

Aus dem
CharitéCentrum für diagnostische und präventive Labormedizin
Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. David Horst

und dem

CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit
Perinatalzentrum und Humangenetik
Klinik für Gynäkologie
Direktor: Prof. Dr. Jalid Sehoul

Habilitationsschrift

**“Klinisch-pathologische Analyse des Ovarialkarzinoms mit
Schwerpunkt auf der Evaluation prognostischer
immunhistologischer Biomarker im high-grade serösen
Adenokarzinom”**

zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Tina Eliane Tabea Taube
geboren in Köln

Eingereicht: Dezember 2023
Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Spranger

Inhalt

1. Abkürzungen.....	4
2. Einleitung	6
2.1. Epidemiologie des Ovarialkarzinoms	6
2.2. Allgemeine Karzinogenese.....	7
2.3. Allgemeine Pathologie und histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms.....	8
2.3.1. Endometrioides Adenokarzinome (EOC)	8
2.3.2. Klarzellige Adenokarzinome (COC)	9
2.3.3. Muzinöse Adenokarzinome	9
2.3.4. Low-grade seröse Adenokarzinome (LGSOC).....	10
2.3.5 High-grade seröses Adenokarzinome (HGSOC).....	10
2.4. Klinik und aktuelle Therapiestrategien bei Ovarialkarzinomen	11
2.4.1. Früherkennung.....	11
2.4.2. Operative und medikamentöse Therapie	13
2.5. Prognostische Biomarker	15
2.5.1. Prinzipien der Biomarkerbestimmung	15
2.5.2. Kollektiv der HGSOC	16
2.5.3. Methodik und Auswertung IHC Biomarker	17
2.5.4. Ergänzende <i>in silico</i> und <i>in vitro</i> Methoden.....	18
2.6. Zielstellung	19
3. Eigene Arbeiten	22
3.1 Prognostischer Marker: Wilms tumor protein 1 (WT1).....	22
3.2. Prognostische Marker: Regulatorische T-Zellen und TH17 Zellen	33
3.3 Prognostische Marker: EVI1 und PARP1	49
3.4 Prognostischer Marker: LRP1B.....	64
3.5. Prognostischer Marker: IDO1	77
4. Diskussion.....	88

4.1. Methodisch-praktische Überlegungen	88
4.2. Hypothetisch-biologische Überlegungen	90
4.3. Klinisch-therapeutische Implikationen	94
4.4. Additive <i>in-silico</i> , <i>in vitro</i> , scRNA seq Methoden	95
4.5. Ausblick	96
5. Zusammenfassung.....	97
6. Literatur.....	98
7. Danksagung.....	107
8. Erklärung.....	108

1. Abkürzungen

BRCA	Breast Cancer, Brustkrebsgen
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
COC	Klarzelliges ovarielles Adenokarzinom
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EVI1	Ecotropic-Virus-Integrationsstelle-1-Protein-Homolog
EOC	Endometrioides ovarielles Adenokarzinom
ER- α	Östrogenrezeptor- α
FFPE	Formalin fixed paraffin embedded (tissue)
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
HGSOC	high-grade seröses ovarielles Adenokarzinom
HRD	Homologe Rekombinationsdefizienz
HTG	EdgeSeq Oncology Biomarker Panel
IDO1	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
IFNG	Interferon- γ
IHC	Immunhistologie
Ki-67	Kiel-67, Proliferationsmarker
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
LDL	Low density lipoproteins
LGSOC	low-grade seröses ovarielles Adenokarzinom
LRP1B	Low-Density-Lipoproteinrezeptor-verwandtes Protein 1B
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinase
MLH1	MutL protein homolog 1
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mRNA	Messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
ROR γ	RAR-bezogene Orphan-Rezeptor-Gamma
OS	Overall survival / Gesamtüberleben
PAOLA-1	Platine, Avastin and OLaparib in 1st Line
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase

PD-L1	programmed cell death protein
PFS	Progression free survival / Progressionsfreies Überleben
POLE	DNA-Polymerase ϵ
SOLO-1	Studie zu Olaparib Maintenance Monotherapy in Patients With BRCA Mutated Ovarian Cancer Following First Line Platinum Based Chemotherapy.
STIC	seröses tubares intraepitheliales Karzinom
STIL	seröse tubare intraepitheliale Läsion
TCGA	The cancer genome atlas
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TH17	Interleukin 17 produzierende T-Helferzelle
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TMA	tissue micro array
TOC	tumor bank ovarian cancer
Treg	regulatorische T-Zellen
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren
WHO	World Health Organization / Welt Gesundheitsorganisation
WT1	Wilms-Tumor Protein 1

2. Einleitung

2.1. Epidemiologie des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom ist ein relativ seltener Tumor. Mit nur knapp 20.000 geschätzten neuen Fällen in den USA im Jahr 2023 erscheint seine Inzidenz nicht einmal unter den 10 häufigsten Karzinomentitäten bei Frauen (1). Allerdings ist die Prognose des Ovarialkarzinoms weiterhin außergewöhnlich ungünstig. So zählt der Tumor zu der fünf häufigsten krebsassoziierten Todesursache bei Frauen (2-6).

Bei anderen Tumorentitäten wurden in den letzten Jahren beeindruckende Fortschritte erzielt und so gelang es beispielsweise die Inzidenz des Zervixkarzinoms zwischen 2012 und 2019 für geimpfte Frauen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren um 65% zu senken. Auch die Mortalität des Mammakarzinoms, des mit 31% Inzidenz mit Abstand häufigsten Karzinoms der Frauen, sank insbesondere aufgrund von Fortschritten in der Früherkennung um 43 % seit 1989 (1) .

Dagegen gelang eine Reduktion der Inzidenz oder Mortalität beim Ovarialkarzinom bisher kaum und so ist die Prognose mit einer 5 Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von circa 43% über alle Tumorstadien beim Ovarialkarzinom auch im Jahre 2023 weiterhin sehr ungünstig (1).

Die Ursachen hierfür sind vielfältig, eine Rolle dürfte die, mit Ausnahme einer Prädisposition für *BRCA* keimbahnmutierte Frauen, weiterhin ungeklärte Ätiologie (7) sowie fehlende Früherkennungsoptionen (8) spielen. Da Ovarialkarzinome meist im fortgeschrittenem Stadium entdeckt werden, wenn bereits eine Peritonealkarzinose besteht, gelingt die vollständige Resektion selbst in spezialisierten Zentren nur in etwas über 50% (9). Weitere therapeutische Verbesserungen konnten mit der Einführung von VEGF-Inhibitoren in die Erhaltungstherapie (10) sowie vor Kurzem mit der Zulassung von PARP-Inhibitoren erzielt werden (11). Aber insgesamt sind die therapeutischen Optionen bei dem zu Rezidiven und Platinresistenz neigenden Ovarialkarzinom weiterhin sehr limitiert (12).

2.2. Allgemeine Karzinogenese

Virchow begründete mit „Omnis cellula e cellula“ den Grundsatz der modernen Zelltheorie, der besagt, dass alle Zellen aus einer anderen Zelle hervorgegangen sind (13). Basierend auf dieser Erkenntnis weiß man heute, dass Krebszellen durch meist Noxen-induzierte Veränderungen aus einem gesunden Ursprungsgewebe entstehen. In den 2000 erstmals versuchsweise zusammengefassten „hallmarks of cancer“ wurden verschiedene allgemeine Eigenschaften aller Krebszellen zusammengefasst, die im Wesentlichen besagen, dass Krebszellen sich von gesunden Körperzellen durch gestörte Regulationsmechanismen von Wachstumssignalen, ein erhöhtes replikatives Potential und Verhinderung von Apoptosen, der Befähigung zur Invasion und Metastasierung sowie damit einhergehend mit der Generierung notwendiger Eigenschaften wie z.B. tumoreigene Angiogenese auszeichnen (14).

Aber bei detaillierterem Hinsehen differieren verschiedene Karzinome erheblich. So sind zum einen die karzinogenen Noxen recht unterschiedlich (Tabak – Lungenkrebs; HPV – Zervixkarzinom, UV-Strahlung – Hautkrebs) und die daraus resultierend entstandenen Treibermutationen, zum anderen wissen wir heute aber auch, dass Karzinogenese auch epigenetisch durch Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen initiiert werden kann, ein bekanntestes Beispiel ist die *MLH1* Methylierung beim kolorektalen oder endometrioden Adenokarzinom.

Neuere Erkenntnisse weisen zudem darauf hin, dass es nicht nur das eine auslösende Ereignis gibt, sondern Tumorzellen sich in einem Evolutionsprozess vom Normalgewebe abspalten, der einem ständigem Selektionsdruck unterliegt. Selektionierend wirken hierbei tumoreigene metabolische Prozesse, wie Hypoxie und Nährstoffmangel bei unkontrolliertem Wachstum aber auch körpereigene, protektive Faktoren wie zelleigene Reparaturprozesse oder Elimination durch das Immunsystem. Dies führt zur Perturbation von Signalwegen mit dem Ziel der Anpassung an die jeweiligen Notwendigkeiten, vermutlich in Abhängigkeit von Tumorstadium und Tumorumgebung (15).

Das Zusammenspiel dieser Faktoren macht die medikamentöse Karzinomtherapie komplex und so helfen z.B. BRAF Inhibitoren beim genetisch relativ homogenen Melanom aber nicht beim Kolonkarzinom (16). Auch Immuntherapien, wie Immuncheckpoints, sind besonders wirkungsvoll bei der Existenz von Neoantigenen

im Tumor, wie sie insbesondere z.B. bei *MLH1* oder *POLÉ* dysregulierten Karzinomen vermehrt entstehen (17). Neben der generellen Sicht auf die Karzinogenese erscheint es daher sinnvoll, in der Ära der Präzisionsmedizin, sich die Karzinomentitäten im Einzelnen anzusehen, um subtypenspezifische Faktoren herauszuarbeiten und zielgerichtete Therapien generieren zu können.

2.3. Allgemeine Pathologie und histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms

Ausführliche Beschreibungen der verschiedenen Morphologien im Ovarialkarzinom bestehen schon länger. So wurde unter anderem bereits 1901 über ein papilläres Ovarialkarzinom (18) berichtet, das vermutlich histologisch einem serösen Subtyp entspricht. Aber erst umfassende molekulare und immunhistologische Analysen zu Beginn des 21. Jahrhunderts ermöglichten die eindeutige Abgrenzung der verschiedenen histologischen Subtypen. Erst mit der WHO Klassifikation von 2014 wurden high-grade und low-grade seröse Adenokarzinome als zwei verschiedene Entitäten gewürdigt (19). Nach dem aktuellen Konzept werden epitheliale Ovarialkarzinome in fünf verschiedene Subtypen unterteilt, deren Unterschiede auf verschiedenen Ebenen, unter anderem proteomisch mittels MALDI oder IHC, epigenetisch mittels DNA Methylierung (20) oder teilweise genetisch mittels Exome Sequencing gezeigt werden konnten (21). Nach aktueller Erkenntnis handelt es sich bei genauerer Betrachtung bei Ovarialkarzinomen nicht um Tumore mit Ursprung in den weitestgehend epithelfreien Ovarien, sondern um Tumore mit Primärmanifestation oder früher Manifestation in den Ovarien. Der Ursprung liegt in einem dorthin disseminierten ektopen Epithel oder den Tuben (22, 23). Vereinfachend werden die Tumore in dieser Habilitationsschrift jedoch weiterhin als Ovarialkarzinome subsummiert.

2.3.1. Endometrioides Adenokarzinom (EOC)

EOC machen circa 10% der Ovarialkarzinome aus und entstehen in den Ovarien auf dem Boden einer Endometriose (24). Zum Teil lassen sich bereits in den Endometriosen ähnliche Veränderungen wie in endometrioiden Adenokarzinomen

nachweisen (25, 26). Das EOC zeichnet sich durch glanduläres Wachstum mit stiftchenförmigen Kernen und gelegentlich morulaartiger Plattenepithelmetaplasie aus. Auf molekularer Ebene wurden, analog den endometrioiden Adenokarzinomen des Uterus, vier Subtypen identifiziert, das *TP53* mutierte, das MSI, das *POLÉ* mutierte und der „no special type“ (27). Interessanterweise weisen insbesondere das MSI und das *POLÉ* mutierte Adenokarzinom eine hohe Tumormutationslast auf, mit entsprechender Produktion von Neoantigenen, die eine entsprechende Immunantwort auslösen und gut auf immunmodulierende Therapien ansprechen (28).

2.3.2. Klarzellige Adenokarzinome (COC)

COC entstehen ebenfalls auf dem Boden einer Endometriose und machen circa 10-12% der Ovarialkarzinome aus (24). Morphologisch sind sie charakterisiert durch ein glanduläres oder solides Wuchsmuster bestehend aus Zellen mit hellem, optisch leeren Zytoplasma. In den glandulären Abschnitten sind häufig sogenannte hob-nail Kerne (über das Zytoplasma ins Lumen hineinragende Kerne) nachweisbar.

