte Therapien existieren bereits, jedoch gestaltet sich die Behandlung eines solch dynamischen Systems nach wie vor schwierig.

Bewertung tumorinfiltrierender Lymphozyten

Obwohl die Quantifizierung von TILs in soliden Tumoren bereits in vielen Studien Anwendung gefunden hat (10–12), hat sich bislang keine Methode als Standard etabliert. Limitierend ist, dass die manuelle TILs Auszählung durch einen Pathologen sowohl zeitaufwendig ist, als auch Raum für individuelle Abweichungen zwischen verschiedenen Auswertern bietet, sodass eine routinemäßige Anwendung im klinischen Alltag bislang problematisch ist (34). Eine automatische Quantifizierung könnte mit geringerem Arbeitsaufwand reproduzierbare Daten liefern. In dieser Arbeit wurde eine neue automatische TILs Quantifizierungssoftware verwendet.

Ziel unserer Studie

Das Ziel unserer Arbeit war die Analyse der anti-tumoralen Immunreaktion während der Progression des high-grade serösen Ovarialkarzinoms. Wir nahmen an, dass sich das Immuninfiltrat, ähnlich wie das genetische Tumorprofil, im zeitlichen Verlauf heterogen entwickeln würde. Ähnlich wie im Primärtumor, erwarteten wir auch im Rezidiv einen Zusammenhang zwischen der anti-tumoralen Immunantwort und dem progressionsfreien Überleben. Um diese Hypothesen zu überprüfen, untersuchten wir gepaarte primäre und rezidierte HGSOCS. Des Weiteren sollte die Validität einer neuen automatischen TILs Quantifizierungsmethode geprüft werden. Hierfür entwickelten wir folgende Zielsetzung:

1. Quantifizierung intratumoraler T-Zell-Subpopulationen (CD3+, CD4+, CD8+ TILs)
2. Vergleich automatisch und manuell ermittelter intratumoraler Lymphozytenzahlen
3. Expressionsanalyse von MHC1 und MHC2
4. Überlebensanalyse nach stattgehabtem Rezidiv (PFS2)

3.2 Methodik**Kohorte**

Alle Patientinnen waren Teil des OCTIPS-Projekts (Ovarian Cancer Therapy – Innovative Models Prolong Survival), das durch das Seventh Framework Programm der europäischen Kommission gefördert wurde (Finanzhilfvereinbarungsnummer 279113-2). Ziel des OCTIPS-Projektes war die Untersuchung molekularer Charakteristika des rezidierten Ovarialkarzinoms sowie die Entwicklung innovativer Therapieansätze (www.octips.eu). Die Genehmigungen der Ethikkommissionen aller Projektpartner waren gegeben (EK207/2003, ML2524, 05/Q0406/178, EK366/2003, EK260/2003, 06/S1101/16).

Für unsere Studie evaluierten wir formalinfixierte, paraffineingebettete (FFPE) Gewebeproben von insgesamt 158 Patientinnen. Nur Patientinnen mit gepaarten Proben von primärem und rezidiertem Ovarialkarzinom konnten eingeschlossen werden, 21 Fälle konnten aufgrund fehlender Paare nicht berücksichtigt werden. Weitere Ausschlusskriterien waren Tumore mit anderen histologischen Subtypen als

dem HGSOE (n=14) und nicht-chemo-naive Proben, also Patientinnen, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten (n=12). Letztendlich konnten in die Studie 113 Patientinnen eingeschlossen werden: Ein Großteil der Proben stammt aus dem Charité Universitätsklinikum Berlin, Deutschland (n=67), weitere Fälle konnten über das Universitätsklinikum Leuven, Belgien (n=20), die Universität von Edinburgh, Vereinigtes Königreich (n=16) und das London Imperial College of Science, Vereinigtes Königreich (n=10) rekrutiert werden. Proben des ersten Rezidivs lagen in den meisten Fällen vor (86,7%), seltener konnten lediglich spätere Rezidive evaluiert werden. Die Probenakquisition erfolgte im Zeitraum von 1985 bis 2015. Daten zum FIGO-Stadium bei Erstdiagnose und für 53 Patienten bezüglich des BRCA-Status (Keimbahn und tumoral) erhielten wir aus der Datenbank des OCTIPS-Projekts. Als "platin sensitiv" und "platin resistent" bezeichneten wir Rezidive, die jeweils nach oder innerhalb von sechs Monaten nach Abschluss der Chemotherapie auftraten, entsprechend der Definition der Gynecologic Cancer Intergroup (GCIIG) (35). Ein Rezidiv wurde nach den Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) definiert (36).

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde an Tissue Microarrays (TMAs) mit einem Ventana Discovery XT Autostainer (Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, Arizona) durchgeführt. Für jeden Fall wurden zwei Tumorstanzen mit einem jeweiligen Durchmesser von 1 mm evaluiert. Es wurden folgende Antikörper verwendet: CD3 (1:200, Dako Denmark A/S, Ref. No. A0452), CD4 (1:50, Zytomed, Ref. No. 503-3354), CD8 (1:25, Dako/Denmark, Ref. No. M7103), MHC Klasse 1 (HLA-A, B, C) (1:6.000, Dako/Denmark A/S, Ref. No. D-226-3), und MHC Klasse 2 (1:200, MBL, Ref. No. M0746). Diaminobenzidin wurde als Chromogen verwendet. Die Antikörperdetektion und Gegenfärbung wurden jeweils gemäß den Herstellerprotokollen durchgeführt.

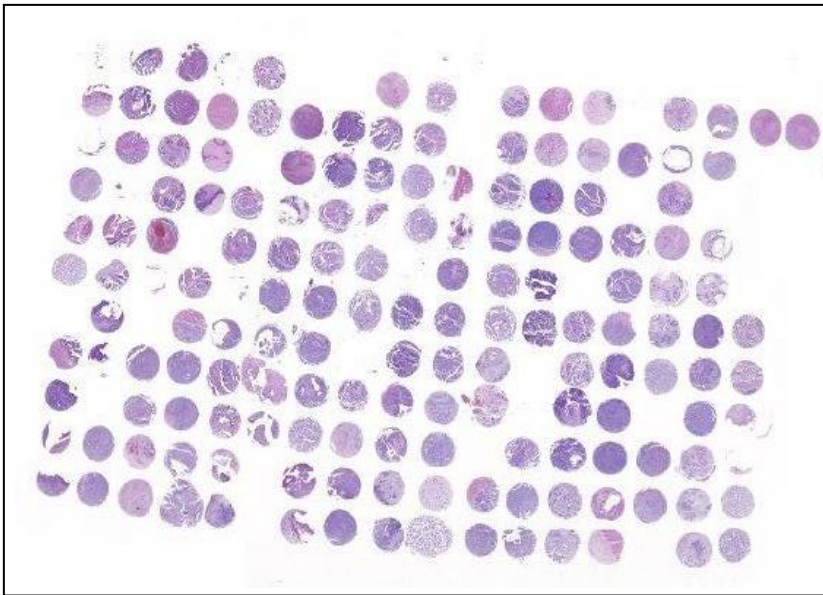


Abbildung 1: Digitalisiertes Tissue Micro Array (TMA) nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

