

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

**Prognostische Relevanz der Präsenz von CD4⁺
lymphatischen Zellen sowie einer HLA-DR α - und Mesothelin-
Expression in high-grade serösen tuboovariellen
Karzinomen**

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

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

vorgelegt von

Haefner, Hannah

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professorin Dr. A. E. Staebler

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Bitzer

Tag der Disputation: 20.07.2026

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	12
1 Einleitung	14
1.1 Epitheliale Ovarialkarzinome	14
1.1.1 Systematik und Ätiologie	14
1.1.2 Immunhistochemischer Diagnosealgorithmus	16
1.1.3 Epidemiologie	17
1.1.4 Risikofaktoren	17
1.1.5 Diagnostik	17
1.1.6 Screening und Früherkennung	18
1.1.7 Das High-grade seröse Karzinom von Ovar, Tube und Peritoneum	18
1.1.7.1 Ätiologie	18
1.1.7.2 Molekulare Subtypen	19
1.1.7.3 Klinik	20
1.1.7.4 Therapie	20
1.1.7.5 Prognose	21
1.2 T-Lymphozyten	22
1.2.1 T-Zellaktivierung	24
1.2.2 CD4 ⁺ T-Zellen als Prognosefaktor bei soliden Neoplasien	25
1.2.3 CD4 ⁺ T-Zellen als Prognosefaktor beim HGSC	26
1.3 MHC	27
1.3.1 MHC I	27
1.3.2 MHC II	28
1.3.3 HLA-DR ein Isotyp von MHC II	28
1.3.4 Die Regulation der MHC II Expression (in Tumorzellen)	30
1.3.5 HLA-II als Prognosefaktor bei Tumoren	31
1.3.6 HLA-II beim Ovarial CA	32
1.4 Konventionelle Chemotherapie und prätherapeutischer Immunstatus bei soliden Neoplasien	33
1.5 Tumorantigen Mesothelin	34
1.6 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	37
1.6.1 Konkrete Fragestellung zu CD3 ⁺ / CD8 ⁻ TILs:	37
1.6.2 Konkrete Fragestellung zu HLA-DRA:	38
1.6.3 Konkrete Fragestellung zu Mesothelin:	38

2	Material und Methoden.....	39
2.1	Patientenpopulation.....	39
2.2	Erstellen von Tissue Microarrays (TMA).....	40
2.3	Immunhistochemie.....	42
2.3.1	Einzelfärbung	42
2.3.2	Doppelfärbung CD3/CD8	43
2.3.3	Immunhistochemische Scores	45
2.4	Datenerhebung.....	46
2.4.1	Immunhistochemische Auswertung und Erhebung der molekularen Daten 46	
2.5	Statistische Analyse.....	46
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Das untersuchte Kollektiv - Deskriptive Statistik der klinischen Parameter ..	47
3.2	Zusammenhang von Mesothelin, HLA-DRA sowie der CD4-Zellzahl mit klinischen Parametern.....	49
3.2.1	Mesothelin Muster der Immunfärbung und Expression	49
3.2.2	Korrelation der Mesothelin Expression mit klinischen Parametern	50
3.2.3	Mesothelin Expression und Resektionsstatus	52
3.2.4	Prognostische Relevanz der Mesothelin Expression	52
3.2.4.1	Mesothelin - Überlebenszeitanalyse	52
3.2.4.2	Mesothelin Gruppenbildung	54
3.2.5	HLA-DRA Muster der Immunfärbung und Expression	56
3.2.6	Korrelation der HLA-DRA Expression mit klinischen Parametern	57
3.2.7	HLA-DRA Expression und Resektionsstatus.....	59
3.2.8	Prognostische Relevanz der HLA-DRA Expression.....	59
3.2.8.1	HLA-DRA - Überlebenszeitanalyse	59
3.2.8.2	HLA-DRA Gruppenbildung	61
3.2.9	TILs im Tumorstroma sowie Tumorepithel - Doppelfärbung CD8/ CD3 ..	63
3.2.10	Lymphozyten und Zusammenhang mit klinischen Parametern	64
3.2.11	TILs und Resektionsstatus.....	66
3.2.12	Prognostische Relevanz der TIL-Subgruppen im HGSC - TILs Überlebenszeitanalyse	67
3.3	Korrelation von Mesothelin, HLA-DRA-Status und TIL-Vorkommen.....	70
3.3.1	Zusammenhang zwischen HLA-DRA Expression und CD3 ⁺ / CD8 ⁻ TILs 70	
3.3.2	Korrelation von MSLN und CD3 ⁺ / CD8 ⁻ TILs	71