2.3.3. Muzinöse Adenokarzinome

Muzinöse Adenokarzinome im Ovar sind häufig Metastasen gastrointestinaler Tumore und das Konzept von Krukenbergtumoren ist lange bekannt (29). Die in Europa relativ seltenen, circa 3-4%, der primären Ovarialkarzinome ausmachenden, muzinösen Ovarialkarzinome entstehen vermutlich über maligne Entartung aus benignen Teratomen, aus benignen Brenner Tumoren oder Invagination metaplastischen Ovariepithels (30). Histologisch sind sie GI-Trakt Karzinomen sehr ähnlich und werden durch Muzin-produzierende Drüsen gekennzeichnet, die von stiftchenförmigen Kernen tragenden Epithelien ausgekleidet werden. Als Besonderheit finden sich manchmal sogenannte „mural-nodules“, welche kleinen Herden sarkomatoid oder anaplastisch dedifferenzierter Tumoranteilen entsprechen (31). Molekular entsprechen die muzinösen Adenokarzinome weitestgehend ebenfalls dem GI Pendant mit häufigen *KRAS* Mutationen. Weiterhin konnten z.B. der Notch-pathway und BMI1 beim muzinösen, nicht aber beim HGSOC identifiziert werden und es gibt Hinweise auf ein geringeres Ansprechen muzinöser Tumorzellen auf die standardmäßige platinhaltige-Chemotherapie von Ovarialkarzinomen (32).

2.3.4. Low-grade seröse Adenokarzinome (LGSOC)

Das LGSOC wird erst mit der WHO Klassifikation von 2014 als eigener Subtyp eingeführt. Vorher ging man von einer kontinuierlichen Entwicklung von gut differenziert (low-grade) über mittelgradig bis gering differenziert (high-grade) aus. Es ist mit circa 5% der Ovarialkarzinome relativ selten. Histologisch sieht man ein papilläres Wachstumsmuster mit geringer Kernpleomorphie und wenigen Mitosen. Häufig sind Psammkörper nachweisbar. Molekular unterscheidet es sich deutlich vom HGSOC und ist durch häufige Alterationen im MAPK Signalweg z.B. *KRAS* und *BRAF* Mutationen charakterisiert. Es weist keine *TP53* Mutation und keine Defizienz der homologen Rekombination auf (33). Als gesichert gilt die schrittweise Entstehung der LGSOC über Inklusionszysten, seröse Zystadenome und seröse Borderlinetumore zu primär im Ovar oder über Implants im Peritoneum invasiven LGSOC. Hierbei sind die Inklusionszysten vermutlich tubaren Ursprungs und eine primäre Entstehung der LGSOC in der Tube wird ebenfalls diskutiert (34). Aufgrund des relativ neuen Konzepts der eigenständigen Entität und der Seltenheit der Erkrankung gibt es wenige eigene Studien zum LGSOC. Eine Assoziation der proliferativen Aktivität mittels Ki-67 mit der Prognose (35), dem Ansprechen auf Chemotherapie (36) und dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen (37) besteht.

2.3.5 High-grade seröses Adenokarzinome (HGSOC)

Das HGSOC ist mit circa 70% der häufigste und aggressivste Subtyp unter den Ovarialkarzinomen. Vor ungefähr 10 Jahren konnte als Ursprungsepithel disseminierte oder früh metastasierte Tubenepithel identifiziert werden mit der Vorläuferläsion des serösen tubaren intraepithelialen Karzinoms (STIC) (22, 23). Dieses Konzept konnte zwischenzeitlich auf molekularer Ebene bestätigt werden (38) und mit der Definition von p53-Signatur und der serösen tubaren intraepithelialen Läsion (STIL) (39) konkretisiert werden. Konventionell-morphologisch zeichnet sich das HGSOC durch solides Wachstum mit spaltförmigen Hohlräumen, eine ausgeprägte Pleomorphie und hohe mitotische Aktivität, mit häufig auch atypischen Mitosen, aus. Auf molekularer Ebene finden sich fast immer eine *TP53* Mutation und in circa 22% eine somatische- oder Keimbahnmutation in den *BRCA1/2* Genen (40).

Neben BRCA finden sich auch andere Alterationen der homologen Rekombination und zusammengenommen weisen circa 50% der HGSOC eine homologe Rekombinationsdefizienz auf. Die Kombination aus DNA-Reparaturdefizienz und Mutation der *TP53* Chaperone bedingt vermutlich die ausgeprägte genomische Instabilität des HGSOC, die sich insbesondere in einer hohen Zahl von somatischen vollständigen oder partiellen chromosomalen Kopienzahlvariationen äußert (40).

Aus der chromosomalen Instabilität resultiert eine ausgeprägte Tumorerheterogenität. Anders als in MSI Tumoren, die eine hohe Mutationslast insbesondere durch Leserasterverschiebungen aufweisen und sich durch die Induktion einer ausgeprägten Immunantwort durch Ausbildung von Neoantigenen auszeichnen (41, 42), sind HGSOC eher durch eine fehlende Immunogenität geprägt. Die Immunantwort auf Neoantigene unterliegt einem komplexen Regelmechanismus, indem die Menge der Genexpression des Neoantigens, die Affinität und Stärke der Bindung des Antigen-MHC-Komplexes auf antigenpräsentierenden Zellen und die ausreichende Erkennung als „fremd“ zur Induktion einer Immunantwort gegenüber einer Immuntoleranz relevant sind (43). Die exakten Mechanismen mit denen HGSOC der Immunüberwachung des Körpers ausweichen sind bisher nicht bekannt. Die chromosomale Instabilität mit chromosomalen Kopienzahlvariationen induzieren offenbar anders als Punkt- oder Sequenzmutationen keine vom Immunsystem detektierbaren Neoantigene. Weiterhin begünstigt die hohe Tumorerheterogenität vermutlich durch positive Selektion besonders immunevasive Klone (44, 45). Auch die immunsupprimierenden Eigenschaften der extrazellulären Matrix zum Beispiel über die Generierung spezieller immunsuppressiver Makrophagen sind aktuell Gegenstand der Forschung (46).

2.4. Klinik und aktuelle Therapiestrategien bei Ovarialkarzinomen

2.4.1. Früherkennung

Die beste Behandlung einer Tumorerkrankung, insbesondere des HGSOC wäre die Früherkennung. Bisher konnte hier allerdings keine geeignete Methode entdeckt werden. Ovarialkarzinome bleiben lange symptomarm. Auch in Bildgebung und Serologie ist die Früherkennung schwierig: Weder die routinemäßige

Ultraschalluntersuchung noch die Ultraschalluntersuchung in Kombination mit Laborparametern wie z.B. CA125 konnten, wie vom UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS) gezeigt, bisher die Mortalität an ovariellen Karzinomen ausreichend senken, um sie als gesetzliche Früherkennungsuntersuchung zu etablieren (47). Mit dem neuen Wissen um den Fimbrientrichter der Tuba uterina als Ursprungsort der HGSOE kommen neue Screeningoptionen in Betracht. Vermutlich besteht zwischen der Entwicklung der p53-Signatur, der serösen tubaren Läsion (STIL) sowie des STIC und der ausgeprägten Peritonealkarzinose, mit der die Patientinnen klinisch manifest werden, ein Zeitfenster. Labidi-Galy (38) berechnet für dieses Zeitfenster circa 7 Jahre. Aber auch ohne eine genaue Zeitangabe erscheint es logisch, dass sich von der sehr kleinen STIC Zellen abschlüpfen und diese an anderer Stelle im Peritoneum anwachsen. So lange es nur wenige Tumorzellen sind, oder sie möglicherweise initial sogar noch vom Immunsystem eliminiert werden können, bleibt die Krankheit symptomarm. Erst wenn sich eine kritische Zahl kleiner Metastasen gebildet hat, die ihrerseits jeweils proliferieren und neue kleine Metastasen bilden, entsteht ein exponentielles Wachstum mit ausgedehnter Peritonealkarzinose im Bauchraum. Offenbar sind auch die Adipozyten an der Implantation und dem Tumorprogress beteiligt (48).

Bisher konnten die neuen Erkenntnisse um die STIC nicht in ein suffizientes Screening umgesetzt werden. So zeigte z.B. der Versuch der Sequenzierung von *TP53* mutierten Zellen in Uterus- bzw. Tubenlavage zwar eine Zunahme mutierter Zellen mit dem Alter der Patientinnen, aber keine ausreichende Spezifität auf das Vorliegen eines HGSOE (49). Erste Pilotprojekte beschäftigen sich bereits mit der Detektion von diagnostischen Proteinen in extrazellulären Vesikeln oder der Detektion von mRNA im Blut (50, 51), auch Studien zum Mikrobiom im genitalen Sekret könnten möglicherweise in Zukunft Erfolge in der Früherkennung von Ovarialkarzinomen verzeichnen (52).

Derweil bleibt als Konsequenz aus der Erkenntnis um die Tube als Ursprung HGSOE nur die zweistufige Salpingoophorektomie für Risikopatientinnen mit bekannter *BRCA1/2* Keimbahnmutation oder die opportunistische Salpingektomie bei bauchchirurgischen Eingriffen anderer Indikation. Erste Auswertungen großer Kollektive weisen auf eine deutliche Risikoreduktion für HGSOE sowie andere epitheliale Ovarialkarzinome hin (53).

2.4.2. Operative und medikamentöse Therapie

Gemäß S3-Leitlinie (54) für Ovarialtumore ist die primäre Debulking Operation vorzugsweise in einem spezialisierten Zentrum mit erfahrenem gynäko-onkologischen Operateur mit Intention der Resektion aller makroskopisch erkennbaren Tumormanifestationen die Methode der Wahl, dies gilt auch für zufällig entdeckte Ovarialkarzinome in frühen Stadien und selbst für zufällig entdeckte STICs. Eine neoadjuvante Chemotherapie hat bisher keine Verbesserung gegenüber der primären Operation gezeigt (55), die ausgedehnte Lymphonodektomie weist aufgrund einer erhöhten Rate an postoperativen schwerwiegenden Komplikationen eher einen Überlebensnachteil auf (56).

Anschließend wird für alle Ovarialkarzinome mit Ausnahme der gut differenzierten lokal begrenzten (pT1a1) Karzinome die adjuvante Taxan-/platinhaltige Chemotherapie empfohlen. In vielen anderen Tumorentitäten werden an dieser Stelle zur Therapieentscheidung Prognosefaktoren herangezogen. Beispielhaft sei hier das Mammakarzinom genannt, das neben den konventionellen Prognosefaktoren wie Tumorgöße und Nodalstatus auch die Rezeptorexpression und den Ki-67 Status berücksichtigt, sowie teilweise Multigentests zur Beurteilung von Nutzen und Schaden einer adjuvanten Chemotherapie herangezogen werden (57). Auch beim Kolonkarzinom wird neben den klassischen Prognosefaktoren wie Tumorgöße und Nodalstatus seit einigen Jahren zusätzlich der Mikrosatellitenstatus zur Indikationsstellung einer Chemotherapie beurteilt (58). Es mag an der Ermangelung von therapeutischen Alternativen aber auch am bisherigen Fehlen von verlässlichen Prognoseparameter des Ovarialkarzinoms liegen, dass bisher nahezu uneingeschränkt die Empfehlungen zur Chemotherapie gegeben wird.

Dabei gäbe es auf Basis aktueller Erkenntnisse Hinweise darauf, dass die histologischen Subtypen mit unterschiedlicher Prognose und auch unterschiedlichem Ansprechen auf die konventionelle Chemotherapie assoziiert sind. So zeigen Studien, dass LGSOC z.B. nur zu circa einem Viertel auf die klassische Taxan-/Platinhaltige Chemotherapie ansprechen (59) und stattdessen Therapien mit Bevacicumab (60), endokrinen Erhaltungstherapien (61) oder MEK-Inhibitoren, entsprechend aktueller

Erkenntnisse über die Aktivierung des MAPK-Signalwegs bei dieser Entität, erfolgversprechender sein könnten (62).

Unabhängig von der bisher gleichbleibenden standardisierten Empfehlung zur Operation und anschließender platinhaltiger Chemotherapie setzen sich aktuell weitere Therapieansätze in der Erhaltungstherapie durch. So wurden 2011 Angiogenesehemmer (z.B. Bevacizumab) aufgrund einer relativ geringen Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (circa 6 Monate im PFS) zur Erhaltungstherapie zugelassen (10).

Vielversprechend, zumindest für die Gruppe der Patientinnen mit *BRCA* Mutation oder anderer homologer Rekombinationsdefizienz, erscheinen insbesondere PARP-Inhibitoren. Diese, circa 2005 entdeckte Medikamentengruppe führt bei Patientinnen mit Defekten der homologen Rekombination zur synthetischen Letalität. Sie induzieren vermehrten Doppelstrangbrüchen, die aufgrund des defekten Reparaturmechanismus zur Akkumulation von DNA-Schäden in der Apoptose münden (63). Ursprünglich wurden sie in der Rezidivsituation für *BRCA* mutierte Tumore zugelassen. Nach den ermutigenden Ergebnissen der SOLO-1 Studie werden sie nun auch für Patientinnen mit *BRCA* mutierten Tumoren zur Erhaltungstherapie in der Primärsituation (64) genutzt. Da neben der Mutation von *BRCA* auch weitere Gene mutiert sein können, bzw. auch epigenetische Modifikationen zum Ausfall der homologen Rekombination führen, konnte nach der PAOLA-1 Studie und mit Entwicklung verschiedener HRD-Assays die Therapie mit Olaparib auf die Gruppe der HRD Karzinome ausgeweitet werden (11). Ein anderer PARP Inhibitor, Niraparib, ist seit November 2020 ohne HRD-Testung für fortgeschrittene Ovarialkarzinome zur Erhaltungstherapie zugelassen (65).

Aber auch nach initialem Therapieansprechen erleiden mehr als 80% der Patientinnen früher oder später ein platinresistentes Rezidiv ihres Ovarialkarzinoms. In dieser Situation bleiben kaum weitere Therapieoptionen, manchmal können andere Chemotherapiestrategien mit pegyliertem liposomalen Doxorubicin oder Gemcitabine oder auch PARP Inhibitoren in Kombination mit Bevacicumab noch das Fortschreiten der Tumorerkrankung aufhalten. Dennoch versterben Patientinnen mit platinresistentem Rezidiv durchschnittlich innerhalb eines Jahres (66).