TILs Evaluation

Die TILs Quantifizierung erfolgte durch eine neue, automatisierte Analysesoftware (CD3 Quantifier), die von VM Scope (Berlin, Deutschland) entwickelt und zur Verfügung gestellt wurde. Von jedem Fall wurden mithilfe der bereits etablierten VM Slide Explorer 2.2 Software (VM Scope) je fünf Tumorfelder in 400-facher Vergrößerung (=high power field) an gescannten Objektträgern manuell ausgewählt und fotografiert. Dabei bevorzugten wir Areale mit einer hohen TILs Dichte. In den high power fields erfolgte dann die Abgrenzung zwischen tumoralen und nicht-tumoralen Arealen (wie beispielsweise Stroma oder Nekrosen). Dies war zum Zeitpunkt der Studiendurchführung noch nicht automatisiert möglich, sodass eine visuelle Diskriminierung mit entsprechender Annotation unter Verwendung der ROI Manager Bildanalysesoftware (CognitionMaster, VM Scope) durchgeführt wurde. Anhand dieser Daten errechnete der ROI Manager den Gesamtumoranteil für jede digitale Mikrofotografie. Im Anschluss erfolgte dann die automatisierte Zählung der immunhistochemisch gefärbten TILs unter Verwendung der neuen CD3 Quantifier Bildanalysesoftware (VM Scope). Dabei konnte zwischen intratumoralen TILs, also TILs, die in direktem Kontakt zu tumoralen Gewebe standen, und extratumoralen TILs unterschieden werden. In der finalen Evaluation wurden nur intratumorale TILs berücksichtigt. Mithilfe der absoluten Zahlen für CD3+, CD4+ und CD8+ TILs wurde die TILs Dichte in TILs/mm² Tumorfläche errechnet. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Cut-off Werte, die bezüglich der TILs Dichte von prognostischer und

damit biologischer Bedeutung waren, eher im unteren Bereich lagen (37). Dementsprechend wählten wir auch für diese Studie einen niedrigen Cut-off (25% Perzentile der TILs Anzahl im Primärtumor), um die Fälle in zwei Gruppen mit geringer und hoher TILs Dichte einzuordnen (es ergaben sich hieraus folgende Einteilungen: CD3+ TILs: niedrige Werte 0-85, hohe Werte >85; CD4+ TILs: niedrige Werte 0-20, hohe Werte >20 und CD8+ TILs: niedrige Werte 0-51, hohe Werte >51). In einer vergangenen Studie unserer Arbeitsgruppe wurden die TILs auf ähnliche Weise bewertet, hier wurden die TILs jedoch nicht durch die CD3 Quantifier Software, sondern durch einen erfahrenen Pathologen identifiziert und markiert.

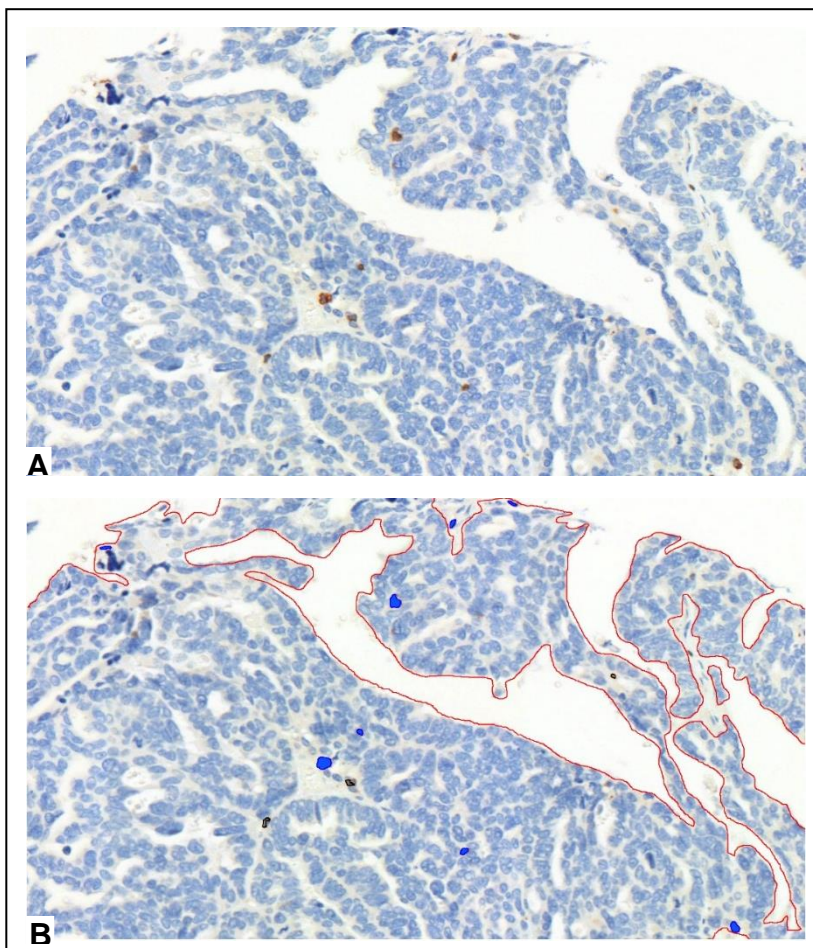


Abbildung 2: A) High power field mit gefärbten CD3+ TILs. B) High power field nach manueller Markierung tumoraler Areale (rote Markierung) mittels ROI Manager Bildanalysesoftware und automatischer Lymphozytenerkennung durch die CD3 Quantifier Bildanalysesoftware (blau = TILs, schwarz = TILs-Fragmente). Zur besseren Erkennbarkeit wurden die automatisch generierten Markierungen mit Photoshop CS5 (V12.0 Adobe Systems Incorporated) verstärkt.

Validierung der automatisierten TILs Evaluation

Um sicherzugehen, dass die automatische TILs Erkennung ebenso zuverlässig wie die manuelle Zählung ist, führten wir verschiedene Vergleichsanalysen durch: In einer Subgruppenanalyse der Fälle aus dem Charité Universitätsklinikum Berlin erfolgte die Zählung der CD3+ und CD4+ TILs sowohl manuell als auch automatisch und es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen beiden Methoden (für exakte Daten siehe Abbildung 3). Für die Untersuchung der rekurrenten Tumore wurden nur Erstrezidive berücksichtigt. Des Weiteren zeigte eine frühere Substudie unserer Arbeitsgruppe, in der TILs in n=209 HGSOE sowohl manuell als auch automatisch gezählt wurden, ein ähnliches Ergebnis (Spearman's rho 0,850, P<0,0001); auch wenn die automatische Zählung zu höheren Werten führte, da hier auch TILs Fragmente mitgezählt wurden (Daten nicht publiziert). Die Ergebnisse unserer Vergleichsanalysen trugen zudem zur Validierung und Weiterentwicklung der CD3 Quantifier Bildanalysesoftware bei.