3.4	Subgruppenanalyse Gesamtüberleben nach Mesothelin, HLA-DRA und CD3+ / CD8- TILs.....	73
3.4.1	CD3+ / CD8- und HLA-DRA	73
3.4.2	T-Lymphozyten und Mesothelin	74
3.4.3	HLA-DR und Mesothelin	75
3.5	Einfluss des von HLA-DRA und TIL-Status auf das Gesamtüberleben abhängig von Resektionsstatus.....	76
3.5.1	TIL-Status	76
3.5.2	HLA-DRA.....	77
3.6	Einfluss einer adjuvanten Chemotherapie auf das Gesamtüberleben abhängig von MSLN, HLA-DRA und TIL-Status	78
3.6.1	Einfluss einer adjuvanten Chemotherapie auf OS und DFS im Gesamtkollektiv	78
3.6.2	HLA-DRA.....	78
3.6.3	TIL-Status	79
3.6.4	Mesothelin	82
4	Diskussion	84
4.1	Immunhistochemie und Auswertungs-Algorithmus.....	84
4.2	Doppelfärbung und Cut-off.....	85
4.3	TILs, MSLN, HLA-DRA - Zusammenhang mit klinischen Parametern	86
4.4	CD3+/CD8- TILs und OS.....	87
4.5	HLA-DRA und OS.....	89
4.6	Mesothelin und OS.....	91
4.7	TILs - HLA-DRA-, und MSLN-Status.....	93
4.8	TILs, HLA-DRA- und MSLN-Status – Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie.....	94
4.9	Limitationen.....	95
4.10	Ausblick.....	96
5	Zusammenfassung	99
6	Literaturverzeichnis	101
7	Erklärung zum Eigenanteil	115
	Danksagung.....	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema zur Ätiologie der epithelialen Ovarialkarzinome. Charakteristische Mutationen (außen) zugeordnet zu Histotyp (mittlere Bande), sowie der möglichen Vorläuferläsionen (innere Bande). Die Typ 1 Tumoren (grün, blau und gelb) sind durch ein Fehlen einer TP53 Mutation gekennzeichnet. Häufige Treibermutationen sind hier KRAS-Mutationen und bei Diagnosestellung häufig nicht invasive Implants. Typ II Tumoren (rosa) zeichnen sich vor allem durch genetische Instabilität und eine aberrante TP53 Expression aus. Grafik modifiziert nach (Shih et al., 2021) Nutzung der Grafik mit Erlaubnis des Elsevier-Verlages unter der Lizenznummer 5945400737355.....	15
Abbildung 2: Diagnosealgorithmus für die Verwendung bei der Klassifikation epithelialer Ovarialkarzinome (EOC) auf Grundlage der Arbeit von Köbel et al. (Köbel et al., 2016). Seröse Karzinome lassen sich durch WT1 Positivität identifizieren, HGSC sind zusätzlich durch eine aberrante p53 Färbung definiert. Weiterhin dient Napsin A zur Identifikation der klarzelligen EOCs. Der Progesteronrezeptor ist nur bei endometrioiden EOCs positiv. Muzinöse EOCs sind durch das Fehlen von WT1, Napsin A sowie des Progesteronrezeptors zu identifizieren. (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020).	16
Abbildung 3: Der T-Zellrezeptor ist ein Heterodimer aus zwei Transmembrandomänen. Er ähnelt dem variablen Fragment eines Antikörpers. Anders als Antikörper kann der T-Zellrezeptor nur Peptide binden. (Murphy, K.M.T., P.; Walport, M., Janeway Immunologie. 9 ed. 2018: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; S.195). Nutzung der Grafik mit Genehmigung des Verlags Springer Berlin Heidelberg unter der Lizenznummer 1600254-1.....	23
Abbildung 4: Schemazeichnung und Bändermodell von MHC II. a, b und c zeigen jeweils das Bändermodell, Abbildung a mit gebundenem Peptid (Peptidrückrat gelb eingefärbt; Seitenketten der Anker-Aminosäuren des MHC II Moleküls grau eingefärbt, Wasserstoffbrücken blau gestrichelt). d zeigt schematisch ein MHC Klasse II Molekül. Modifiziert nach (Murphy, K.M.T., P.; Walport, M., Janeway Immunologie. 9 ed. 2018: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; S.198) Nutzung der Grafik mit Genehmigung des Verlags Springer Berlin Heidelberg unter der Lizenznummer 1600254-1.....	29
Abbildung 5 Die Syntheseschritte von MSLN. Zunächst wird aus dem Vorläufer mit 622 Aminosäuren (AA) und 77kDa Masse ein Signal Peptid (SP) abgespalten, anschließend erfolgt die Bindung an die Zellmembran via Glycosylphosphatidylinositol-Anker-Sequenz (GASS) und Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI). Zum Schluss wird der lösliche sogenannte megacaryocyte potentiation factor (MPF) an der Furinbindungsstelle (RR) abgespalten. (Hassan et al., 2004) © 2004, American Association for Cancer Research, Lizenznummer 6010731331550	34
Abbildung 6: Die Mesothelin:CA 125 Bindung kann zur Bildung von Tumorzellverbänden beitragen. Die dann im Zellverbund stabileren Tumorzellen können Mikrometastasen im Peritoneum bilden. (Hilliard, 2018) http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/	35
Abbildung 7: Arbeitsprozess bei der Erstellung von TMAs. A: Dem Paraffinblock wird aus dem markierten Bereich eine Probenstanze entnommen. Die entnommene Probenstanze wird in einen neuen Paraffinblock eingefügt. B: Schema eines	