Interessanterweise kommen bei Ovarialkarzinomen, anders als in vielen anderen Tumorentitäten, Immuntherapien kaum zum Einsatz. Mit Ausnahme des MSI endometrioiden Adenokarzinoms, konnte bisher kein ausreichendes Ansprechen auf Immuncheckpointinhibitoren nachgewiesen werden (67). Auch Therapien mit monoklonalen Antikörpern gegen Zielmoleküle kommen, abgesehen von dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab nicht zur Anwendung. Aber die Kenntnisse über die Interaktion von Immunsystem und Kanzerogenese haben sich in den letzten Jahren weiterentwickelt und die Möglichkeiten der Immuntherapie auch im Hinblick auf ambitionierte Projekte wie Tumorstimulation scheinen nicht ausgeschöpft (68).

Die aktuelle Entwicklung bringt mit der Anerkennung unterschiedlicher histologischer Subtypen und der HRD-Testung in der Empfehlung für high-grade Subtypen einen vorsichtigen Schritt in Richtung Patientinnenstratifizierung beim Ovarialkarzinom. Trotzdem bleiben viele Fragen offen und funktionierende Biomarker zur Therapiepersonalisierung und –Optimierung wären wünschenswert.

2.5. Prognostische Biomarker

2.5.1. Prinzipien der Biomarkerbestimmung

Der Begriff Biomarker definiert beobachtbare, messbare Veränderungen entsprechend einer Krankheit. Genau genommen definiert somit bereits die in der Antike durchgeführte „Harnschau“ erste „Biomarker“ (69) und wendet sich ab von dem zuvor praktizierten Glauben der „gottgegebenen“ Erkrankung.

Moderne Tumorbiosmarker können diagnostisch, prognostisch oder prädiktiv sein. Sie können theoretisch an jeder der eingangs erwähnten „Hallmarks“ von Karzinomen abgeleitet werden und unterscheiden sich hierbei je nach Tumorentität zum Teil erheblich. So erfolgt die Rezeptorbestimmung am Mammakarzinom prinzipiell am „Hallmark: Entkoppelte Regulationsmechanismen von Wachstumssignalen“ (70). Die prognostische Einteilung von Tumorbudding und –nesting beim Kolonkarzinom wäre dagegen eher dem „Hallmark: Befähigung zur Invasion und Metastasierung“ zuzuordnen (71). Auch Veränderungen im Rahmen des Selektionsdruckes, dem die Tumorzellen unterliegen können zur Biomarkergenerierung dienen, ein typisches Beispiel ist die Expression von PD-L1 (72). Meistens eher einschränkend, aber unter bestimmten Voraussetzungen als Biomarker nutzbar, sind temporale und spatiale

Tumorheterogenität (73). Neben diesen biologischen Ansatzpunkten gibt es methodische Unterschiede. So können Biomarker genetische, transkriptionale, epigenetische oder proteomische Veränderungen beschreiben.

Biomarker unterliegen aber auch Anforderungen und so ist eine objektive Messbarkeit und extensive Validierung auch vor dem Hintergrund der Vermeidung explodierender Kosten für die Krankenkassen essentiell. Gelingt die Etablierung eines zuverlässigen Biomarkers, können daraus die bereits erwähnten Vorteile für die Therapie abgeleitet werden. Darüber hinaus können beispielsweise proteomische Biomarker das Substrat der Aktivierung eines Signalweges messen und dann hypothesengenerierend für weitere Grundlagenforschung der zugrundeliegenden genomischen oder epigenomischen Alterationen genutzt werden (74).

2.5.2. Kollektiv der HGSOC

Da die histologischen Subtypen zusammen mit konventionellen Parametern (Staging, Alter, Tumorrest) als wichtige Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom anerkannt sind (54), ist eine separate Analyse nach histologischen Subtypen erforderlich.

Entsprechend der S3-Leitlinie werden Ovarialkarzinome primär möglichst tumorfrei operiert und das Tumorgewebe, das bei der Operation gewonnen wird, ist gut geeignet für retrospektive prognostische Biomarkeranalysen. FFPE Tumormaterial von Ovarialkarzinompatientinnen ist in der Pathologie der Charité, die mit dem Europäische Kompetenzzentrum für Eierstockkrebs und der tumorbank ovarian cancer (TOC) zusammenarbeitet, in ausreichender Menge verfügbar. FFPE Material wird routinemäßig für viele Färbungen und IHC Untersuchungen sowie zunehmend auch für genetische Analysen (75) verwendet und zeichnet sich durch eine gute Reproduzierbarkeit der immunhistologischen Ergebnisse bei gleichem Protokoll- und gleicher Antikörperverwendung aus (76). Zur effizienten wissenschaftlichen Untersuchung, wurde nach Diagnoseverifizierung einer versierten Gynäkopathologin (E.T.T.) entsprechend der aktuellen WHO Leitlinie (31) FFPE-Tumormaterial verschiedener Patientinnen auf tissue microarrays (TMAs) zusammengefasst. Mehrere Stenzen pro Patientin bilden intratumorale Heterogenität ab. Hierbei wurde bei den HGSOC dem Konzept des Ursprunges in den Tuben mit frühzeitiger gleichzeitiger Dissemination in den Bauchraum und die Ovarien folgend, peritoneales

oder ovarielles Tumormaterial der Primäroperation verwendet (77). Das ursprünglich geplante Kollektiv wurde im Laufe der Zeit kontinuierlich ergänzt und die klinischen Parameter und der Überlebensdaten fortwährend aktualisiert. Bei neueren Erkenntnissen, wie z.B. der konsistenten Mutation von *TP53* beim HGSOC, erfolgt eine kritische Optimierung. Entsprechend wurde das Kollektiv auf durchgängig p53 mutationstypisches Expressionsprofil nachträglich bereinigt. Das Kollektiv der HGSOC ist für die eingangs beschriebene Seltenheit der Entität inzwischen sehr umfangreich und umfasst circa 600 Fälle, deren Diagnose sich über einen Zeitraum von circa 2000 bis circa 2019 erstreckt.

Entsprechend des langen Zeitraumes stellt sich die Frage, ob neben prognostischen Biomarkern nicht auch eine Analyse prädiktiver Biomarker möglich wäre. Eine Stratifizierung nach Therapie wurde in der Publikation zu LRP1B (78) versucht. Dabei erscheint es in diesem Zusammenhang problematisch, dass sich an der Standardtherapie und Prognose kaum Veränderungen ergeben haben. Eine Einteilung in verschiedene Therapiegruppen ergab daher aufgrund der nahezu durchgängig gleichartigen Therapie der Patientinnen nur eine Hauptgruppe für die Primärtherapie (78). Für die Analyse prädiktive Biomarker im Gegensatz zu prognostischen Biomarkern wäre die Gewebeentnahme vor, während und nach der applizierten Therapie ein weiterer zu prüfender Ansatz. Dies ist jedoch sowohl für bestehende als auch für innovative Medikamente problematisch, da sie insbesondere im Ovarialkarzinom oft im Rezidiv appliziert bzw. initial getestet werden und dann bisher kein weiteres Gewebe mehr entnommen wird (74). Zusammenfassend haben wir uns aufgrund der speziellen Situation im Ovarialkarzinom, die eine Gruppierung nach Therapien nicht ermöglicht, auf prognostische Biomarker konzentriert.

2.5.3. Methodik und Auswertung IHC Biomarker

IHC Untersuchungen bergen teilweise eine nicht unerhebliche Interobservervariabilität, bedingt durch die unterschiedliche Interpretation von Färbeintensitäten und –expressionsmustern sowie die Auswahl des relevanten Areals (79). Zur Unterstützung der Quantifizierung eines IHC Markers wurden in der jüngeren Vergangenheit eine Reihe von Softwaresystemen entwickelt. In den aktuelleren Publikationen wurde nahezu durchgängig mit der open-source Software QuPath

(Version v0.4.4.) ausgewertet (80). Nach automatischer Erkennung und manueller Feinjustierung werden in einem mehrschrittigen Vorgehen zuerst exemplarisch Tumor-Stroma Areale vom Pathologen annotiert, nach deren Charakteristika anschließend die gesamten TMAs einer Färbung von der Software klassifiziert werden. Das Ergebnis der Tumor-Stroma Klassifikation wird visuell vom / von der Patholog:in überprüft. Diese Schritte werden so lange wiederholt bis die Qualität den Ansprüchen genügt. Anschließend wird die Intensitätsschwelle festgelegt, ab der eine Zelle als positiv zu werten ist. Auch hier folgt die visuelle Abstimmung, bis das Ergebnis vom / von der Patholog:in akzeptiert wird. Schlussendlich werden Artefakte manuell entfernt. Die QuPath Software wurde zwischenzeitlich in mehreren klinischen Studien sowohl mit der Einschätzung des/der Patholog:in als auch mit der prognostischen Richtigkeit überprüft (81, 82).

2.5.4. Ergänzende *in silico* und *in vitro* Methoden

Transkription und Translation unterliegen komplexen Regulationsmechanismen und zudem epigenetischen Modifikationen, so dass die Analyse von Proteinen aktuell wieder an Bedeutung gewonnen hat. Das Proteinmuster von Zellen ist dynamisch da sie als „Lebensäußerung“ den aktuellen Zustand von Zellen widerspiegeln und nicht wie genetische Mutationsanalysen *nur* die „Baupläne“ mit den theoretischen Möglichkeiten (83). In einigen Publikationen haben wir einen Beweis unserer Ergebnisse *in silico* auf mRNA – Genchip Ebene (microarray) mit dem online Kaplan-Meier Plotter durchgeführt (84). Der direkten Übertragungen der Ergebnisse von mRNA auf Proteinebene stehen sowohl methodische als auch biologische Argumente entgegen. Methodisch können genomische „bulk“ Analysen nicht zwischen Tumor- und Stromaexpression differenzieren und das Konzept der serösen Tumore hat sich mit der Einteilung in low- und high-grade seröse Tumore als eigenständige Entitäten 2014 geändert, was in vielen öffentlichen Datensätzen noch nicht entsprechend umgesetzt wird (85) (19). Biologisch können Prozesse der post-transkriptionellen oder post-translationalen Modifikation die Konzentration von mRNA und Proteinen beeinflussen. So weisen sowohl mRNA Assay Analysen als auch die IHC Proteinbestimmung Schwächen auf, was die Stabilität kongruenter Ergebnisse in beiden Methoden unterstreicht.

Es liegt in der Natur der Biomarker, dass sie zwar Beobachtungen beschreiben, aber für sich genommen keine mechanistische Erklärung liefern können. Die Pathologie als klassisches Schnittstellenfach zwischen Klinik und Grundlagenforschung stellt sich nicht nur der Herausforderung, für die Klinik nutzbare diagnostische Analysemethoden zur Verfügung zu stellen, sondern möchte auch mit der Grundlagenforschung zusammenarbeiten, um Erklärungen für die komplexen biologischen Prozesse zu erarbeiten. In den aktuelleren Publikationen haben wir daher versucht, über die Analyse von öffentlichen *in-silico* Datensätzen sowie *in vitro* Analyse von Zelllinien ansatzweise mechanistische Informationen zu unseren Biomarkern zu ergänzen.

Statistisch wurde eine cut-off Optimierung mit dem Cut-off Finder durchgeführt und anschließend das Überleben mittels Kaplan-Meier Analyse bzw. Cox-Regression uni- und multivariat berechnet.

Zusammenfassend wurde in den vorliegenden Publikationen der methodische Schwerpunkt auf die, im Vergleich zu anderen Methoden kostengünstige, immunhistochemisch-proteomische, prognostische Biomarkerdetektion beim HGSOE gesetzt und diese durch *in silico* Analysen öffentlich verfügbarer genomischer Datensätze und einzelne *in vitro* Zelllinienanalysen ergänzt.

2.6. Zielstellung

Die Prognose des HGSOE ist auch im Jahre 2023 sehr ungünstig. Der klinische Verlauf ist durch späte Diagnosestellung, häufig initial bestehenden Peritonealkarzinose und mehrfache Rezidive gekennzeichnet. Molekular zeichnet es sich durch chromosomale Instabilität mittels *TP53*-Mutation und HRD aus. Säulen der Therapie bilden eine möglichst vollständige Resektion und eine platinhaltige Chemotherapie. In den letzten Jahren waren mit Einführung von PARP-Inhibitoren in die Erhaltungstherapie Erfolge zu verzeichnen. Für andere therapeutische Ansätze, insbesondere immunonkologische, konnten bei dieser Tumorentität bisher keine Wirkung belegt werden. Prognostische Biomarker zur Patientinnenstratifizierung sind in der Ära der Präzisionsmedizin für das HGSOE dringend notwendig. Im Hinblick auf die Besonderheiten des HGSOE haben wir die folgenden proteomischen Marker immunhistologisch an einem großen, gut charakterisierten Kollektiv von HGSOE Patientinnen auf ihre prognostische Relevanz untersucht.

WT1 als diagnostischer Marker für seröse Ovarialkarzinome (31) ist ein Tumorsuppressor (86) und wird im gesunden Tubenepithel nicht exprimiert (87). Da WT1 im Erwachsenenewebe nur selten exprimiert wird, scheint es ein geeignetes Zielmolekül von Vakzinierungsstudien zu sein (88). Wissen um die prognostische Signifikanz kann bei der Entwicklung und Bewertung von WT1 gerichteten Immuntherapien relevant sein.