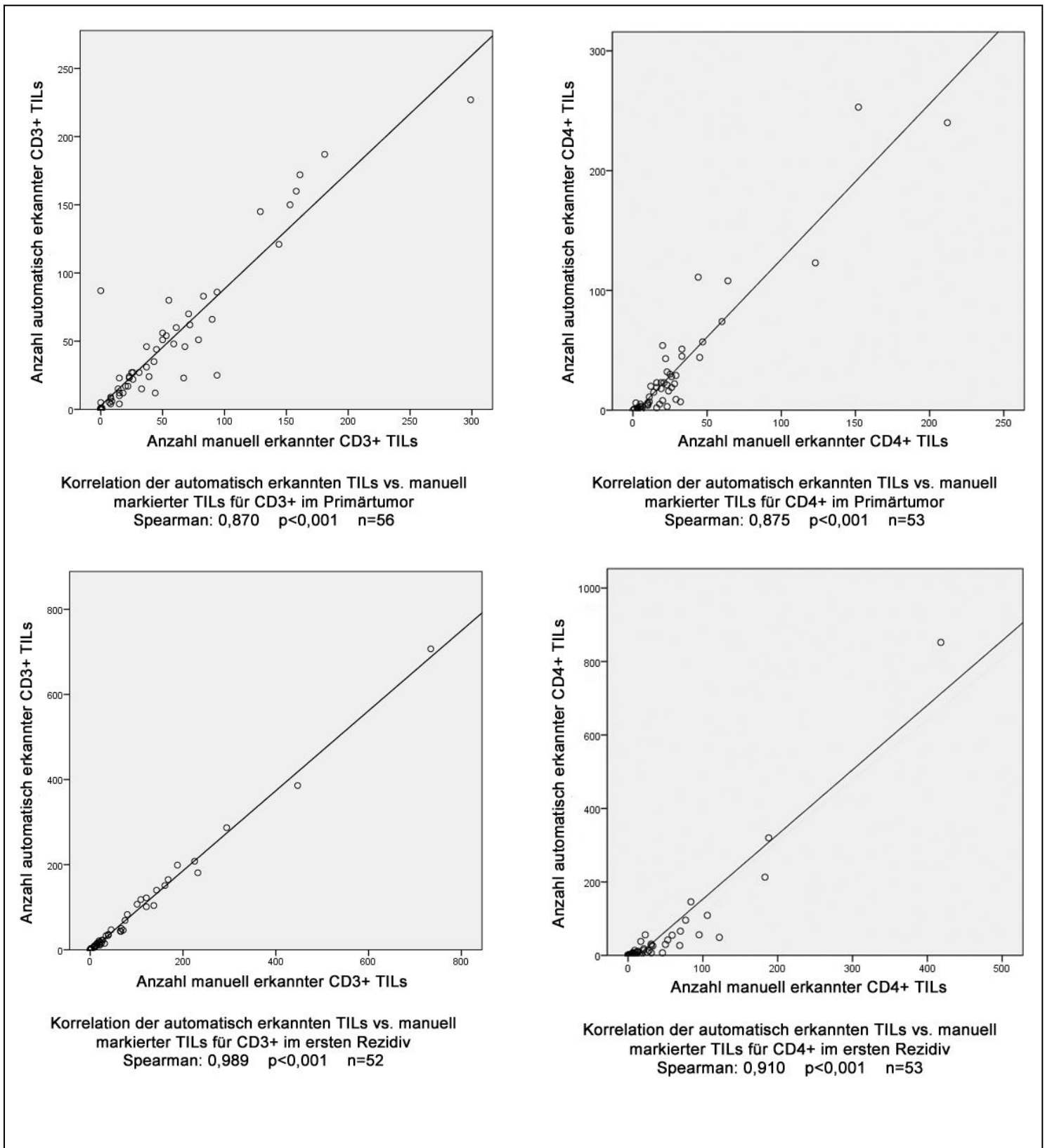


Abbildung 3: Korrelation der automatisch erkannten TILs mittels CD3 Quantifier Software mit manuell markierten TILs für **A)** CD3+ TILs im Primärtumor **B)** CD4+ TILs im Primärtumor **C)** CD3+ TILs im Rezidivtumor **D)** CD4+ TILs im Rezidivtumor

Für die Evaluation der Expression von MHC1 und MHC2 in Tumorzellen wurde der VM Slide Explorer 2.2 und der VM TMA Evaluator (VM Scope) verwendet: Je zwei Tumorstanzen pro Fall wurden visuell bewertet und bezüglich des Anteils der gefärbten Tumorzellen [0% (0 Punkte), 1%-10% (1 Punkt), 11%-50% (2 Punkte), 51%-80% (3 Punkte), 81%-100% (4 Punkte)] und der Intensität der Färbung [negativ (0 Punkte), schwach (1 Punkt), moderat (2 Punkte) und stark (3 Punkte)] kategorisiert. Durch Multiplikation der Scores für Anzahl und Intensität errechneten wir den semiquantitativen Immunoreactivity Score (IRS). Für die statistische Analyse wurden die Fälle in zwei Gruppen eingeteilt: niedriger IRS und hoher IRS. Den Cut-off wählten wir, ähnlich wie bei den TILs, niedrig (IRS0-2 vs. IRS3-12).

Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mithilfe des Programms SPSS (v23.0.0.2, IBM, Armonk, NY) und GraphPad Prism (v5, La Jolla, CA). Für die Korrelation zwischen zwei Variablen verwendeten wir den Spearman Rang Test. Aufgrund der großen Streuung der TILs Anzahlen, die vor allem die hohen Werte betraf (positive Verzerrung der Verteilung), verwendeten wir für einige Berechnungen auch den lg10 für die TILs Dichte. Assoziationen zwischen gepaarten Proben wurden mithilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests durchgeführt, der Vergleich von Gruppen erfolgte mittels Pearson's χ^2 (exakter Test nach Fisher) oder Mann-Whitney-Test. Für Überlebensanalysen wurde die Kaplan-Meyer-Methode mit Log-Rank-Test verwendet. Als statistisch signifikant wurden P-Werte $<0,05$ bei zweiseitigem Test angesehen.

3.3 Ergebnisse

TILs-Dichte und MHC-Expressionsmuster

Alle Subgruppen (CD3+, CD4+, CD8+ TILs) konnten sowohl in Primär, als auch in Rezidivtumoren gefunden werden. Daten für die CD3+ TILs Anzahl war für $n=97$ Tumorpaaire verfügbar, der Median lag im Primärtumor bei 158/mm² und im Rezidiv bei 247/mm². Für CD4+ TILs konnten $n=100$ Paare einbezogen werden, der Median lag im Primärtumor bei 82/mm² und bei 153/mm² im Rezidiv. Der Median der CD8+ TILs lag für $n=98$ Paare bei 122/mm² im Primärtumor und 144/mm² im Rezidiv.

Sowohl MHC1 als auch MHC2 wurden in Tumorzellen exprimiert. Für MHC1 lagen Daten für $n=104$ Paare vor, für MHC2 $n=102$. Die MHC1 Expression war in den meisten Fällen stark ausgeprägt und am häufigsten mit einem IRS von 12 (sowohl im Primär- als auch im Rezidivtumor) bewertet, keine Probe war komplett negativ. Ebenso konnten wir in den meisten Proben eine tumorale MHC2 Expression nachweisen, wenn auch schwächer ausgeprägt als bei MHC1. Der häufigste IRS war 2. 16 Proben (15,7%) waren im Primarius komplett negativ (IRS 0), im Rezidiv waren es 17 Proben (16,7%).

Der Spearman Test zeigte eine positive Korrelation zwischen allen untersuchten immunologischen Faktoren, sowohl im Primär- als auch im Rezidivtumor.

Entwicklung der TILs Dichte und MHC-Expression in der Tumorprogression

Alle TILs Subgruppen korrelierten zwischen Primär- und Rezidivtumor moderat, aber signifikant (CD3: Spearman rho 0.427, $P<.0001$, CD4: Spearman rho 0.533, $P<.0001$, CD8: Spearman rho 0.361, $P<.0001$). Mittels Wilcoxon Test erfolgte die Analyse der gepaarten Proben und es zeigte sich, dass die CD4+ TILs Anzahlen im Rezidivtumor häufig höher waren, als die im zugehörigen primären Tumor ($P=0,034$). Auch für CD3+ ließ sich ein ähnlicher Trend erkennen, wenn auch nicht signifikant ($P=0,077$).

Im Vergleich der kategorisierten Daten (niedrige und hohe TILs Anzahlen) zeigte der Fisher Test eine signifikante Assoziation zwischen den CD4+ TILs Dichten in Primär- und Rezidivtumor ($P=0,006$). Fälle mit hohen TILs Zahlen im Primarius hatten auch im Rezidiv eher hohe TILs Werte (88% hatten sowohl im Primär-, als auch im Rezidivtumor hohe TILs Dichten). Im Gegensatz dazu zeigten Fälle mit primär niedrigen TILs Dichten im Rezidiv teils niedrige (40%), in der Mehrheit (60%) jedoch hohe TILs Dichten. Ähnliches zeigte sich für CD3+ TILs mit grenzwertiger Signifikanz ($P=0,059$). 79.5% der Fälle hatten im Primär- und auch im Rezidivtumor eine hohe TILs Dichte, jedoch wiesen 58.3% der Fälle mit primär niedrigen TILs Dichten im Rezidiv höhere TILs Dichten auf. Für die CD8+ TILs Kategorien konnte dieser Sachverhalt lediglich als Trend beobachtet werden ($P=0,122$).

Die MHC1 und MHC2 IRS Werte der Primärtumore korrelierten signifikant mit den IRS Werten der zugehörigen Rezidivtumore (MHC1: Spearman rho 0.456, $P<.0001$, und MHC2: Spearman rho 0.526, $P<.0001$). Ähnlich wie die TILs Dichte, zeigte die MHC1

Expression der Paare im Wilcoxon Test eine gerichtete Verschiebung zu höheren Werten vom Primär- zum Rezidivtumor ($P=0,018$).

Nach Kategorisierung der Daten zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen der MHC1-Expression in Primär- und Rezidivtumoren (*Fisher Test* war nicht signifikant, $P=0,262$); sowohl Tumore mit primär hohen als auch mit primär niedrigen MHC1-Expressionslevels tendierten im Rezidiv zur hohen Expressionskategorie.

Im Gegensatz dazu war der MHC2 Status im Primärtumor stark mit demselben Expressionsstatus im Rezidiv korreliert: Primärtumore mit geringer MHC2 Expression hatten auch im Rezidiv eher geringere IRS Werte, während Fälle mit primär hohem IRS Werte auch im Rezidiv zu hohen IRS Werten tendierten. Die beiden Kategorien, niedrige und hohe MHC2 Expression, blieben also während der Tumorprogression eher stabil ($P<0,001$).

Betrachteten wir für die Evaluation sowohl der TILs Dichte als auch der MHC Expression nur Tumorpaare, von denen uns Gewebe des ersten Rezidivs zur Verfügung stand (diese könnten als homogenere Gruppe erachtet werden), ergaben sich noch signifikantere Werte.