Objektträgers mit einem Schnitt des TMA. Unterschiedliche Proben können nun auf einem Objektträger angefärbt und analysiert werden. C: Ein Stanzprotokoll trägt die Information, welche Proben an welchem Platz sitzen. Grafik entnommen aus (Manley et al., 2001); Nutzung der Grafik mit Erlaubnis des Elsevier-Verlages unter der Lizenznummer 6077680860890.....	41
Abbildung 8: Schemazeichnung des OptiView DAB IHC Detection Kits (A) und des UltraView AP red Detection Kits (B). A: Ein Primärantikörper bindet einen Sekundärantikörper, passend für mehrere Spezies (HQ Linker) und dieser bindet einen Tertiär Antikörper, welcher mit HRP gekoppelt ist welches unter Zugabe von Kupfer DAB ausfällt. (Produktdatenblatt für OptiView DAB IHC Detection Kit; Ventana Medical Systems, Inc. Arizona/ USA 06/2011).....	43
Abbildung 9: Abbildung eines mit Anti-Mesothelin/ HE gefärbten TMAs. Abgebildet wird ein Fall auf 12 Stanzproben; Scans erstellt mithilfe von Roche Ventana DP 200 slide scanner, bearbeitet mit ViewPoint; PreciPoint GmbH Alois-Steinecker-Straße 22 85354 Freising, Bavaria, Germany.	45
Abbildung 10: Ausgewählte Scans der MSLN-Färbung in 20x Vergrößerung. MSLN zeigt eine membranäre Expression: a) IRS 1; b) IRS 4; c) IRS 6; d) IRS 8; e) IRS 12. Eigene Aufnahmen bearbeitet mit ViewPoint; PreciPoint GmbH Alois-Steinecker-Straße 22 85354 Freising, Bavaria, Germany.	50
Abbildung 11: Korrelation von Resektionsstatus mit Mesothelin-IRS: Fälle mit Mesothelin -Expression IRS ≥ 8 zeigen eine Tendenz zu vermehrter R2 Resektion gegenüber den Fällen mit Mesothelin-Expression IRS < 8 ($\chi^2=0.721$).	52
Abbildung 12: Einfluss der MSLN-Expression auf das OS ($p=0,420$; vgl. Tabelle 7). ..	53
Abbildung 13: Einfluss der MSLN-Expression auf das DFS ($p=0,369$; vgl. Tabelle 7). ..	54
Abbildung 14: Einfluss der MSLN- Expression auf das OS ($p= 0,133$; vgl. Tabelle 7) .	54
Abbildung 15: Einfluss der MSLN-Expression auf das DFS ($p=0,288$; vgl. Tabelle 7). ..	55
Abbildung 16: Ausgewählte Scans der HLA-DRA Färbung in 20 x Vergrößerung. HLA-DRA zeigt eine membranäre Expression. Makrophagen mussten aus der Bewertung herausgehalten werden. a) INT 0; b) INT 1; c) INT 2; d) INT 3	56
Abbildung 17: Korrelation von Resektionsstatus mit Intensität der HLA-DR Expression: Fälle mit HLA-DR Expression IRS >2 zeigen vermehrt einen R1 bzw. R0 Status ($\chi^2=0.011$) verglichen mit den Fällen mit HLA-DRA Expression IRS ≥ 2	59
Abbildung 18: Einfluss der HLA-DRA Expression auf das OS. a) OS und HLA-DRA IRS ($p=0,001$) b) OS und HLA-DRA INT ($p=0,012$; vgl. Tabelle 9)	60
Abbildung 19: Einfluss der HLA-DRA Expression auf das DFS ($p=0,043$; vgl. Tabelle 9).	61
Abbildung 20: Einfluss der HLA-DRA Expression auf das OS. ($p=0,001$; vgl. Tabelle 9)	62
Abbildung 21: Einfluss der HLA-DRA Expression auf das DFS ($p=0,004$; vgl. Tabelle 9)	62
Abbildung 22: Ausgewählte Scans der Doppelfärbung mit anti-CD8 (braun) und anti-CD3 (rot) in 4x bzw. 20x Vergrößerung. a) und c) demonstrieren einen Fall ohne	