Neben den Tumorzellen selbst können auch intra- und peritumorale Lymphozyten Aufschlüsse über eine Immunantwort geben und zur prognostischen Einschätzung dienen (89, 90). Während mehrfach gezeigt wurde, dass die Anzahl von TILs prognostisch relevant ist, scheint auch die Zusammensetzung der einzelnen Lymphozytenuntergruppen eine Rolle zu spielen (91). Deshalb interessierte uns das Vorkommen und die prognostische Signifikanz regulatorischer T-Zellen und TH17 Zellen beim HGSOC.

EV11 hemmt den TGF- β Signaltransduktionsweg, was indirekt über die Hemmung der Transdifferenzierung TH17 Zellen zu regulatorischen T-Zellen (92) immunaktivierend sein könnte. Zudem ist beim HGSOC eine Chromosomale Instabilität durch *TP53* Mutation und HRD bekannt. Die genauen Mechanismen von HRD sind dabei nicht geklärt, bisher werden die Effekte als Signatur „genomischer Narben“ im Gewebe (93) gemessen. Daher fragen wir nach der prognostischen Aussage der Expression von EV11, einem Molekül des TGF- β Signaltransduktionsweges (94), das bei der Fanconi-Anämie (95) in Assoziation mit HRD aufgefallen war, und PARP1, einem wichtigen Molekül der DNA- Einzelstrangreparatur.

Die Transdifferenzierung TH17 positiver Zellen zu regulatorischen T-Zellen wird auch über den Tryptophanmetabolismus gesteuert (96, 97). IDO1 ist ein intrazelluläres Enzym, das durch Tryptophanabbau die Verfügbarkeit dieser essentiellen Aminosäure reduziert, mit vielfältigen Auswirkungen auf das Immunsystem (98). Uns interessierte ob es im HGSOC immunhistologisch nachweisbar ist, von welchen Zelltypen es

exprimiert wird, seine Assoziation mit intratumoralen TILs und deren Subgruppen sowie die prognostische Relevanz.

Eine weitere Besonderheit des HGSOC ist die frühe und ausgedehnte Peritonealkarzinose. In diesem Zusammenhang weisen verschiedene Studien auf eine Dysregulation des Lipidstoffwechsels hin (99-102). LRP1B ist als Mitglied der Low-Density-Lipoprotein (LDL) Rezeptorfamilie ein wichtiges Molekül im Lipidstoffwechsel und gilt als Tumorsuppressor (103). Wir prüften daher die Hypothese ob die immunhistologische Expression von LRP1B, als Surrogat eines dysregulierten Lipidstoffwechsels, prognostisch informativ ist.

3. Eigene Arbeiten

3.1 Prognostischer Marker: Wilms tumor protein 1 (WT1)

Wilms tumor protein 1 (WT1)-- not only a diagnostic but also a prognostic marker in high-grade serous ovarian carcinoma.

Taube ET, Denkert C, Sehouli J, Kunze CA, Dietel M, Braicu I, Letsch A, Darb-Esfahani S.

Gynecol Oncol. 2016 Mar;140(3):494-502.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.12.018> Epub 2015 Dec 22. PMID: 26721227.

Im Folgenden ist das Abstract der Originalarbeit wiedergegeben (Übersetzung durch die Autorin).

Ziele.

„Die Expression des Wilms-Tumorproteins 1 (WT1) wird in der gynäkologischen Pathologie als diagnostischer Marker für seröse Differenzierung verwendet und wird häufig koexprimiert mit ER- α . Frühphasenstudien zum WT1-Impfstoff in gynäkologischen Krebserkrankungen sind im Gange. In dieser Studie wollten wir den prognostischen Wert von WT1 bei high-grade serösen Ovarialkarzinomen bestimmen.

Methoden.

Die WT1-Proteinexpression wurde durch Immunhistochemie in einer Kohorte von 207 primären high-grade serösen Ovarialkarzinomen bestimmt. Die WT1-mRNA-Expression wurde in einer Kohorte von 1137 Ovarialkarzinomen aus öffentlich verfügbaren Genexpressionsdatensätzen untersucht.

Ergebnisse.

Eine hohe WT1-Expression war ein signifikant positiver Prognosefaktor bei primär high-grade serösen Ovarialkarzinomen hinsichtlich Gesamtüberleben (OS, $p = 0,008$) und progressionsfreiem Überleben (PFS, $p = 0,015$), die Beobachtung war unabhängig

von Alter, Stadium und Resttumor (OS: $p=0,024$, PFS: $p=0,047$). Die prognostische Bedeutung der immunhistologischen WT1-Expression konnte in einer unabhängigen Kohorte von 72 Patient:innen reproduziert werden. Auf der mRNA-Ebene wurde die prognostische Signifikanz in silico in öffentlich verfügbaren Genexpressionsdatensätzen validiert, welche auch TCGA-Daten beinhalteten (OS: $p=0,002$, PFS: $p=0,011$). Die WT1-Expression war signifikant mit der ER- α -Expression verknüpft ($p=0,001$) und Tumoren, die beide Marker (WT1+/ER- α +) koexprimierten, hatten eine längere Überlebenszeit als Tumoren aller anderen Markerkombinationen (OS: $p = 0,002$, PFS: $p = 0,013$).

Diskussion

Wir präsentieren WT1 als robusten prognostischen Marker beim high-grade serösen Ovarialkarzinom, auch zuzüglich zu den prognostischen Informationen von ER- α . Dies sollte berücksichtigt werden, wenn WT1 im Zusammenhang von WT1-Targeting-Therapien als Biomarker verwendet wird.“

3.2. Prognostische Marker: Regulatorische T-Zellen und TH17 Zellen

Prognostic value of regulatory T cells and T helper 17 cells in high grade serous ovarian carcinoma.

Marchenko S, Piwonski I, Hoffmann I, Sinn BV, Kunze CA, Monjé N, Pohl J, Kulbe H, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Braicu EI, von Brünneck AC, Sehouli J, Denkert C, Horst D, Jöhrens K, Taube ET.

J Cancer Res Clin Oncol. 2023 Jun;149(6):2523-2536.

doi: <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04101-2> Epub 2022 Jun 28. PMID: 35763108; PMCID: PMC10129928.

Im Folgenden ist das Abstract der Originalarbeit wiedergegeben (Übersetzung durch die Autorin).

„Zielstellung

In den letzten Jahren ist die Tumormikroumgebung und ihre Interaktion mit dem Tumor in den Fokus der Forschung gerückt mit erhöhter Aufmerksamkeit auf der Zusammensetzung tumorinfiltrierender Lymphozyten. Wir wollten die Zusammensetzung regulatorischer T-Zellen (Tregs) und T-Helfer-17-Zellen (Th17-Zellen) quantifizieren und ihre prognostische Bedeutung bei high-grade serösen tubo-ovariellen Karzinom untersuchen.

Methoden

Tregs und Th17-Zellen wurden durch immunhistochemische Analyse von CD25 FoxP3 bzw. ROR γ t auf Gewebemikroarrays an einer Kohorte von 222 Patient:innen mit überprüfter Histologie und verfügbaren klinischen Daten bestimmt. Die Expression wurde quantifiziert mittels Qupath und die Integration mit klinischen Daten ermöglichte die Berechnung der prognostischen Relevanz. Zur Validierung wurden die FOXP3-

und RORC-mRNA-Expressionsniveaus von 502 Patientinnen mit HGSC in öffentlich zugänglichen Datensätzen ausgewertet.

Ergebnisse

Im Gesamtgewebe wurde ein durchschnittlicher Prozentsatz von 0,93% Tregs und 0,06% Th17-Zellen auf die Gesamtzellularität nachgewiesen. Optimale Cut-Offs wurden bestimmt und höhere Tregs waren mit einem besseren Gesamtüberleben im Stroma- ($p = 0,006$), im Tumor- ($p = 0,0012$) sowie im Gesamtgewebe ($p = 0,02$) verbunden. Nach Berücksichtigung bekannter prognostischer Faktoren wie Alter bei Diagnose, Resttumor und FIGO-Stadium blieb dieser Zusammenhang für stromale Tregs im Gesamtüberleben signifikant ($p = 0,02$). Die Überlebensanalyse für Th17-Zellen ergab keinen signifikanten Zusammenhang mit den Überlebensraten. Darüber hinaus sind niedrigere Th17/Treg-Verhältnisse positiv mit dem Gesamtüberleben der Patient:innen assoziiert ($p = 0,025$ Tumor, $p = 0,049$ Stroma und $p = 0,016$ Gesamtgewebe).

Schlussfolgerung

Unsere Ergebnisse zeigen einen positiven prognostischen Effekt für höhere Tregs, nicht jedoch für Th17 beim high-grade serösen Tuboovariellen Karzinom.“

3.3 Prognostische Marker: EVI1 und PARP1

High EVI1 and PARP1 expression as favourable prognostic markers in high-grade serous ovarian carcinoma.

Jank P, Leichsenring J, Kolb S, Hoffmann I, Bischoff P, Kunze CA, Dragomir MP, Gleitsmann M, Jesinghaus M, Schmitt WD, Kulbe H, Sers C, Stenzinger A, Sehouli J, Braicu IE, Westhoff C, Horst D, Denkert C, Gröschel S[#], Taube ET[#].

J Ovarian Res. 2023 Jul 31;16(1):150. doi: <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01239-6>
PMID: 37525239; PMCID: PMC10388497.

geteilte Letztautorenschaft

Im Folgenden ist das Abstract der Originalarbeit wiedergegeben (Übersetzung durch die Autorin).

“Hintergrund

Mechanismen der Entwicklung und des Fortschreitens von high-grade serösem Ovarialkarzinom (HGSOC) sind schlecht verstanden. EVI1 und PARP1, Teil des TGF- β -Signalwegs, sind bei Krebserkrankungen mit DNA-Reparaturdefiziten hochreguliert und können das Fortschreiten bzw. Überleben der Krankheit beeinflussen. Deshalb hat uns die prognostische Signifikanz der Proteinexpression von EVI1 allein und in Kombination mit PARP1 interessiert und wir haben sie an einer Kohorte von Patientinnen mit HGSOC analysiert.

Methoden

Wir haben an 562 HGSOC-Patientinnen die EVI1- und PARP1-Proteinexpression in der immunhistochemische Färbung mittels der digitalen halbautomatischen positiven Zellerkennung von QuPath auf Gewebe-Microarrays evaluiert.

Ergebnisse

HGSOC mit hoher EVI1-Expression (> 30 % positive Tumorzellen) waren mit einem verbesserten progressionsfreien (PFS) (HR = 0,66, 95 %-KI: 0,504–0,852, p = 0,002) und Gesamtüberleben (OS) (HR = 0,45, 95 %-KI: 0,352–0,563, p < 0,001) verbunden, auch in der multivariaten Analyse. Interessant ist, dass die Gruppe mit hoher Expression beider Proteine mit besonders guter Prognose verknüpft zu sein scheint. Unsere Ergebnisse wurden technisch und klinisch mithilfe von Bioinformatik Datensätzen zur Einzelzellsequenzierung, Variation der Kopienzahl und Gen- sowie Proteinexpression validiert.

Schlussfolgerungen

EVI1 und PARP1 sind robuste prognostische Biomarker für eine günstige Prognose bei HGSOC und implizieren weitere Forschung im Hinblick auf ihre Reziprozität.“

3.4 Prognostischer Marker: LRP1B

LRP1B - a prognostic marker in tubo-ovarian high-grade serous carcinoma.

Kolb S, Hoffmann I, Monjé N, Dragomir MP, Jank P, Bischoff P, Keunecke C, Pohl J, Kunze CA, Marchenko S, Schmitt WD, Kulbe H, Sers C, Sehouli J, Braicu EI, Denkert C, Darb-Esfahani S, Horst D, Sinn BV, Taube ET.

Hum Pathol. 2023 Nov;141:158-168. doi: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2023.09.001>
Epub 2023 Sep 22. PMID: 37742945.

Im Folgenden ist das Abstract der Originalarbeit wiedergegeben (Übersetzung durch die Autorin).

„Hintergrund

LDL Receptor Related Protein 1B (LRP1B) ist ein Mitglied der Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Rezeptorfamilie und wurde oft als Tumorsuppressorgen diskutiert, da seine Herunterregulierung mit einer schlechten Prognose bei multiplen Karzinomentitäten korreliert. Aufgrund der hohen Metastasierungsrate in die fettgewebshaltige Bauchhöhle und aktueller Forschungsergebnisse, die eine Dysregulation des Lipidstoffwechsels beim tubo-ovariellen high-grade serösen Karzinom (HGSC) zeigen, untersuchten wir die prognostische Signifikanz der LRP1B-Proteinexpression.

Methode

Wir untersuchten eine gut charakterisierte große Kohorte von 571 Patient:innen mit primärem HGSC und analysierten die LRP1B-Proteinexpression mittels immunhistochemischer Färbung (getrennt in Tumor- als auch in Stromazellen), führten eine präzise Biobildanalyse mittels QuPath durch und berechneten die prognostischen Auswirkungen mit SPSS.

Ergebnisse

Unsere Ergebnisse zeigen, dass LRP1B als signifikanter prognostischer Marker für das Gesamtüberleben (OS) und das progressionsfreie Überleben (PFS) beim HGSC auf Proteinebene fungiert. Eine hohe zytoplasmatische Expression von LRP1B im Tumor, im Stroma und kombiniert in Tumor- und Stromazellen hat einen signifikant positiven Zusammenhang mit einer mittleren Verlängerung des OS um 42 Monate ($p=0,005$), 29 Monate ($p=0,005$) und 25 Monate ($p=0,001$). Darüber hinaus war das mittlere PFS bei Tumorzellexpression 18 Monate länger ($p=0,002$), bei Stromazellexpression 19 Monate ($p=0,004$) und bei beiden Zelltypen zusammen 19 Monate länger ($p=0,01$). Unsere Ergebnisse blieben in der multivariaten Analyse signifikant.