Stratifizierung unter Betrachtung des BRCA Status

Des Weiteren teilten wir die Fälle bezüglich des Keimbahn- und tumoralen BRCA Status in zwei Gruppen ein: Tumore mit dem BRCA Wildtyp ($BRCA_{wt}$) und Tumore mit Mutation des BRCA Gens ($BRCA_{mt}$). $BRCA_{mt}$ Primärtumore zeigten im Vergleich zu $BRCA_{wt}$ Primärtumoren einen Trend zu höheren Expressionsleveln für MHC1 und MHC2 (grenzwertige Signifikanz für MHC1: $P=0,055$ und MHC2: $P=0,056$). $BRCA_{mt}$ Rezidive (nur erste Rezidive) hatten eine signifikant höhere MHC1 Expression als $BRCA_{wt}$ Rezidive ($P=0,024$).

Prognostischer Effekt der TILs Dichte und MHC Expression

Auch in unserer Kohorte zeigte sich die zuvor beschriebene Assoziation zwischen CD3+ und CD8+ TILs Dichte und längerem progressionsfreien Überleben nach Erstdiagnose (PFS1) (10–12).

Für die Untersuchung des progressionsfreien Überlebens nach dem ersten Rezidiv (PFS2) standen Daten von $n=74$ Tumorpaaren zur Verfügung. Wir fanden eine Assoziation zwischen der MHC2 Expression und dem PFS2: Patientinnen mit geringer

MHC2 Expression hatten eine mittlere Überlebenszeit von 9,0 Monaten (Standardfehler 0,9) im Gegensatz zu Patientinnen mit hohen MHC2 IRS Werten, die im Durchschnitt 12,0 Monate progressionsfrei überlebten (Standardfehler 0,24; $n=68$, $P=0,019$). Für die Dichte der CD3+, CD4+ und CD8+ TILs sowie für MHC1 ergab sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem PFS2.

3.4 Diskussion

Einleitung

Unsere Arbeit zeigte, dass die anti-tumorale Immunantwort des primären Ovarialkarzinoms mit der des Rezidivs korreliert. Darüber hinaus fanden wir in einem Teil der Tumoren Hinweise auf eine Tendenz zur verstärkten Immunantwort im Rezidiv im Vergleich zum Primarius.

Wie bereits in früheren Studien von unserer Arbeitsgruppe und von anderen Autoren, die sich mit der Immunogenität des HGSOE beschäftigt haben (10, 11, 25, 37), fanden wir auch in unserer Kohorte eine starke Korrelation aller immunologischer Faktoren untereinander.

Methodik

Erkenntnisse über die Immunogenität von Ovarialkarzinomen stellen die Basis neuer therapeutischer Optionen dar, doch die Evaluation der anti-tumoralen Immuninfiltration ist noch immer zeitaufwendig und unterliegt, je nach Zeitpunkt und auswertendem Pathologen, Schwankungen. Unsere Arbeit zeigt, dass eine automatisierte Erfassung von Lymphozyten und deren Einteilung in intratumoral und stromal möglich und anwendbar ist. Der Bezug auf ausschließlich intraepitheliale TILs und deren Normalisierung auf die Tumorfläche erlaubte uns eine besonders genaue Bestimmung der TILs Dichte. Möglicherweise half uns die konstante und reproduzierbare Auswertung sogar dabei, aus einem eher kleinen Patientenkollektiv signifikante Ergebnisse zu erbringen. Dennoch ist zu beachten, dass trotz automatisierter TILs Quantifizierung noch immer eine manuelle Diskriminierung zwischen tumoralen und nicht-tumoralen Arealen nötig ist, die Raum für Abweichungen lässt.

Heterogenität versus Homogenität

Ovarialkarzinome zeichnen sich durch ihre hohe genomische Vielfalt aus (27). Diese intratumorale Heterogenität zeigt sich sowohl spatial als auch im temporären Verlauf (27, 32, 33), interessanterweise spiegelt sie sich jedoch nicht in der tumoralen Immunogenität wider. Im Gegenteil, bisherige Studien zeigten viel mehr eine homogene T-Zellantwort für CD3+ TILs im Ovarialkarzinom und für CD3+ und CD8+ TILs im Mammakarzinom über verschiedene Tumorareale hinweg (38). Daraus kann geschlossen werden, dass für die Untersuchung der Tumorummunogenität, z.B. in Studien eine einzelne Biopsie ausreichend ist, um ein repräsentatives Bild der TILs Infiltration des gesamten Tumors zu erhalten. Eine Forschungsgruppe konnte außerdem zeigen, dass sich TILs hinsichtlich ihrer Rezeptoren (T-Cell Receptor β , TCRB) innerhalb eines Tumors wenig, jedoch von peripheren Lymphozyten im Blut deutlich unterschieden (39). Dies legt die Vermutung auf eine tumorspezifische Immunantwort nahe, die möglicherweise einen potentiellen Ansatzpunkt für Immuntherapeutika darstellt. Unsere Arbeit zeigte zudem, dass große Fluktuationen der TILs Dichte auch im zeitlichen Verlauf eher untypisch zu sein scheinen. Erstaunlicherweise und entgegen unserer Hypothese war trotz der oft großen Zeitspanne zwischen Primär- und Rezidivtumor eine signifikante Korrelation der Immunantwort in den Tumorpaaren zu erkennen.

Tothill et al. unternahmen den Versuch, die genomische Vielfalt der Ovarialkarzinome in molekulare Subtypen zu unterteilen und fanden einen Zusammenhang zwischen genetischen Expressionsmustern und der TILs Infiltration (30). Die Frage, weshalb die genomische intratumorale Heterogenität der HGSOCS so hoch ist, während die intratumorale Heterogenität des Immuninfiltrats jedoch gering ist, bleibt bislang unbeantwortet. Jedoch konnten in der Vergangenheit bereits klassische Mutationen (beispielsweise im p53-Gen) identifiziert werden, die sich in nahezu allen Subklonen innerhalb eines Patienten finden. Die intratumorale genomische Heterogenität wird hingegen eher von einzigartigen Mutationen begründet, die in jedem Subklon individuell entstehen (40), aber eventuell einen nur einen geringen Einfluss auf die anti-tumorale Immunogenität haben. Möglicherweise ist die anti-tumorale Immunreaktion also von einer grundlegenden und über den Verlauf der Tumorprogression relativ stabilen genomischen Konstitution abhängig und bleibt deshalb im Laufe der Tumorprogression ebenfalls stabil. Obwohl zur Erforschung des Immunverhaltens in der Tumorprogression bereits Untersuchungen an fortgeschrittenen

Ovarialkarzinomen durchgeführt wurden, bleibt die Datenlage für rezidierte Ovarialkarzinome bislang schwach und es existiert unseres Wissens keine Studie, die vor uns die Dynamik des Immuninfiltrats in der Progression vom primären zum rezidierten Ovarialkarzinom untersuchte.

In unserer Arbeit ergaben sich Hinweise auf eine erhöhte Expression einiger Immunfaktoren im rezidierten Tumor. Nach Dichotomisierung unserer Daten in Gruppen mit niedriger und hoher TILs Dichte zeigte sich im zeitlichen Verlauf folgende Entwicklung: Tumore mit primär hoher TILs Dichte neigten auch im Rezidiv zu hohen TILs Werten und blieben in ihrer Immunogenität in der Progression eher stabil. Im Gegensatz dazu hatten Tumore, die primär geringe TILs Dichten aufwiesen, eine erhöhte Chance auf einen Wechsel zu höheren Infiltrationswerten im Rezidiv. Signifikant wurden diese Ergebnisse für die CD4+ TIL Subpopulation. Für CD3+ TILs ließ sich ein ähnlicher Trend erkennen. Bei Betrachtung einer homogeneren Studiengruppe, wie nur Paare mit vorliegendem Erstrezidiv oder nur platin-sensitive Tumore, wurde die Verschiebung zu höheren TILs Werten im Rezidiv auch für CD3+ TILs ebenfalls signifikant und präsentierte sich für CD4+ TILs sogar noch deutlicher als zuvor.

Die MHC2-Expression präsentierte sich in der Tumorprogression eher stabil, während MHC1, ähnlich wie die TILs Infiltration, eine Tendenz zu höheren Expressionsleveln im Rezidiv zeigte. Im Gegensatz hierzu berichten zurückliegende Studien vermehrt über eine partielle oder komplette Herabregulation der MHC1 Expression in der Tumorprogression als Mechanismus zur Umgehung der adaptiven Immunantwort (20, 21, 23–26). Dies führte uns zu der primären Annahme, dass auch in Tumorrezidiven im Rahmen eines solchen Escape-Mechanismus eine verminderte Expression zu beobachten sein würde. Eine solche konnten wir in unserer Studie jedoch nicht bestätigen. Stattdessen zeigte sich nach Dichotomisierung der Daten, unabhängig davon, ob der Primärtumor eine niedrige oder hohe MHC1 Expression aufwies, eine Verschiebung zu höheren Werten im rekurrenten Partner.

Eine erhöhte Immunogenität über den Verlauf der Tumorprogression konnte auch in anderen Studien gezeigt werden. In einer kürzlich publizierten Arbeit, die Tumore vor und nach neoadjuvanter Chemotherapie (NACT) untersuchte, konnte eine Verschiebung zu höheren TILs-Zahlen und einer höheren PD-L1-Expression nach NACT gezeigt werden, die möglicherweise durch die Chemotherapie induziert war.

Diese Tendenz konnte, anders als in unserer Kohorte, jedoch nicht für die Expression von MHC1 festgestellt werden (31). Dabei ist als wesentlicher Unterschied zwischen unserer und der vorangegangenen Studien zu beachten, dass die Probenentnahme unmittelbar nach der Chemotherapie aus dem Residualtumor erfolgte und nicht, wie in unserer Arbeit, aus dem Tumorrezidiv, das zum Teil erst Monate bis Jahre nach dem Primarius auftrat. Es ist unklar, ob den ähnlichen Beobachtungen auch dieselben Mechanismen zugrunde liegen.

Für eine gesteigerte Immunogenität in der Tumorprogression gibt es bislang keine eindeutige Erklärung, jedoch könnte das Immunsystem über Gedächtniszellen einen rekurrenten Tumor wiedererkennen und entsprechend darauf reagieren (17). Möglicherweise handelt es sich bei den CD4+ T-Zellen, die im Gewebe detektiert wurden, auch hauptsächlich um regulatorische Zellen, die eine anti-tumorale Immunantwort inhibieren. Dazu würde passen, dass wir im Rezidiv keine gesteigerte Aktivität von zytotoxischen CD8+ TILs fanden.

Obwohl eine erhöhte TILs Dichte im Ovarialkarzinom mit einem verbesserten Überleben assoziiert ist (10–12) und unsere und frühere Studien eine Tendenz zu höheren Infiltrationsmustern im Rezidiv nahelegen, ist die Prognose des rezidierten Ovarialkarzinoms schlecht (7, 8). Bislang gibt es kaum Kohorten, aus denen Daten zum prognostischen Effekt der Immunogenität auf das PFS2, also die progressionsfreie Zeit nach dem ersten Rezidiv, gezogen werden können. Unsere Studie zeigte, dass die Immunfaktoren ihren prognostischen Wert für das PFS2 größtenteils verloren. Lediglich eine erhöhte MHC2 Expression war mit einem besseren PFS2 assoziiert, allerdings muss dieses Ergebnis aufgrund der geringen Fallzahl (n=68) kritisch betrachtet werden. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit fand zusätzlich einen Zusammenhang zwischen einem kürzeren PFS2 und einer geringen Anzahl an FOXP3+ regulatorischen T-Zellen, jedoch konnte auch hier nur eine geringe Fallzahl untersucht werden. Es konnte auch in dieser Arbeit keine Assoziation zwischen CD8+ TILs und PFS2 gezeigt werden. Ähnlich wie wir, fand man im Rezidiv höhere TILs Werte als im Primärtumor (41).

Zusammenfassend betrachtet, führen uns diese Ergebnisse zu der Hypothese, dass eine erhöhte anti-tumorale Immunantwort im Rezidiv nicht unbedingt effektiv sein und zu einer besseren Prognose führen muss. Frühere Untersuchungen zeigten, dass eine persistierende Antigenexposition, wie sie im Rahmen von Tumor-, aber auch

Viruserkrankungen auftritt, einen progressiven Verlust der T-Zell Funktion bedingen kann (T-Zell Erschöpfung) (42). Die anhaltende Stimulation durch tumorale Antigene führt in CD8+ T-Zellen sowohl zu einer verminderten Zytokinfreisetzung als auch zur vermehrten Expression inhibitorischer Rezeptoren (beispielsweise CTLA4) und verhindert so eine adäquate Immunantwort. Dass sich die Blockade des immunmodulatorischen CTLA-4 mittels Ipilimumab im metastasierten Melanom und anderen Tumoren in der Vergangenheit als effektiv erwiesen hat, weist möglicherweise auf eine Erholung der "erschöpften" T-Zellen durch die Immuntherapie hin (15, 16, 42).

Limitationen

Durch die ausschließliche Auswertung von Tumorknoten konnten wir lediglich eine geringe Fallzahl von $n=113$ in unsere Untersuchung einschließen, was sich vor allem in den Subgruppenanalysen bemerkbar machte. Eine Ausweitung der Untersuchung auf eine größere Anzahl von Probandinnen könnte weitere interessante Hinweise, wie beispielsweise eine Assoziation zwischen dem BRCA-Status und der Entwicklung der anti-tumoralen Immunantwort, geben, die wir in unserer Kohorte möglicherweise nicht erfassen konnten. Durch unser neues Studiendesign sind wir zwar die ersten, die die Immunogenität in gepaarten Tumorproben untersucht haben, jedoch existieren deshalb auch noch kaum unabhängige Validierungskohorten. Bislang stehen noch immer nur wenig Daten zum rezidierten Ovarialkarzinom zur Verfügung, da sich die Probengewinnung aufgrund der nur selten durchgeführten Biopsien und Operationen schwierig gestaltet (6–8). Dadurch, dass die Immuntherapie in der Krebsbehandlung und auch die Tumorerheterogenität in den letzten Jahren mehr in den Fokus der Forschung gerückt ist, ist jedoch mit einer Verbesserung der Datenlage in naher Zukunft durchaus zu rechnen. Unter anderem sind beispielsweise unter dem europaweiten Förderprogramm Aligning national/regional translational cancer research programmes and activities (ERA-NET TRANSCAN-2) diesbezüglich neue Ergebnisse zu erwarten.

Auch wenn die Beobachtung, dass die Immunfaktoren selbst dann untereinander korrelieren, wenn zwischen dem Primär- und Rezidivtumor mehrere Jahre liegen, durchaus interessant ist, stellt diese große Zeitspanne gleichzeitig eine wichtige Limitation dar. Es ist unklar, welche weiteren Einflüsse (wie beispielsweise eine Chemotherapie) sich auf die biologische Mikroumgebung auswirken. Rezidive treten allerdings häufig erst nach Monaten oder Jahren auf, sodass der zeitliche Aspekt in

der Untersuchung gepaarter Primär- und Rezidivtumore als limitierender Faktor schwierig zu umgehen ist.

Eine weitere Limitation besteht darin, dass bei der Auswahl der Probandinnen eine Präselektion erfolgt ist, da nur auch in der Rezidivsituation noch operable Tumore zur Probengewinnung in Frage kamen. Eine Operation wird zudem häufiger bei platin-sensitiven Tumoren durchgeführt (8), was sich auch in unserer Kohorte zeigt. Hinzu kommt, dass das mittlere Alter in unserer Studiengruppe mit 55 Jahren relativ jung und daher gegebenenfalls nicht für alle HGSOCS repräsentativ war.