Schlussfolgerungen

Wir stellen uns LRP1B als potenzielles prognostisches Instrument vor, das uns helfen könnte, die funktionelle Rolle des Lipidstoffwechsels bei fortgeschrittenem HGSC zu verstehen, insbesondere im Hinblick auf liposomale Medikamente.“

3.5. Prognostischer Marker: IDO1

Increased expression of IDO1 is associated with improved survival and increased number of TILs in patients with high-grade serous ovarian cancer.

Hoffmann I, Dragomir MP, Monjé N, Keunecke C, Kunze CA, Schallenberg S, Marchenko S, Schmitt WD, Kulbe H, Sehouli J, Braicu IE, Jank P, Denkert C, Darb-Esfahani S, Horst D, Sinn BV, Sers C, Bischoff P[#], Taube ET[#].

Neoplasia. 2023 Oct;44:100934. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2023.100934>

Epub 2023 Sep 11. PMID: 37703626; PMCID: PMC10502412.

geteilte Letztautorenschaft

Im Folgenden ist das Abstract der Originalarbeit wiedergegeben (Übersetzung durch die Autorin).

„Hintergrund

Das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Reaktion des Immunsystems auf Tumore, seine genaue Rolle bei Krebs, insbesondere beim high-grade serösen Ovarialkarzinom (HGSOC), bleibt jedoch umstritten. Unser Ziel war es, den prognostischen Einfluss der IDO1-Expression und ihre Korrelation mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) bei HGSOC zu untersuchen.

Methoden

Immunhistochemische (IHC) Färbung und Biobildanalyse mit der QuPath-Software wurden eingesetzt, um die IDO1-Proteinexpression in einer gut charakterisierten Kohorte von 507 Patient:innen mit primärem HGSOC zu beurteilen. Die statistische

Auswertung wurde mit SPSS durchgeführt und eine In-silico-Validierung unter Berücksichtigung der IDO1-mRNA-Expression in Massen- und Einzelzell-Genexpressionsdatensätzen durchgeführt. Zusätzlich wurde die IDO1-Expression in Interferon-Gamma (IFNG)-stimulierten HGSOC-Zelllinien analysiert.

Ergebnisse

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die IDO1-Protein- und mRNA-Expression als positive prognostische Marker für das Gesamtüberleben (OS) und das progressionsfreie Überleben (PFS) bei HGSOC dienen. Eine hohe IDO1-Expression war mit einer signifikanten Verbesserung des OS um 21 Monate ($p < 0,001$) und des PFS um 6 Monate ($p = 0,016$) verbunden. Bemerkenswerterweise korrelierte eine erhöhte IDO1-Expression mit einer erhöhten Anzahl von CD3+ ($p < 0,001$), CD4+ ($p < 0,001$) und CD8+ TILs ($p < 0,001$). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine hohe IDO1-mRNA-Expression und eine hohe Proteinexpression mit einer verstärkten Reaktion auf proinflammatorische Zytokine, insbesondere IFNG, verbunden sind.

Schlussfolgerungen

Unsere Studie liefert Hinweise darauf, dass die IDO1-Expression als positiver Prognosemarker bei HGSOC dient und mit einer erhöhten Anzahl von CD3+-, CD4+- und CD8+-TILs verbunden ist. Das Verständnis der komplexen Beziehung zwischen IDO1, TILs und der Tumormikroumgebung könnte der Schlüssel zur Verbesserung der Therapie beim HGSOC sein.“

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante prognostische Relevanz verschiedener immunhistologisch am FFPE Material bestimmter Biomarker im HGSOE nachgewiesen werden. Dies hat methodisch-praktische, hypothetisch-biologische und im besten Fall zukünftig klinisch-therapeutische Implikationen.

4.1. Methodisch-praktische Überlegungen

Immunhistologische Färbungen weisen unterschiedliche Muster auf. Verschiedene Zellorganellen können sich anfärben und die Färbung wird dann entsprechend membranär, zytoplasmatisch oder nukleär exprimiert. Auch unterschiedliche Intensitäten sind möglich oder bestimmte Expressionsmuster wie z.B. das Wildtypexpressionsmuster gegenüber dem mutationstypischen Expressionsmuster bei p53. Wir verwendeten für die Auswertung, mit Ausnahme der Bestimmung von WT1 und ER- α , die Freeware QuPath (80) und nutzten für die Bestimmung des Cut-offs den Cut-off Finder der Universität Heidelberg https://molpathoheidelberg.shinyapps.io/CutoffFinder_v1 (104). Die Auswertung mit QuPath bringt die in der Einleitung beschriebene Verbesserung der Quantifizierbarkeit und Objektivierbarkeit der Ergebnisse mit sich. So sind auch feine Intensitätsunterschiede objektiv messbar. Nach Festlegung der Parameter ermittelt QuPath Prozentwerte positiver Zellen, bei Bedarf auch unterteilt in Tumor- und Stromakompartiment. Allerdings werden digitale immunhistologische Auswertemethoden bisher nicht in der klinischen Routine verwendet, hier wird vielmehr vom erfahrenen Pathologen ein Schätzwert ermittelt. Das bedeutet, ein Biomarker muss eine gewisse Robustheit bezüglich individueller Interpretationen sowohl der Intensität der als positiv zu wertenden Färbung als auch der Quantität der positiven Zellen aufweisen. Die Ermittlung eines Cut-offs mit einem Cut-off Finder ermöglicht zwar die Optimierung des Cut-offs hinsichtlich des gesetzten klinischen Endpunktes, birgt aber über multiples Testen die Gefahr eines nur zufällig signifikanten Cut-offs. Zudem ist der optimale Cut-off häufig eine ungerade Zahl, was sich schwierig mit der beschriebenen Praxis der visuellen Schätzung in der Pathologie vereinbaren lässt. Neben der Anwendbarkeit in der Pathologieroutine ist für die behandelnden Ärzte auch die Aussage der Intervallgröße, also um wieviel sich die Prognose zwischen beiden Gruppen unterscheidet, interessant. Auch die Gruppengröße ist wichtig, betrifft der Biomarker nur wenige oder doch einen deutlichen Anteil der Patient:innen.

Schlussendlich sind auch das Signifikanzniveau und die Aufrechterhaltung der Signifikanz in der multivariaten Analyse wichtig, je gravierender die Konsequenzen aus einem Unterschied, umso sicherer sollte in der Anwendung an Patient:innen die gefundene Erkenntnis sein. Im Gesamtkontext sind Kosten im Gesundheitssystem überlegenswert. Gelänge es also mit den gefundenen Biomarkern einen teuren z.B. molekularpathologischen Test zu ersetzen oder eine teure und zudem schädliche Übertherapie zu vermeiden, könnten vergleichsweise günstige, simple Methoden wie immunhistologische Marker sehr effizient sein.

Bei einem methodischen Vergleich der in dieser Arbeit vorgestellten publizierten Biomarker wird schnell deutlich, dass EVI1 bei den statistischen Kenngrößen die meisten Vorteile aufweist. Der Cut-off von 30% positiven Zellen ist ein guter Kompromiss zwischen optimalem klinischem Endpunkt und Praktikabilität in der Pathologieroutine. Die Bandbreite der möglichen Cut-offs beträgt > 90%, was, wie das Signifikanzniveau von $0,01 \times 10^{-12}$, auf eine gewisse Robustheit des Biomarkers hinweist. EVI1 bleibt auch in der multivariaten Analyse signifikant und bringt somit einen Informationsgewinn gegenüber etablierten prognostischen Parametern. Die Trennschärfe zwischen über und unter dem Cut-off von 30% verteilten Patientinnen beträgt circa 2 Jahre und ist damit nicht wenig. Das Expressionsmuster von EVI1 ist kräftig nukleär, was sich auch ohne digitale Unterstützung leicht evaluieren ließe. Neben EVI1 weisen auch PARP1 und WT1 einigermaßen konsistent gut ausgeprägte statistische Kenngrößen auf. WT1 wurde schon per IRS-Bestimmung durch eine Pathologin per visueller Schätzung ausgewertet und somit ist eine nachträgliche Rundung des Cut-offs nicht notwendig. Mit > 60% positiven Cut-offs im Cut-off Finder weist die Färbung eine ausreichende Robustheit auf und ist außerdem als diagnostischer Routineantikörper breit in Pathologielaboren vertreten. Ein Nachteil von WT1 wäre die geringe Trennschärfe von etwas mehr als einem Jahr zwischen hoher und niedriger Expression. Bei PARP1 ist als Schwäche eine aberrante zytoplasmatische Hintergrundfärbung zu nennen. Interessant hinsichtlich der Signifikanz wären vielleicht auch noch Tregs im Stroma, aber bei einem cut-off von 2,068 ist deren standardisierte Auswertung nicht ohne weiteres in den Alltag übertragbar.

4.2. Hypothetisch-biologische Überlegungen

Neben dem dokumentierten statistischen Zusammenhang interessieren, auch im Hinblick auf etwaige therapeutische Optionen, die tumorbiologischen Ursachen für einen Tumorprogress.

Wir haben uns in der vorliegenden Arbeit hypothesenbasiert für relativ experimentelle Marker interessiert, bei denen eine umfassende Aufklärung ihrer Bedeutung für die Tumorgenese noch nicht gelungen ist. Über die Analyse von *in-silico* und explorativen *in vitro* Daten und Einordnung in die aktuelle Literatur können aber zumindest Hypothesen über die zugrundeliegenden Mechanismen generiert werden.

Wie in dem Abschnitt methodisch-praktische Überlegungen aufgeführt, zeigte EVI1 das eindeutigste Färbemuster und die besten statistischen Parameter. In der EVI1-Publikation wurde ein statistischer Zusammenhang mit PARP1 dargestellt. PARP1 ist ein Bestandteil der Einzelstrangreparatur. Neben der therapeutisch genutzten synthetischen Letalität bei PARP-Inhibition, ist es offenbar bei familiären *BRCA*-mutierten-Mammakarzinomen hochreguliert (105) als Hinweis auf eine erhöhte Expression bei homologer Rekombinationsdefizienz. In diesen Zusammenhang würde auch passen, dass EVI1 ursprünglich im Rahmen der Fanconi-Anämie beschrieben wurde und einige Proteine der Fanconi-Anämie eine wichtige Rolle bei der homologen Rekombination spielen, als bekanntestes Beispiel sei hier RAD51 erwähnt (106). Da Patient:innen mit HRD Defizienz normalerweise gut auf die interkalierenden DNA-Schäden der platinhaltigen Chemotherapie ansprechen (107), wäre dies eine potentielle Erklärung für die assoziierte bessere Prognose von EVI1. An dem älteren Patientinnenkollektiv mit Erstdiagnose vor Zulassung des ersten PARP-Inhibitors Olaparib 2014 im platinsensitiven Rezidiv war eine Korrelation der EVI1 Expression mit *BRCA* Mutation bzw. homologer Rekombinationsdefizienz leider nicht möglich, da Letztere nicht retrospektiv bestimmt wurden. Weitere Untersuchungen zur Expression von EVI1 und PARP beim HGSOE mit bekanntem HRD-Status sind in Arbeit. Da der HRD-Status aktuell als wichtiger prädiktiver Test über einen komplizierten molekularpathologischen Algorithmus ermittelt wird, wäre eine geeignete immunhistologische Screeningmethode, vor dem Hintergrund explodierender Kosten im Gesundheitswesen, interessant. Als weiterer Mechanismus der EVI1-Protektion käme eine tumorsuppressive Wirkung über die Inhibition des TGF- β

Signaltransduktionsweges in Betracht (94). Insgesamt sind die Interaktionen von EVI1 nicht umfassend bekannt (108) und weitere Grundlagenforschung in Bezug auf die Assoziation mit HRD und dem TGF- β Signaltransduktionsweg sowie klinische Studien zur Validierung der prognostischen Relevanz und einer möglichen prädiktiven Aussage in Bezug auf PARP-Inhibitoren sind notwendig.

WT1 wird im normalen Erwachsenengewebe nicht exprimiert und in unserer Publikation diskutieren wir daher auch die mögliche Nutzung als Zielmolekül immunologischer Vakzinierungsstudien. Eine derartige Phase 1 Vakzinierungsstudie mit WT1 als Vakzin und dem PD-L1 Inhibitor Nivolumab zur Förderung der Immunantwort wurde 2016 - 2017 am Ovarialkarzinom durchgeführt und wies teilweise immunologisch spezifische Reaktionen auf die Vakzinierung sowie ein gutes progressionsfreies Überleben bei gleichzeitig tolerablen Nebenwirkungen auf (109).