Abschluss

Zusammenfassend betrachtet, trägt unsere Studie zu den Kenntnissen über die intratumorale Immunogenität während der Progression des HGSOCS dar und gibt insbesondere neue Aufschlüsse über das bislang nur unzureichend erforschte rezidierte Ovarialkarzinom. Dabei fügen sich unsere Ergebnisse in den bisherigen wissenschaftlichen Kontext ein. TILs Subgruppen und auch die MHC Expression korrelierten miteinander und die Immunogenität im Primärtumor war ein signifikanter Prognosefaktor für das progressionsfreie Überleben nach dem Primärtumor. Die Hypothese, dass eine erhöhte intratumorale Immunantwort auch im rekurrenten Tumor mit einem verbesserten Überleben assoziiert ist, konnte in unserer Kohorte nicht bestätigt werden. Auch konnten wir, entgegen unserer Annahme, einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Immunogenität des Primärtumors und jener des Rezidivs finden. Dies könnte möglicherweise für die zukünftige Therapieplanung rezidivierter Ovarialkarzinome eine Rolle spielen, die zwar in der Klinik von großer Bedeutung sind, für die jedoch häufig keine Gewebeprobe zur Verfügung steht. Unsere Daten zeigen, dass für die Untersuchung immunologischer Marker durchaus auch der Primärtumor als Testmaterial verwendet werden kann, wenn keine Probe vom Rezidiv zur Verfügung steht. Die Homogenität, mit der sich das Ovarialkarzinom bezüglich der Immunantwort präsentiert, konnte in unserer Studie erstmals im Vergleich zwischen Primär- und Rezidivtumor gezeigt werden und vor allem hohe TILs-Werte blieben während der Progression stabil.

Das immunologische Profil des Ovarialkarzinoms zu kennen und zu verstehen ist eine wichtige Grundlage für die Erforschung neuer Therapeutika, wie Immuncheckpoint-Inhibitoren oder den adoptiven Zelltransfer, die derzeit einen vielversprechenden Ansatz in der Behandlung des HGSOCS darstellen.

3.5 Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* 2018.
2. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *Science* 2014; 384(9951):1376–88.
3. Vitale SG, Marilli I, Lodato M, Tropea A, Cianci A. The role of cytoreductive surgery in advanced-stage ovarian cancer: a systematic review. *Updates Surg* 2013; 65(4):265–70.
4. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, Gaudet MM, Jemal A, Siegel RL. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018; 68(4):284–96.
5. Du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009; 115(6):1234–44.
6. Hoskins PJ, Le N. Identifying patients unlikely to benefit from further chemotherapy: a descriptive study of outcome at each relapse in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 97(3):862–9.
7. van de Laar R, Zusterzeel PLM, van Gorp T, Buist MR, van Driel WJ, Gaarenstroom KN, Arts HJG, van Huisseling JCM, Hermans RHM, Pijnenborg JMA, Schutter EMJ, Pelikan HMP, Vollebergh JHA, Engelen MJA, Inthout J, Kruitwagen RFPM, Massuger LFAG. Cytoreductive surgery followed by chemotherapy versus chemotherapy alone for recurrent platinum-sensitive epithelial ovarian cancer (SOCceR trial): a multicenter randomised controlled study. *BMC Cancer* 2014; 14:22.
8. Bristow RE, Puri I, Chi DS. Cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2009; 112(1):265–74.
9. Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, Coukos G, Crum CC, Drapkin R, Etemadmoghadam D, Friedlander M, Gabra H, Kaye SB, Lord CJ, Lengyel E, Levine DA, McNeish IA, Menon U, Mills GB, Nephew KP, Oza AM, Sood AK, Stronach EA, Walczak H, Bowtell DD, Balkwill FR. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(10):719–25.
10. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(3):203–13.
11. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen Y-T, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005; 102(51):18538–43.
12. 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; 124(2):192–8.

13. Gasparri ML, Attar R, Palaia I, Perniola G, Marchetti C, Di Donato V, Farooqi AA, Papadia A, Panici PB. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(9):3635–8.
14. Fan X-M, Zhang J, Niu S-H, Li K-X, Song C-Z. Secondary cytoreductive surgery in recurrent epithelial ovarian cancer: A prognostic analysis with 103 cases. *Int J Surg* 2017; 38:61–6.
15. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJM, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(8):711–23.
16. Mansh M. Ipilimumab and Cancer Immunotherapy: A New Hope for Advanced Stage Melanoma. *Yale J Biol Med* 20; 84(4):381–9.
17. Turner TB, Buchsbaum DJ, Straughn JM, Randall TD, Arend RC. Ovarian cancer and the immune system — The role of targeted therapies. *Gynecol Oncol* 2016; 142(2):349–56.
18. Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Hershkovitz L, Levy D, Kubi A, Hovav E, Chermoshniuk N, Shalmon B, Hardan I, Catane R, Markel G, Apter S, Ben-Nun A, Kuchuk I, Shimoni A, Nagler A, Schachter J. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clinical Cancer Research* 2010; 16(9):2646–55.
19. Santoiemma PP, Powell DJ. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2015; 16(6):807–20.
20. Chang C-C, Ferrone S. Immune selective pressure and HLA class I antigen defects in malignant lesions. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 56(2):227–36.
21. Aptsiauri N, Cabrera T, Mendez R, Garcia-Lora A, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. *Adv Exp Med Biol* 2007; 601:123–31.
22. Bronte G, Cicero G, Sortino G, Pernice G, Catarella MT, D'Alia P, Cusenza S, Lo Dico S, Bronte E, Sprini D, Midiri M, Firenze A, Fiorentino E, Bazan V, Rolfo C, Russo A. Immunotherapy for recurrent ovarian cancer: a further piece of the puzzle or a striking strategy? *Expert Opin Biol Ther* 2014; 14(1):103–14.
23. Mariya T, Hirohashi Y, Torigoe T, Asano T, Kuroda T, Yasuda K, Mizuuchi M, Sonoda T, Saito T, Sato N. Prognostic impact of human leukocyte antigen class I expression and association of platinum resistance with immunologic profiles in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunol Res* 2014; 2(12):1220–9.
24. Santoiemma PP, Reyes C, Wang L-P, McLane MW, Feldman MD, Tanyi JL, Powell DJ. Systematic evaluation of multiple immune markers reveals prognostic factors in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2016; 143(1):120–7.
25. Callahan MJ, Nagymanyoki Z, Bonome T, Johnson ME, Litkouhi B, Sullivan EH, Hirsch MS, Matulonis UA, Liu J, Birrer MJ, Berkowitz RS, Mok SC. Increased HLA-DMB Expression in the Tumor Epithelium Is Associated with Increased CTL Infiltration and Improved Prognosis in Advanced-Stage Serous Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research* 2008; 14(23):7667–73.
26. Shehata M, Mukherjee A, Deen S, Al-Attar A, Durrant LG, Chan S. Human leukocyte antigen class I expression is an independent prognostic factor in advanced ovarian cancer resistant to first-line platinum chemotherapy. *Br J Cancer* 2009; 101(8):1321–8.