Auch die Studien zu Tregs / TH17 Zellen und zu IDO1 beschäftigen sich mit der Auseinandersetzung zwischen HGSOE und Immunsystem. Seit der Entdeckung von Rezeptoren, mit denen Tumore offenbar die Immunantwort in ihrem Tumormikromilieu herunterregulieren können, wofür James P. Allison und Tasuko Honjo 2018 der Medizin nobelpreis verliehen wurde, werden große Hoffnungen in immunmodulatorische Therapien bei Tumoren gesetzt. Auch beim HGSOE konnte eine Assoziation von intratumoralen Lymphozyten mit Langzeitüberleben (89) bzw. mit der Prognose festgestellt werden (90). Bereits 2011 wurden vier verschiedene Subtypen des HGSOE definiert (40), die auch auf die Morphologie übertragbar sind und von denen der immunreaktive Subtyp, gekennzeichnet durch vermehrt tumorinfiltrierende Lymphozyten, die beste Prognose aufweist (110). Trotzdem funktioniert die Immuntherapie mit PD-L1 Checkpointinhibitoren beim HGSOE nicht gut (67). Anders als MSI endometrioid oder klarzellige Adenokarzinome, die durch eine hohe Tumormutationslast mit Bildung von Neoantigenen und höheren CD8 positiven zytotoxischen T-Zell-Infiltraten ausgezeichnet werden (111), weisen HGSOE meist eine eher niedrige Mutationslast mit weniger Neoantigenen und einer geringeren Immunantwort CD8 positiver TILS auf (112). In Anbetracht der chromosomalen Instabilität der HGSOE ist die geringe Immunantwort erstaunlich. Offenbar sind die durch Doppelstrangbrüche entstehenden chromosomalen Kopienzahlvariationen nicht immunologisch. Neoantigene entstehen zudem seltener aus Treibermutationen in bekannten Onkogenen wie z.B. *KRAS*, sondern vielmehr als möglicherweise

biologisch eher unwirksame, zufällige Mutationen defizienter Einzelstrangreparaturmechanismen (113). Aber trotz der geringeren Anzahl von Neoepitopen kommen spezifische gegen den Tumor gerichtete T-Zellen in HGSOC vor (114). Möglicherweise regulieren andere Checkpointmoleküle wie LAG-3 oder CTLA4 eine Interferon- γ medierte eher prognostisch günstige Immunantwort für die Patientinnen mit HGSOC (115). Diese Beobachtung konnten wir untermauern durch die Zelllinienanalyse, die eine erhöhte IDO1 Expression nach Interferon- γ Stimulation in HGSOC Zelllinien aufwies und passt zu der von uns gezeigten besseren Prognose bei erhöhter IDO1 Expression in den Tumorzellen. Gleichzeitig konnten wir eine erhöhte Anzahl CD3, CD8 und CD4 positiver tumorassoziierter Lymphozyten bei erhöhter IDO1 Expression nachweisen. Der kausale Zusammenhang ist hierbei nicht ganz klar; bekannt ist eine IDO1-Expression von Epithelzellen bei Entzündungen. Die erwähnten Lymphozyten könnten entsprechend die IDO1-Expression in den Tumorzellen induziert haben, welche nun über den negativen Rückkopplungsmechanismus IDO1-Tryptophan-Kynurenin ihrerseits das Immunsystem hemmen (98). Allerdings gibt es auch Studien, wonach Tumorzellen vermehrt Immuncheckpointinhibitoren - unter anderem IDO1 - exprimieren, unabhängig von einer immunologischen Notwendigkeit, sondern eher als Nebeneffekt einer Aktivierung des TGF- β Signalweges im Rahmen einer allgemeinen Hochregulation der Proliferation (116). Tatsächlich haben wir in unserer Publikation *in silico* eine negative IDO1 Korrelation mit Genen des TGF- β Signaltransduktionsweges im TCGA-Datensatz und in den single-cell-Analysen zeigen können (117). Auch downstream ist der Wirkmechanismus von IDO1 in Geweben noch nicht vollständig aufgeklärt. Ursprünglich vermutete man eine immunsuppressive, tumorfördernde Wirkung über den vermehrten Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu Kynureninen (118). Diesem Ansatz steht entgegen, dass eine medikamentöse Inhibition von IDO1 in Tumoren bisher nicht den erwarteten immunfördernden Effekt hatte (119). Und tatsächlich scheinen die Effekte von IDO1 ambivalent und je nach Tumorentität unterschiedlich (120). So konnte z.B. bei Melanomen - ähnlich wie von uns beim HGSOC - , eine positive prognostische Korrelation gezeigt werden, ganz im Gegensatz zum Glioblastom (120). Es wird daher angenommen, dass die

Interaktionen von IDO1 im Gewebe möglicherweise organspezifisch und insgesamt komplexer sind als bisher bekannt.

Eine weitere Wirkung des TGF- β Signaltransduktionsweges und indirekt auch des IDO1-AHR Signalweges scheint die Transdifferenzierung TH17 positiver T-Helferzellen in regulatorische T-Zellen zu sein, ein eher immunsuppressiver Effekt (92).

In der Publikation von Marchenko *et al.* beschäftigen wir uns mit den regulatorischen T-Zellen und den TH17 Zellen (121). Wir konnten eine schwache inverse Korrelation der regulatorischen und der TH17 Zellen nachweisen, was zu der These passt, dass sich die beiden Zelltypen gegenseitig bedingen. Weiterhin konnten wir zeigen, dass regulatorische T-Zellen, insbesondere im tumorassoziierten Stroma mit einer besseren Prognose assoziiert sind. Auch wenn andere Autoren in anderen Karzinomen eine ähnliche Beobachtung nachweisen konnten (122), widerspricht die vorteilhafte Prognose auf den ersten Blick der allgemeinen Annahme, dass regulatorische T-Zellen durch Immunsuppression eher eine pro-kanzerogene Wirkung haben (123). Aber schon Whiteside weist darauf hin, dass die Immunsuppression kontextbezogen durchaus auch die Karzinogenese hemmen kann (123). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass zwar regulatorische T-Zellen von IDO1 und dem TGF- β Signalweg induziert werden, sie aber selbst ebenfalls mittels einer positiven Rückkopplung über IDO1 und den TGF- β Signalweg die Immunsuppression in Gang halten (124). Warum wir eine bessere Prognose bei vermehrten regulatorischen T-Zellen im Gewebe fanden, ist nicht ganz klar. Die regulatorischen T-Zellen könnten Ausdruck einer allgemeinen Immunaktivierung der Tumore sein und nur eine kleine Zellpopulation der insgesamt vermehrten Immunzellen bei diesen Patientinnen ausmachen. Statt der absoluten Anzahl wäre dann eher die Fraktion an der gesamten T-Zell-Populationen interessant, eine erste Annäherung weist unsere Ratio der TH17/Treg Zellen mit positiver prognostischer Signifikanz auf. Weiterhin ist noch nicht bekannt inwiefern die Lokalisation der regulatorischen T-Zellen im Tumor- oder Stromakompartiment relevant ist.

Zusammenfassend können wir feststellen, dass möglicherweise die von uns beschriebenen Proteine und Zelltypen über den Tryptophanmetabolismus und / oder den TGF- β Signaltransduktionsweg immunonkologisch am HGSOE beteiligt sind,

dass die Interaktionen aber ausgesprochen komplex sind. In Anbetracht der rasanten Entwicklungen auf dem Gebiet der Immuntherapien bei Karzinomen, bringt weitere Forschung hoffentlich Klarheit in die Prozesse beim HGSOC, damit auch diese Patientinnen von einer solchen Therapie profitieren können.

Die Expressionsstudie von LRP1B als Indikatorprotein widmete sich weniger dem Tryptophanmetabolismus als vielmehr dem Lipidmetabolismus. Dieser spielt im HGSOC bei der frühen Metastasierung in das subperitoneale adipozytäre Weichgewebe eine wesentliche Rolle (125) und ist wichtig bei der Applikation lipidgängiger Medikamente wie z.B. pegyliertem liposomalen Doxorubicin in der platinresistenten Situation (126). Weiterhin gilt LRP1B als Tumorsuppressor (127). In diesem Zusammenhang ist die positive prognostische Assoziation der LRP1B Proteinexpression gut erklärbar. Eine prädiktive Untersuchung in Bezug auf applizierte Chemotherapien war im Rahmen der Studie leider nicht möglich.

4.3. Klinisch-therapeutische Implikationen

Die vorgestellten Studien sind explorative Analysen. Für eine Anwendung in der klinischen Routine sind umfangreiche prospektive Validierungsstudien notwendig. Es ist zu erwarten, dass die meisten der hier vorgestellten Biomarker, aufgrund der aufgeführten methodisch-technischen Überlegungen, nicht unmittelbar in die pathologische Routine übertragbar sind. Der technisch optimalste Marker war EVI1, weitere Untersuchungen auf seine Assoziation mit HRD werden durchgeführt. Prospektive Studien zur Reproduzierbarkeit der prognostischen Relevanz und der immunonkologischen Mechanismen der regulatorischen T-Zellen, TH17 Zellen und IDO1 sind notwendig. Auch LRP1B ist methodisch besser digital assistiert auswertbar, klinisch wären insbesondere prädiktive Studien in Kohorten platinresistenter Patientinnen interessant. Aber auch wenn die erzielten Ergebnisse keinen direkten Einfluss auf die Entwicklung neuer erfolgversprechender Therapien wie z.B. der ermutigenden Kombination von PD-L1 Inhibitor und Vakzine gegen WT1 beim HGSOC (109) haben, so können Ergebnisse der Publikationen doch indirekt durch Wissenszuwachs zum Fortschritt auch für das HGSOC beitragen.

4.4. Additive *in-silico*, *in vitro*, scRNA seq Methoden

Additive Methoden können Biomarkerstudien ergänzen und einerseits zur Auswahl der zu testenden Antikörper, andererseits zur Bestätigung und Erklärung gefundener Ergebnisse verwendet werden.

Zur Auswahl von Biomarkern wurde z.B. in der Publikation zu AHRR und SFRP2 (accepted beim bjc 12.2023) mittels des Oncology Biomarker Panels von HTG-Edge Sequencing eine kleine Kohorte (n=24) gepaarter primärer und rezidivierter Ovariakarzinome auf Geneexpressionslevel (mRNA) von 2549 Genen untersucht. Anschließend wurden die Genlevel auf Unterschiede zwischen primären und rezidivierten HGSOE analysiert, was 233 abweichende Gene ergab. Diese wiederum wurden mittels Kaplan-Meier Plotter auf ihre prognostische Signifikanz *in-silico* getestet, womit nach Korrektur für multiples Testen noch 23 differente Gene zwischen primär und rezidivierten Ovariakarzinomen resultierten. Ein Teil der Gene konnte mittels Gen set enrichment Analyse biologischen Prozessen zugeordnet werden. Schlussendlich erfolgte die Auswahl von 7 immunhistologischen Markern aus den verbliebenen 23 different exprimierten Genen auch auf Basis praktischer Überlegungen, früherer Studien und Literaturrecherchen. Der Vorteil dieser Biomarkerauswahl besteht in der optimalen Nutzung der generierten umfangreichen Genexpressionslevel einer kleinen Patientinnengruppe.

In den in dieser Arbeit vorgestellten Publikationen wird der Kaplan-Meier Plotter benutzt zur Unterstreichung der Ergebnisse auf mRNA Ebene. Neben den in der Einleitung dargelegten Schwierigkeiten der translationalen und transkriptionellen Modifikation sowie der diagnostischen Präzision zwischen low- und high-grade serösen Adenokarzinomen, entstehen hier, gerade bei selteneren Affymetrix Arrays auch Probleme mit der Kollektivgröße. Als Beispiel war FOXP3 (Affymetrix-ID: "224211_at") nicht im TCGA-Datensatz enthalten und das gesamte *in-silico* Kollektiv umfasste nur 502 Patientinnen. Für unsere aktuelleren Studien gelang uns die Zusammenstellung eines ähnlich großen, sorgfältig ausgewählten, eigenen Kollektivs, mit der zusätzlichen Information einer immunhistologisch mutationstypischen p53 Expression.

Bei der cbiportal Analyse relevanter Signalwege im TCGA-Datensatz waren es zwischen 299 (128) und 617 (129) Patientinnen und bei den single-cell Analysen

waren es bei Olbrecht 7 (130) und bei Olalekan 6 Patientinnen (131). Kompensatorisch ist die Menge der pro Patientin generierten Information natürlich wesentlich größer und so gelingt die Verifizierung der IDO1 und der EVI1 Expression auf den Tumorzellen und die Einbindung von IDO1 in verschiedene immunologische Reaktionsmuster für die cBioportal und die single-cell Analysen. Mechanistisch ist die Funktion von IDO1 damit aber auch noch nicht vollumfänglich geklärt, Fragen nach Ursache - Wirkungsbeziehungen bleiben offen. Interessant ist in diesem Zusammenhang das Zellkulturexperiment, das eine Stimulation von IDO1 nach Applikation von Interferon- γ darstellen konnte. Gleichzeitig werden neue Fragen aufgeworfen. So war die Stimulation von IDO1 in der nicht p53 Wildtyp, eher nicht HGSOC Zelllinie weniger ausgeprägt. Dies unterstreicht die Notwendigkeit präziser Diagnosen in experimentellen Kohorten.

4.5. Ausblick

Wir konnten interessante Einblicke in die prognostische Relevanz verschiedener Biomarker gewinnen. Zur Übertragung in die klinische Routine werden prospektive Untersuchungen und standardisierte Reproduzierbarkeit, validiert im Rahmen von Ringversuchen, notwendig sein. Inwieweit digitale Methoden hierzu in der Pathologie Anwendung finden werden, bleibt abzuwarten.

Auch wenn wir ein relativ großes Kollektiv gut charakterisierter, HGSOC zusammengestellt haben, wird es notwendig sein, dieses kontinuierlich zu aktualisieren. So könnte eine Verbesserung der Prognose des Ovarialkarzinoms nach Zulassung der PARP Inhibitoren in der Erhaltungstherapie zumindest für HRD positive Patientinnen ab 2020, eine entsprechende Stratifizierung des Kollektivs nach HRD-Status und Erhaltungstherapie erstrebenswert machen.

Die Erklärung biologischer Zusammenhänge wäre natürlich optimal im Hinblick auf die Entwicklung von Therapien. In der Publikation zu AHRR und SFRP2 (accepted bjc 12.2023) haben wir daher die beiden Marker zu regulatorischen und effektiven Veränderungen weiter untersucht. Methylierungsanalysen gaben Hinweise auf einen regulatorischen Einfluss auf die AHRR Proteinexpression. Das Abschalten von AHRR im Zellkulturexperiment bestärkte die Annahme der tumorsuppressiven Funktion. Die

Funktionen von SFRP2 sind kontextbezogen offenbar unterschiedlich. Interessant ist, dass nach SFRP2 Aktivierung in einer HGSOC Zelllinien, proteomisch eine Hochregulation anderer tumorfördernder Proteine nachgewiesen werden konnte [accepted bjc 2023].

Gerade in der Immunonkologie kommt die lokoregionäre Verteilung der Zellen in Tumor- oder Stromakompartiment für das Verständnis ihrer Funktion als relevanter Parameter hinzu. Multiplex Imaging Verfahren könnten hier in Zukunft die Vorteile einer hohen Datengenerierung und einer räumlichen Analyse vereinen (132).

5. Zusammenfassung

Ovariakarzinome zeichnen sich durch eine hohe Mortalität aus. In der Ära der Präzisionsmedizin sind Biomarker zur Patientinnenstratifizierung dringend erforderlich. Die vorliegende Arbeit untersucht proteomische immunhistologische Biomarker (WT1, ER- α , Treg, TH17, EVI1, PARP1, IDO1 und LRP1B) an einem großen, gut charakterisierten Kollektiv von Patientinnen mit HGSOC auf prognostische Signifikanz. *In silico* und *in vitro* Analysen werden zur Bestätigung und zur mechanistischen Erklärung der gefundenen Ergebnisse herangezogen.

Biologisch konnten wir Hinweise auf eine Signifikanz des TGF- β Signaltransduktionsweges, des Lipid- und Tryptophanmetabolismus sowie immunologischer Regulationsmechanismen herausstellen. Die Ergebnisse liefern einen Beitrag zur Klärung der einzigartigen Prozesse beim HGSOC.

6. Literatur

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17-48.
2. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):7-33.
3. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7-33.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7-30.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
6. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(4):284-96.
7. Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol.* 2012;55(1):3-23.
8. Elias KM, Guo J, Bast RC, Jr. Early Detection of Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2018;32(6):903-14.
9. Armbrust R, Ledwon P, Von Rusten A, Schneider C, Sehouli J. Primary Treatment Results in Patients with Ovarian, Fallopian or Peritoneal Cancer-Results of a Clinical Cancer Registry Database Analysis in Germany. *Cancers (Basel).* 2022;14(19).
10. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011;365(26):2473-83.
11. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Perol D, Gonzalez-Martin A, Berger R, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2416-28.
12. Eskander RN, Moore KN, Monk BJ, Herzog TJ, Annunziata CM, O'Malley DM, Coleman RL. Overcoming the challenges of drug development in platinum-resistant ovarian cancer. *Front Oncol.* 2023;13:1258228.
13. Virchow R. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. . Berlin: Verlag von August Hirschwald; 1858.
14. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
15. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 2017;7(5):1016-36.
16. Grothey A, Fakih M, Tabernero J. Management of BRAF-mutant metastatic colorectal cancer: a review of treatment options and evidence-based guidelines. *Ann Oncol.* 2021;32(8):959-67.
17. Desrichard A, Snyder A, Chan TA. Cancer Neoantigens and Applications for Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2016;22(4):807-12.
18. Savory H, Nash WG. A Case of Acute Intestinal Obstruction Due to a Papillomatous Ovarian Cyst and a Carcinoma of Small Intestine, Treated by Ovariectomy and Enterectomy: Recovery. *Br Med J.* 1901;1(2099):698-9.

19. Kurman RJ, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014. 307 p. p.
20. Bodelon C, Killian JK, Sampson JN, Anderson WF, Matsuno R, Brinton LA, et al. Molecular Classification of Epithelial Ovarian Cancer Based on Methylation Profiling: Evidence for Survival Heterogeneity. *Clin Cancer Res.* 2019;25(19):5937-46.
21. Klein O, Kanter F, Kulbe H, Jank P, Denkert C, Nebrich G, et al. MALDI-Imaging for Classification of Epithelial Ovarian Cancer Histotypes from a Tissue Microarray Using Machine Learning Methods. *Proteomics Clin Appl.* 2019;13(1):e1700181.
22. Kurman RJ, Shih le M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol.* 2011;42(7):918-31.
23. Kurman RJ, Shih le M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(3):433-43.
24. Yamaguchi K, Mandai M, Toyokuni S, Hamanishi J, Higuchi T, Takakura K, Fujii S. Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clin Cancer Res.* 2008;14(1):32-40.
25. Borrelli GM, Abrao MS, Taube ET, Darb-Esfahani S, Kohler C, Chiantera V, Mechsner S. (Partial) Loss of BAF250a (ARID1A) in rectovaginal deep-infiltrating endometriosis, endometriomas and involved pelvic sentinel lymph nodes. *Mol Hum Reprod.* 2016;22(5):329-37.
26. Borrelli GM, Abrao MS, Taube ET, Darb-Esfahani S, Kohler C, Kaufmann AM, et al. Immunohistochemical Investigation of Metastasis-Related Chemokines in Deep-Infiltrating Endometriosis and Compromised Pelvic Sentinel Lymph Nodes. *Reprod Sci.* 2015;22(12):1632-42.
27. Cancer Genome Atlas Research N, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.* 2013;497(7447):67-73.
28. Bouchez C, Kempf E, Tournigand C. [MSI Metastatic solid tumors treatment and immunotherapies]. *Bull Cancer.* 2019;106(2):143-50.
29. Krukenberg FE. Über das Fibrosarcoma ovarii mucocellulare (carcinomatodes). *Archiv für Gynäkologie.* 1986(50):287-321.
30. Simons M, Simmer F, Bulten J, Ligtenberg MJ, Hollema H, van Vliet S, et al. Two types of primary mucinous ovarian tumors can be distinguished based on their origin. *Mod Pathol.* 2020;33(4):722-33.
31. Cancer IAfRo. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Female genital tumours. : Lyon (France); 2020.
32. Abobaker S, Kulbe H, Taube ET, Darb-Esfahani S, Richter R, Denkert C, et al. Polycomb Protein BMI-1 as a Potential Therapeutic Target in Mucinous Ovarian Cancer. *Anticancer Res.* 2022;42(4):1739-47.
33. EINaggar A, Robins D, Baca Y, Arguello D, Ulm M, Arend R, et al. Genomic profiling in low grade serous ovarian cancer: Identification of novel markers for disease diagnosis and therapy. *Gynecol Oncol.* 2022;167(2):306-13.
34. Wang Y, Hong S, Mu J, Wang Y, Lea J, Kong B, Zheng W. Tubal Origin of "Ovarian" Low-Grade Serous Carcinoma: A Gene Expression Profile Study. *J Oncol.* 2019;2019:8659754.
35. Sehoul J, Braicu EI, Richter R, Denkert C, Jank P, Jurmeister PS, et al. Prognostic significance of Ki-67 levels and hormone receptor expression in low-grade serous ovarian carcinoma: an investigation of the Tumor Bank Ovarian Cancer Network. *Hum Pathol.* 2019;85:299-308.

36. Grabowski JP, Martinez Vila C, Richter R, Taube E, Plett H, Braicu E, Sehouli J. Ki67 expression as a predictor of chemotherapy outcome in low-grade serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2020;30(4):498-503.
37. Grabowski JP, Glajzer J, Richter R, Plett H, Muallem MZ, Braicu EI, et al. Lymphovascular space invasion and Ki67 as predictors of lymph node metastasis in primary low grade serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2021;31(1):98-103.
38. Labidi-Galy SI, Papp E, Hallberg D, Niknafs N, Adleff V, Noe M, et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat Commun*. 2017;8(1):1093.
39. Visvanathan K, Vang R, Shaw P, Gross A, Soslow R, Parkash V, et al. Diagnosis of serous tubal intraepithelial carcinoma based on morphologic and immunohistochemical features: a reproducibility study. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(12):1766-75.
40. Cancer Genome Atlas Research N. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.
41. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology*. 2008;134(4):988-97.
42. Germano G, Lamba S, Rospo G, Barault L, Magri A, Maione F, et al. Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. *Nature*. 2017;552(7683):116-20.
43. Lang F, Schrors B, Lower M, Tureci O, Sahin U. Identification of neoantigens for individualized therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21(4):261-82.
44. Agupitan AD, Neeson P, Williams S, Howitt J, Haupt S, Haupt Y. P53: A Guardian of Immunity Becomes Its Saboteur through Mutation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10).
45. Blagih J, Buck MD, Vousden KH. p53, cancer and the immune response. *J Cell Sci*. 2020;133(5).
46. Puttock EH, Tyler EJ, Manni M, Maniati E, Butterworth C, Burger Ramos M, et al. Extracellular matrix educates an immunoregulatory tumor macrophage phenotype found in ovarian cancer metastasis. *Nat Commun*. 2023;14(1):2514.
47. Menon U, Gentry-Maharaj A, Hallett R, Ryan A, Burnell M, Sharma A, et al. Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Lancet Oncol*. 2009;10(4):327-40.
48. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. 2011;17(11):1498-503.
49. Salk JJ, Loubet-Seneor K, Maritschnegg E, Valentine CC, Williams LN, Higgins JE, et al. Ultra-Sensitive TP53 Sequencing for Cancer Detection Reveals Progressive Clonal Selection in Normal Tissue over a Century of Human Lifespan. *Cell Rep*. 2019;28(1):132-44 e3.
50. Trinidad CV, Pathak HB, Cheng S, Tzeng SC, Madan R, Sardi ME, et al. Lineage specific extracellular vesicle-associated protein biomarkers for the early detection of high grade serous ovarian cancer. *Sci Rep*. 2023;13(1):18341.
51. Niemira M, Erol A, Bielska A, Zeller A, Skwarska A, Chwialkowska K, et al. Identification of serum miR-1246 and miR-150-5p as novel diagnostic biomarkers for high-grade serous ovarian cancer. *Sci Rep*. 2023;13(1):19287.

52. Asangba AE, Chen J, Goergen KM, Larson MC, Oberg AL, Casarin J, et al. Diagnostic and prognostic potential of the microbiome in ovarian cancer treatment response. *Sci Rep.* 2023;13(1):730.
53. Hanley GE, Pearce CL, Talhouk A, Kwon JS, Finlayson SJ, McAlpine JN, et al. Outcomes From Opportunistic Salpingectomy for Ovarian Cancer Prevention. *JAMA Netw Open.* 2022;5(2):e2147343.
54. Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren AWMF-Registernummer: 032/035OL2022 [Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>].
55. Addley S, McGowan M, Crossland H, Johnson A, Asher V, Bali A, et al. Neoadjuvant chemotherapy does not reduce surgical complexity nor the accuracy of intraoperative visual assessment of disease in advanced ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2023;49(11):107078.
56. Harter P, Sehouli J, Lorusso D, Reuss A, Vergote I, Marth C, et al. A Randomized Trial of Lymphadenectomy in Patients with Advanced Ovarian Neoplasms. *N Engl J Med.* 2019;380(9):822-32.
57. Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4 AWMF Registernummer: 032-045OL2021 [Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>].
58. Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL2019 [Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/>].
59. Grabowski JP, Harter P, Heitz F, Pujade-Lauraine E, Reuss A, Kristensen G, et al. Operability and chemotherapy responsiveness in advanced low-grade serous ovarian cancer. An analysis of the AGO Study Group metadatabase. *Gynecol Oncol.* 2016;140(3):457-62.
60. Rose PG, Mahdi H, Jernigan A, Yang B. Activity of Bevacizumab in Patients With Low-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2016;26(6):1048-52.
61. Gershenson DM, Bodurka DC, Coleman RL, Lu KH, Malpica A, Sun CC. Hormonal Maintenance Therapy for Women With Low-Grade Serous Cancer of the Ovary or Peritoneum. *J Clin Oncol.* 2017;35(10):1103-11.
62. Gershenson DM, Miller A, Brady WE, Paul J, Carty K, Rodgers W, et al. Trametinib versus standard of care in patients with recurrent low-grade serous ovarian cancer (GOG 281/LOGS): an international, randomised, open-label, multicentre, phase 2/3 trial. *Lancet.* 2022;399(10324):541-53.
63. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 2005;434(7035):917-21.
64. Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim BG, Oaknin A, Friedlander M, et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(26):2495-505.
65. Gonzalez-Martin A, Pothuri B, Vergote I, DePont Christensen R, Graybill W, Mirza MR, et al. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2391-402.
66. Keener A. Innovative therapies to tackle platinum-resistant ovarian cancer. *Nature.* 2021;600:S45-S7.