27. Hoogstraat M, Pagter MS de, Cirkel GA, van Roosmalen MJ, Harkins TT, Duran K, Kreeftmeijer J, Renkens I, Witteveen PO, Lee CC, Nijman IJ, Guy T, van 't Slot R, Jonges TN, Lolkema MP, Koudijs MJ, Zweemer RP, Voest EE, Cuppen E, Kloosterman WP. Genomic and transcriptomic plasticity in treatment-naive ovarian cancer. *Genome Res* 2014; 24(2):200–11.
28. Bell D, Berchuck A, Birrer M, Chien J, Cramer DW, Dao F, Dhir R, DiSaia P, Gabra H, Glenn P, Godwin AK, Gross J, Hartmann L, Huang M, Huntsman DG, Iacocca M, Imielinski M, Kalloger S, Karlan BY, Levine DA, Mills GB, Morrison C, Mutch D, Olvera N, Orsulic S, Park K, Petrelli N, Rabeno B, Rader JS, Sikic BI, Smith-McCune K, Sood AK, Bowtell D, Penny R, Testa JR, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, Gunaratne P, Hawes AC, Kovar CL, Lewis LR, Morgan MB, Newsham IF, Santibanez J, Reid JG, Trevino LR, Wu Y-Q, Wang M, Muzny DM, Wheeler DA, Gibbs RA, Getz G, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko AY, Sougnez C, Voet D, Wilkinson J, Bloom T, Ardlie K, Fennell T, Baldwin J, Gabriel S, Lander ES, Ding L, Fulton RS, Koboldt DC, McLellan MD, Wylie T, Walker J, O'Laughlin M, Dooling DJ, Fulton L, Abbott R, Dees ND, Zhang Q, Kandoth C, Wendl M, Schierding W, Shen D, Harris CC, Schmidt H, Kalicki J, Delehaunty KD, Fronick CC, Demeter R, Cook L, Wallis JW, Lin L, Magrini VJ, Hodges JS, Eldred JM, Smith SM, Pohl CS, Vandin F, Raphael BJ, Weinstock GM, Mardis ER, Wilson RK, Meyerson M, Winckler W, Verhaak RGW, Carter SL, Mermel CH, Saksena G, Nguyen H, Onofrio RC, Hubbard D, Gupta S, Crenshaw A, Ramos AH, Chin L, Protopopov A, Zhang J, Kim TM, Perna I, Xiao Y, Zhang H, Ren G, Sathiamoorthy N, Park RW, Lee E, Park PJ, Kucherlapati R, Absher DM, Waite L, Sherlock G, Brooks JD, Li JZ, Xu J, Myers RM, Laird PW, Cope L, Herman JG, Shen H, Weisenberger DJ, Noushmehr H, Pan F, Triche Jr T, Berman BP, van den Berg DJ, Buckley J, Baylin SB, Spellman PT, Purdom E, Neuvial P, Bengtsson H, Jakkula LR, Durinck S, Han J, Dorton S, Marr H, Choi YG, Wang V, Wang NJ, Ngai J, Conboy JG, Parvin B, Feiler HS, Speed TP, Gray JW, Socci ND, Liang Y, Taylor BS, Schultz N, Borsu L, Lash AE, Brennan C, Viale A, Sander C, Ladanyi M, Hoadley KA, Meng S, Du Y, Shi Y, Li L, Turman YJ, Zang D, Helms EB, Balu S, Zhou X, Wu J, Topal MD, Hayes DN, Perou CM, Zhang J, Wu CJ, Shukla S, Sivachenko A, Jing R, Liu Y, Noble M, Carter H, Kim D, Karchin R, Korkola JE, Heiser LM, Cho RJ, Hu Z, Cerami E, Olshen A, Reva B, Antipin Y, Shen R, Mankoo P, Sheridan R, Ciriello G, Chang WK, Bernanke JA, Haussler D, Benz CC, Stuart JM, Benz SC, Sanborn JZ, Vaske CJ, Zhu J, Szeto C, Scott GK, Yau C, Wilkerson MD, Zhang N, Akbani R, Baggerly KA, Yung WK, Weinstein JN, Shelton T, Grimm D, Hatfield M, Morris S, Yena P, Rhodes P, Sherman M, Paulauskis J, Millis S, Kahn A, Greene JM, Sfeir R, Jensen MA, Chen J, Whitmore J, Alonso S, Jordan J, Chu A, Zhang J, Barker A, Compton C, Eley G, Ferguson M, Fielding P, Gerhard DS, Myles R, Schaefer C, Mills Shaw KR, Vaught J, Vockley JB, Good PJ, Guyer MS, Ozenberger B, Peterson J, Thomson E. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474(7353):609–15.
29. Pan Z, Xie X. BRCA mutations in the manifestation and treatment of ovarian cancer. *Oncotarget* 2017; 8(57):97657–70.
30. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, Johnson DS, Trivett MK, Etemadmoghadam D, Locandro B, Traficante N, Fereday S, Hung JA, Chiew Y-E, Haviv I, Gertig D, deFazio A, Bowtell DDL. Novel Molecular Subtypes of Serous and Endometrioid Ovarian Cancer Linked to Clinical Outcome. *Clinical Cancer Research* 2008; 14(16):5198–208.
31. Lo CS, Sanii S, Kroeger DR, Milne K, Talhouk A, Chiu DS, Rahimi K, Shaw PA, Clarke BA, Nelson BH. Neoadjuvant Chemotherapy of Ovarian Cancer Results in

- Three Patterns of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Response with Distinct Implications for Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 2017; 23(4):925–34.
32. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 2012; 12(5):323–34.
 33. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366(10):883–92.
 34. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PI, Sanders M, Solomon B, Solinas C, van den Eynden GGM, Allory Y, Preusser M, Hainfellner J, Pruneri G, Vingiani A, Demaria S, Symmans F, Nuciforo P, Comerma L, Thompson EA, Lakhani S, Kim S-R, Schnitt S, Colpaert C, Sotiriou C, Scherer SJ, Ignatiadis M, Badve S, Pierce RH, Viale G, Sirtaine N, Penault-Llorca F, Sugie T, Fineberg S, Paik S, Srinivasan A, Richardson A, Wang Y, Chmielik E, Brock J, Johnson DB, Balko J, Wienert S, Bossuyt V, Michiels S, Ternes N, Burchardi N, Luen SJ, Savas P, Klauschen F, Watson PH, Nelson BH, Criscitiello C, O'Toole S, Larsimont D, Wind R de, Curigliano G, André F, Lacroix-Triki M, van de Vijver M, Rojo F, Floris G, Bedri S, Sparano J, Rimm D, Nielsen T, Kos Z, Hewitt S, Singh B, Farshid G, Loibl S, Allison KH, Tung N, Adams S, Willard-Gallo K, Horlings HM, Gandhi L, Moreira A, Hirsch F, Dieci MV, Urbanowicz M, Brcic I, Korski K, Gaire F, Koeppen H, Lo A, Giltane J, Rebelatto MC, Steele KE, Zha J, Emancipator K, Juco JW, Denkert C, Reis-Filho J, Loi S, Fox SB. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors. *Advances In Anatomic Pathology* 2017; 24(5):235–51.
 35. Friedlander M, Trimble E, Tinker A, Alberts D, Avall-Lundqvist E, Brady M, Harter P, Pignata S, Pujade-Lauraine E, Sehouli J, Vergote I, Beale P, Bekkers R, Calvert P, Copeland L, Glasspool R, Gonzalez-Martin A, Katsaros D, Kim JW, Miller B, Provencher D, Rubinstein L, Atri M, Zeimet A, Bacon M, Kitchener H, Stuart GCE. Clinical trials in recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2011; 21(4):771–5.
 36. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45(2):228–47.
 37. Darb-Esfahani S, Kunze CA, Kulbe H, Sehouli J, Wienert S, Lindner J, Budczies J, Bockmayr M, Dietel M, Denkert C, Braicu I, Jöhrens K. 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* 2016; 7(2).
 38. Mani NL, Schalper KA, Hatzis C, Saglam O, Tavassoli F, Butler M, Chagpar AB, Pusztai L, Rimm DL. Quantitative assessment of the spatial heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2016; 18(1):448.
 39. Emerson RO, Sherwood AM, Rieder MJ, Guenthoer J, Williamson DW, Carlson CS, Drescher CW, Tewari M, Bielas JH, Robins HS. High-throughput sequencing of T-cell receptors reveals a homogeneous repertoire of tumour-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *J. Pathol.* 2013; 231(4):433–40.

40. Nelson BH. New insights into tumor immunity revealed by the unique genetic and genomic aspects of ovarian cancer. *Current Opinion in Immunology* 2015; 33:93–100.
41. Ojalvo LS, Thompson ED, Wang T-L, Meeker AK, Shih I-M, Fader AN, Cimino-Mathews A, Emens LA. Tumor-associated macrophages and the tumor immune microenvironment of primary and recurrent epithelial ovarian cancer. *Hum Pathol* 2018; 74:135–47.
42. Mognol GP, Spreafico R, Wong V, Scott-Browne JP, Togher S, Hoffmann A, Hogan PG, Rao A, Trifari S. Exhaustion-associated regulatory regions in CD8+ tumor-infiltrating T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114(13):E2776-85.

4. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Mandy Vanessa Stanske, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Dynamik des intratumoralen Immuninfiltrats während der Progression des high-grade serösen Ovarialkarzinoms – Dynamics of the intratumoral immune response during progression of high-grade serous ovarian cancer" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

5. Anteilserklärung

Mandy Vanessa Stanske hatte folgenden Anteil an der Publikation:

Stanske M, Wienert S, Castillo-Tong DC, Kreuzinger C, Vergote I, Lambrechts S, Gabra H, Gourley C, Ganapathi RN, Kolaschinski I, Budczies J, Sehouli J, Ruscito I, Denkert C, Kulbe H, Schmitt W, Jöhrens K, Braicu I, Darb-Esfahani S.

Dynamics of the Intratumoral Immune Response during Progression of High-Grade Serous Ovarian Cancer.

Neoplasia, 2018

<https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.01.007>

Erarbeitung des Studienkonzeptes

Datengewinnung, -aufbereitung und -auswertung inklusive

- Mitwirkung an der immunhistochemischen Färbung
- Erstellung der Mikrofotografien
- Annotation der Tumorareale
- Softwaregestützte automatische und manuelle TILs-Quantifizierung
- Überprüfung und Korrektur der automatischen TILs-Quantifizierung
- Softwaregestützte Auswertung der MCH-Immunhistochemie

Datenanalyse inklusive

- Qualitätskontrolle der Biomarkerdaten und der klinischen Daten

Statistische Auswertung

Mithilfe bei der Weiterentwicklung der TILs-Quantifizierungssoftware

Erstellung des Manuskriptes inklusive

- Kritische Interpretation
- Erstellung des Erstentwurfes
- Erstellung der Tabellen und Abbildungen
- Bearbeitung der Revision

Unterschrift der Doktorandin

6. Auszug aus der Journal Summary List

Aus dem ISI Web of KnowledgeSM

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
32	Therapeutic Advances in Medical Oncology	1,020	6.238	0.002650
33	JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH	5,661	6.217	0.008740
34	BREAST CANCER RESEARCH	11,022	6.142	0.020000
35	Pigment Cell & Melanoma Research	4,430	6.115	0.007840
36	Clinical Epigenetics	2,172	6.091	0.007720
37	CANCER AND METASTASIS REVIEWS	6,106	6.081	0.006870
38	BRITISH JOURNAL OF CANCER	46,723	5.922	0.065130
39	STEM CELLS	21,694	5.587	0.035680
40	INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS	46,595	5.554	0.055060
41	Oncolmmunology	5,963	5.503	0.020500
42	MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS	19,211	5.365	0.031690
43	ENDOCRINE-RELATED CANCER	7,114	5.331	0.012410
44	Cancers	3,897	5.326	0.008990
45	ONCOLOGIST	11,433	5.306	0.020480
46	Molecular Oncology	4,529	5.264	0.013160
47	CARCINOGENESIS	21,776	5.072	0.021960
48	Gastric Cancer	4,290	5.045	0.006460
49	NEOPLASIA	6,801	4.994	0.008860
50	SEMINARS IN ONCOLOGY	5,409	4.942	0.007270
52	CELLULAR ONCOLOGY	1,322	4.761	0.002020
53	Oncogenesis	1,348	4.722	0.004480
54	ORAL ONCOLOGY	8,949	4.636	0.013760
55	Cancer Biology & Medicine	816	4.607	0.002330
56	MOLECULAR CANCER RESEARCH	7,834	4.597	0.013490
57	JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH PART C- ENVIRONMENTAL CARCINOGENESIS & ECOTOXICOLOGY REVIEWS	895	4.586	0.000810
58	CANCER EPIDEMIOLOGY BIOMARKERS & PREVENTION	19,976	4.554	0.029440
59	GYNECOLOGIC ONCOLOGY	23,652	4.540	0.034310
60	Journal of Oncology	1,573	4.528	0.002410
61	BONE MARROW TRANSPLANTATION	12,506	4.497	0.020810

Selected JCR Year: 2017; Selected Categories: "ONCOLOGY"

2

Quelle:

https://intranet.charite.de/fileadmin/user_upload/microsites/sonstige/medbib/Impact_Faktoren_2016/IS-I-WEB-Liste-Kategorie-Oncology.pdf (Zugriff am 19.01.2019)

7. Druckexemplar der Originalpublikation

Stanske M, Wienert S, Castillo-Tong DC, Kreuzinger C, Vergote I, Lambrechts S, Gabra H, Gourley C, Ganapathi RN, Kolaschinski I, Budczies J, Sehouli J, Ruscito I, Denkert C, Kulbe H, Schmitt W, Jöhrens K, Braicu I, Darb-Esfahani S.

Dynamics of the Intratumoral Immune Response during Progression of High-Grade Serous Ovarian Cancer.

Neoplasia. 2018 Mar;20(3):280-288

<https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.01.007>

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. Komplette Publikationsliste

(1)

Ruscito I, Cacsire Castillo-Tong D, Vergote I, Ignat I, **Stanske M**, Vanderstichele A, Ganapathi RN, Glajzer J, Kulbe H, Trillsch F, Mustea A, Kreuzinger C, Benedetti Panici P, Gourley C, Gabra H, Kessler M, Sehouli J, Darb-Esfahani S, Braicu EI.

Exploring the clonal evolution of CD133/aldehyde-dehydrogenase-1 (ALDH1)-positive cancer stem-like cells from primary to recurrent high-grade serous ovarian cancer (HGSOC). A study of the Ovarian Cancer Therapy-Innovative Models Prolong Survival (OCTIPS) Consortium.

Eur J Cancer, 2017

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.04.016>

(2)

Stanske M, Wienert S, Castillo-Tong DC, Kreuzinger C, Vergote I, Lambrechts S, Gabra H, Gourley C, Ganapathi RN, Kolaschinski I, Budczies J, Sehouli J, Ruscito I, Denkert C, Kulbe H, Schmitt W, Jöhrens K, Braicu I, Darb-Esfahani S.

Dynamics of the Intratumoral Immune Response during Progression of High-Grade Serous Ovarian Cancer.

Neoplasia, 2018

<https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.01.007>

(3)

Ruscito I, Cacsire Castillo-Tong D, Vergote I, Ignat I, **Stanske M**, Vanderstichele A, Glajzer J, Kulbe H, Trillsch F, Mustea A, Kreuzinger C, Benedetti Panici P, Gourley C, Gabra H, Nuti M, Taube ET, Kessler M, Sehouli J, Darb-Esfahani S, Braicu EI.

Characterisation of tumour microvessel density during progression of high-grade serous ovarian cancer: clinico-pathological impact (an OCTIPS Consortium study).

Br J Cancer, 2018

<https://doi.org/10.1038/s41416-018-0157-z>

(4)

Darb-Esfahani S, Kolaschinski I, Trillsch F, Mahner S, Concin N, Vergote I, Van Nieuwenhuysen E, Achimas-Cadariu P, Glajzer J, Wopen H, Wienert S, Taube ET, **Stanske M**, Kulbe H, Denkert C, Sehouli J, Braicu EI.

Morphology and tumour-infiltrating lymphocytes in high-stage, high-grade serous ovarian carcinoma correlated with long-term survival.

Histopathology, 2018

<https://doi.org/10.1111/his.13711>

10. Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. David Horst für die Möglichkeit in seinem Institut zu promovieren, bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau PD Dr. Silvia Darb-Esfahani für die außergewöhnlich gute Betreuung, die mir in den letzten Jahren zuteilwurde, für die zahlreichen Gespräche auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene und die Hilfe in jeder Phase dieser Arbeit. Ohne ihre Unterstützung, die mich auf meinem Weg stets ermutigt hat, wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Ich danke der gesamten AG Translationale Tumorforschung unter der Leitung von Prof. Dr. Carsten Denkert für die großartige Zusammenarbeit, die vielen Ratschläge, die ich erhalten habe und die stete Hilfsbereitschaft aller Kollegen. Insbesondere danke ich Ines Koch, die mir vor allem zu Beginn meiner Arbeit mit viel Geduld und zahlreichen Erklärungen zur Seite stand und Stephan Wienert für den konstruktiven Austausch und die fortwährende Unterstützung im Umgang mit der VM Scope Software. Bei meinen Mitautoren und Mit-Doktoranden möchte ich mich für die Zusammenarbeit, den moralischen Beistand und die menschliche Unterstützung bedanken.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des OCTIPS Projektes, denn ohne sie wären die zahlreichen Daten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, nie gesammelt worden. Danke an VM Scope für die freundliche Bereitstellung der CD3 Quantifier Software und unsere Kooperationspartner aus der Klinik für Gynäkologie der Charité Frau Prof. Dr. Ioana Braicu und Herrn Prof. Dr. Jalid Sehouli.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in allen Lagen stets unterstützt hat, mir zur Seite steht und der ich diese Arbeit widme. Ich danke meiner Mutter, Heike Stanske, die uns viel zu früh verlassen musste und die mir dennoch jeden Tag aufs Neue die Kraft gibt, das Beste aus mir herauszuholen und nie aufzugeben. Von ganzem Herzen danke ich meinem Partner Julien Tanardi für seine uneingeschränkte Unterstützung, die liebevollen Ermutigungen und wertvollen Ratschläge, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zu guter Letzt gebührt ein großer Dank selbstverständlich allen Frauen und ihren Angehörigen, die unsere Forschung ermöglicht haben.