67. Pawlowska A, Rekowska A, Kurylo W, Panczyszyn A, Kotarski J, Wertel I. Current Understanding on Why Ovarian Cancer Is Resistant to Immune Checkpoint Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2023;24(13).
68. Varade J, Magadan S, Gonzalez-Fernandez A. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(4):805-28.
69. Kühn KG. *Claudii Galeni Opera Omnia.* Leipzig: Karl Gottlob Kühn; 1830. S. 574–628 p.
70. Dodson A, Parry S, Ibrahim M, Bartlett JM, Pinder S, Dowsett M, Miller K. Breast cancer biomarkers in clinical testing: analysis of a UK national external quality assessment scheme for immunocytochemistry and in situ hybridisation database containing results from 199 300 patients. *J Pathol Clin Res.* 2018;4(4):262-73.
71. Jesinghaus M, Schmitt M, Lang C, Reiser M, Scheiter A, Konukiewicz B, et al. Morphology Matters: A Critical Reappraisal of the Clinical Relevance of Morphologic Criteria From the 2019 WHO Classification in a Large Colorectal Cancer Cohort Comprising 1004 Cases. *Am J Surg Pathol.* 2021;45(7):969-78.
72. Doroshov DB, Bhalla S, Beasley MB, Sholl LM, Kerr KM, Gnjatic S, et al. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(6):345-62.
73. Miglietta F, Griguolo G, Bottosso M, Giarratano T, Lo Mele M, Fassan M, et al. Evolution of HER2-low expression from primary to recurrent breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2021;7(1):137.
74. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature.* 2008;452(7187):548-52.
75. Wimmer I, Troscher AR, Brunner F, Rubino SJ, Bien CG, Weiner HL, et al. Systematic evaluation of RNA quality, microarray data reliability and pathway analysis in fresh, fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Sci Rep.* 2018;8(1):6351.
76. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:289-98.
77. Chien J, Neums L, Powell A, Torres M, Kalli KR, Multinu F, et al. Genetic Evidence for Early Peritoneal Spreading in Pelvic High-Grade Serous Cancer. *Front Oncol.* 2018;8:58.
78. Kolb S, Hoffmann I, Monje N, Dragomir MP, Jank P, Bischoff P, et al. LRP1B-a prognostic marker in tubo-ovarian high-grade serous carcinoma. *Hum Pathol.* 2023;141:158-68.
79. Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(24):1897-906.
80. Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):16878.
81. Bankhead P, Fernandez JA, McArt DG, Boyle DP, Li G, Loughrey MB, et al. Integrated tumor identification and automated scoring minimizes pathologist involvement and provides new insights to key biomarkers in breast cancer. *Lab Invest.* 2018;98(1):15-26.
82. Aung TN, Acs B, Warrell J, Bai Y, Gaule P, Martinez-Morilla S, et al. A new tool for technical standardization of the Ki67 immunohistochemical assay. *Mod Pathol.* 2021;34(7):1261-70.
83. Rehm. *Proteomics. Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics Experimentator* Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2016. p. PP: 233-46.

84. Gyorffy B, Lanczky A, Szallasi Z. Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(2):197-208.
85. Gyorffy B. Discovery and ranking of the most robust prognostic biomarkers in serous ovarian cancer. *Geroscience*. 2023;45(3):1889-98.
86. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*. 2001;273(2):141-61.
87. He H, Luthringer DJ, Hui P, Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Expression of CD56 and WT1 in ovarian stroma and ovarian stromal tumors. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(6):884-90.
88. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(38):13885-90.
89. Darb-Esfahani S, Kolaschinski I, Trillsch F, Mahner S, Concin N, Vergote I, et al. Morphology and tumour-infiltrating lymphocytes in high-stage, high-grade serous ovarian carcinoma correlated with long-term survival. *Histopathology*. 2018;73(6):1002-12.
90. Hwang WT, 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.
91. Sun B, Zhang Y. Overview of orchestration of CD4+ T cell subsets in immune responses. *Adv Exp Med Biol*. 2014;841:1-13.
92. Gagliani N, Amezcua Vesely MC, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*. 2015;523(7559):221-5.
93. Rempel E, Kluck K, Beck S, Ourailidis I, Kazdal D, Neumann O, et al. Pan-cancer analysis of genomic scar patterns caused by homologous repair deficiency (HRD). *NPJ Precis Oncol*. 2022;6(1):36.
94. Kurokawa M, Mitani K, Irie K, Matsuyama T, Takahashi T, Chiba S, et al. The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. *Nature*. 1998;394(6688):92-6.
95. Tonnies H, Huber S, Kuhl JS, Gerlach A, Ebell W, Neitzel H. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood*. 2003;101(10):3872-4.
96. Campesato LF, Budhu S, Tchaicha J, Weng CH, Gigoux M, Cohen IJ, et al. Blockade of the AHR restricts a Treg-macrophage suppressive axis induced by L-Kynurenine. *Nat Commun*. 2020;11(1):4011.
97. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2008;453(7191):65-71.
98. Seo SK, Kwon B. Immune regulation through tryptophan metabolism. *Exp Mol Med*. 2023;55(7):1371-9.
99. Gharpure KM, Pradeep S, Sans M, Rupaimoole R, Ivan C, Wu SY, et al. FABP4 as a key determinant of metastatic potential of ovarian cancer. *Nat Commun*. 2018;9(1):2923.
100. Shao H, Mohamed EM, Xu GG, Waters M, Jing K, Ma Y, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1A functions to repress FoxO transcription factors to allow cell cycle progression in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016;7(4):3832-46.

101. Wang Y, Wang Y, Shen L, Pang Y, Qiao Z, Liu P. Prognostic and therapeutic implications of increased ATP citrate lyase expression in human epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2012;27(4):1156-62.
102. Cai Y, Wang J, Zhang L, Wu D, Yu D, Tian X, et al. Expressions of fatty acid synthase and HER2 are correlated with poor prognosis of ovarian cancer. *Med Oncol.* 2015;32(1):391.
103. de Beer MC, Zhao Z, Webb NR, van der Westhuyzen DR, de Villiers WJ. Lack of a direct role for macrosialin in oxidized LDL metabolism. *J Lipid Res.* 2003;44(4):674-85.
104. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One.* 2012;7(12):e51862.
105. Klauke ML, Hoogerbrugge N, Budczies J, Bult P, Prinzler J, Radke C, et al. Higher cytoplasmic and nuclear poly(ADP-ribose) polymerase expression in familial than in sporadic breast cancer. *Virchows Arch.* 2012;461(4):425-31.
106. Mekonnen N, Yang H, Shin YK. Homologous Recombination Deficiency in Ovarian, Breast, Colorectal, Pancreatic, Non-Small Cell Lung and Prostate Cancers, and the Mechanisms of Resistance to PARP Inhibitors. *Front Oncol.* 2022;12:880643.
107. Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD. Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discov.* 2015;5(11):1137-54.
108. Bard-Chapeau EA, Gunaratne J, Kumar P, Chua BQ, Muller J, Bard FA, et al. EVI1 oncoprotein interacts with a large and complex network of proteins and integrates signals through protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(31):E2885-94.
109. Manning-Geist BL, Gnjjatic S, Aghajanian C, Konner J, Kim SH, Sarasohn D, et al. Phase I Study of a Multivalent WT1 Peptide Vaccine (Galinpepimut-S) in Combination with Nivolumab in Patients with WT1-Expressing Ovarian Cancer in Second or Third Remission. *Cancers (Basel).* 2023;15(5).
110. Murakami R, Matsumura N, Mandai M, Yoshihara K, Tanabe H, Nakai H, et al. Establishment of a Novel Histopathological Classification of High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Correlated with Prognostically Distinct Gene Expression Subtypes. *Am J Pathol.* 2016;186(5):1103-13.
111. Nonomura Y, Nakayama K, Nakamura K, Razia S, Yamashita H, Ishibashi T, et al. Ovarian Endometrioid and Clear Cell Carcinomas with Low Prevalence of Microsatellite Instability: A Unique Subset of Ovarian Carcinomas Could Benefit from Combination Therapy with Immune Checkpoint Inhibitors and Other Anticancer Agents. *Healthcare (Basel).* 2022;10(4).
112. Fan S, Gao X, Qin Q, Li H, Yuan Z, Zhao S. Association between tumor mutation burden and immune infiltration in ovarian cancer. *Int Immunopharmacol.* 2020;89(Pt A):107126.
113. Schumacher TN, Scheper W, Kvistborg P. Cancer Neoantigens. *Annu Rev Immunol.* 2019;37:173-200.
114. Bobisse S, Genolet R, Roberti A, Tanyi JL, Racle J, Stevenson BJ, et al. Sensitive and frequent identification of high avidity neo-epitope specific CD8 (+) T cells in immunotherapy-naive ovarian cancer. *Nat Commun.* 2018;9(1):1092.
115. Fucikova J, Rakova J, Hensler M, Kasikova L, Belicova L, Hladikova K, et al. TIM-3 Dictates Functional Orientation of the Immune Infiltrate in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(15):4820-31.

116. Abooli M, Yasinska IM, Schlichtner S, Ruggiero S, Berger SM, Cholewa D, et al. Activation of immune evasion machinery is a part of the process of malignant transformation of human cells. *Transl Oncol.* 2023;39:101805.
117. Hoffmann I, Dragomir MP, Monje N, Keunecke C, Kunze CA, Schallenberg S, et al. Increased expression of IDO1 is associated with improved survival and increased number of TILs in patients with high-grade serous ovarian cancer. *Neoplasia.* 2023;44:100934.
118. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 2003;9(10):1269-74.
119. Opitz CA, Somarribas Patterson LF, Mohapatra SR, Dewi DL, Sadik A, Platten M, Trump S. The therapeutic potential of targeting tryptophan catabolism in cancer. *Br J Cancer.* 2020;122(1):30-44.
120. Zhai L, Ladomersky E, Lenzen A, Nguyen B, Patel R, Lauing KL, et al. IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(5):447-57.
121. Marchenko S, Piwonski I, Hoffmann I, Sinn BV, Kunze CA, Monje N, et al. Prognostic value of regulatory T cells and T helper 17 cells in high grade serous ovarian carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2023;149(6):2523-36.
122. Frey DM, Drosner RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, et al. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2010;126(11):2635-43.
123. Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol.* 2012;22(4):327-34.
124. de Stree G, Bertrand C, Chalon N, Lienart S, Bricard O, Lecomte S, et al. Selective inhibition of TGF-beta1 produced by GARP-expressing Tregs overcomes resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer. *Nat Commun.* 2020;11(1):4545.
125. Chen RR, Yung MMH, Xuan Y, Zhan S, Leung LL, Liang RR, et al. Targeting of lipid metabolism with a metabolic inhibitor cocktail eradicates peritoneal metastases in ovarian cancer cells. *Commun Biol.* 2019;2:281.
126. Dionisio de Sousa IJ, Cunha AI, Saraiva IA, Portugal RV, Gimba ERP, Guimaraes M, et al. LRP1B Expression as a Putative Predictor of Response to Pegylated Liposomal Doxorubicin Treatment in Ovarian Cancer. *Pathobiology.* 2021;88(6):400-11.
127. Beer AG, Zenzmaier C, Schreinlechner M, Haas J, Dietrich MF, Herz J, Marschang P. Expression of a recombinant full-length LRP1B receptor in human non-small cell lung cancer cells confirms the postulated growth-suppressing function of this large LDL receptor family member. *Oncotarget.* 2016;7(42):68721-33.
128. Ihlow J, Monje N, Hoffmann I, Bischoff P, Sinn BV, Schmitt WD, et al. Low Expression of RGS2 Promotes Poor Prognosis in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancers (Basel).* 2022;14(19).
129. Jank P, Leichsenring J, Kolb S, Hoffmann I, Bischoff P, Kunze CA, et al. High EVI1 and PARP1 expression as favourable prognostic markers in high-grade serous ovarian carcinoma. *J Ovarian Res.* 2023;16(1):150.
130. Olbrecht S, Busschaert P, Qian J, Vanderstichele A, Loverix L, Van Gorp T, et al. High-grade serous tubo-ovarian cancer refined with single-cell RNA sequencing: specific cell subtypes influence survival and determine molecular subtype classification. *Genome Med.* 2021;13(1):111.
131. Olalekan S, Xie B, Back R, Eckart H, Basu A. Characterizing the tumor microenvironment of metastatic ovarian cancer by single-cell transcriptomics. *Cell Rep.* 2021;35(8):109165.

132. Zhao C, Germain RN. Multiplex imaging in immuno-oncology. *J Immunother Cancer*. 2023;11(10).

7. Danksagung

Ich bedanke mich bei den Direktoren des Instituts für Pathologie der Charité, Prof. Dietel, Prof. Anagnostopoulos / Prof. Bläker / Prof. Denkert und Prof. Horst und dem gesamten Team für eine forschungsfreundliche und supportive Atmosphäre. Bei Prof. Sehouli und seinem Team, Prof. Braicu, Prof. Mechsner, Prof. Kaufmann und Dr. Kulbe sowie allen weiteren Kolleginnen und Kollegen möchte ich mich für die gute Kooperation mit dem Institut für Gynäkologie bedanken. PD Dr. Darb-Esfahani, Prof. Dr. Niedobitek, Dr. Schmitt und Prof. Dr. Sers danke ich für die vielfältige konkrete inhaltlich-logistische Unterstützung. Mein Dank gilt auch den maßgeblich an den verschiedenen Studienbeteiligten Partnern: Dr. Philip Bischoff, Dr. Fabian Coscia, Dr. Mihnea-Paul Dragomir, PD Dr. Stefan Gröschel, Dr. Inga Hoffmann, Dr. Jana Ihlow, Paul Jank, Dr. Carlotta Keunecke, Dr. Oliver Klein, Svenja Kolb, Prof. Kirsten Kübler, Jonathan Leichsenring, Anuar Makhmut, Dr. Sofya Marchenko, Nanna Monjé, Dr. Markus Morkel, Dr. Iris Piwonski, Jonathan Pohl, PD Dr. Bruno Sinn und Wiebke Zörn.

Mit allen Beteiligten verbinde ich intensive, spannende, wissenschaftliche Diskussionen und Freude an der Erarbeitung der jeweiligen Projektergebnisse.

Am Anfang einer wissenschaftlichen Arbeit steht eine präzise Diagnose, für die ansteckende Begeisterung an der Diagnostik danke ich Dr. Stefan Pahl und Dr. Anna von Brünneck.

Besonderer Dank gilt meinem Mann Tibor Fischer und unseren Kindern Maite, Tiago und Vito Fischer, ohne die mir sicherlich ein Quäntchen Glück für den freien Kopf beim Arbeiten gefehlt hätte.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

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.

Datum

Unterschrift