nennenswerte stromale oder epitheliale TILs, b) und d) demonstrieren einen Fall mit hoher CD3 ⁺ /CD8 ⁺ iTIL-Zahl und hoher sTIL-Zahl (Pfeile). Eigene Aufnahmen, bearbeitet mit ViewPoint; PreciPoint GmbH Alois-Steinecker-Straße 22 85354 Freising, Bavaria, Germany.	63
Abbildung 23: Zusammenhang zwischen TIL-Zahl und dem Resektionsstatus; Mittelwertvergleich und Fehlerbalkendiagramm. Es zeigt sich, dass die Fälle, bei denen ein Rest >1 mm verblieb (R1 und R2), signifikant weniger iTILs (blau, $p<0,001$) und aTILs (rot, $p=0,001$) aufweisen gegenüber der R0 resezierten Fälle. Die sTILs sind für den Resektionsstatus weniger relevant (grün, $p=0,058$).	67
Abbildung 24: Einfluss der iTILs auf das OS ($p<0,001$ vgl. Tabelle 11).	68
Abbildung 25: Einfluss von sTILs ($p=0,008$) (b) und aTILs ($p=0,011$) (a) auf das OS (vgl. Tabelle 12 und 13).	69
Abbildung 26: Einfluss der iTILs auf das DFS ($p<0,001$; vgl. Tabelle 11).	69
Abbildung 27: Einfluss von a) sTILs ($p=0,351$) bzw. b) aTILs ($p=0,058$) auf das DFS (vgl. Tabelle 12 und 13).	70
Abbildung 28: Trend der Verteilung der Lymphozytenzahlen - Korrelation mit der HLA-DRA Expression. Rot) aTILs Mittelwerte je Fall $p<0,001$; blau) sTILs Mittelwerte je Fall $p=0,004$, grün) iTILs MW je Fall, $p<0,001$	71
Abbildung 29: Zusammenhang zwischen TIL-Zahl und HLA-DRA. Fehlerbalkendiagramm mit Mittelwert und 95% Konfidenzintervall für iTIL (blau, $p<0,001$), sTILs (grün, $p=0,005$), aTILs (rot, $p<0,001$).	71
Abbildung 30: Trend der Verteilung der Lymphozytenzahlen - Korrelation mit der MSLN Expression (ANOVA). Rot: aTILs Mittelwerte je Fall, $p=0,080$; blau: sTILs Mittelwerte je Fall, $p=0,550$, grün: iTILs MW je Fall, $p=0,689$	72
Abbildung 31: Zusammenhang zwischen TIL-Zahl und MSLN. Fehlerbalkendiagramm mit Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Rot: aTILs; grün: sTILs; blau: iTILs.	73
Abbildung 32: Einfluss der iTILs auf das OS geschichtet nach der HLA-DRA Expression. a): HLA-DRA-L ($p=0,096$); b): HLA-DRA-H ($p<0,001$) (vgl. Tabelle 17). ..	73
Abbildung 33: Einfluss der iTILs auf das OS geschichtet nach der MSLN-Expression. a): MSLN-L ($p<0,001$); b): MSLN-H ($p<0,001$) (vgl. Tabelle 18).	74
Abbildung 34: Einfluss von HLA-DRA auf das OS geschichtet nach der MSLN Expression. a): MSLN-L ($p<0,048$); b): MSLN-H ($p=0,008$) (vgl. Tabelle 19).	75
Abbildung 35: Einfluss des iTIL-Status auf das OS geschichtet nach dem Resektionsstatus. a): R0 ($p<0,001$); b): R1+R2 ($p=0,008$) (vgl. Tabelle 20).	76
Abbildung 36: Einfluss der HLA-DRA Expression auf das OS geschichtet nach dem Resektionsstatus. a): R0 ($p=0,112$); b): R1+R2 ($p=0,049$) (vgl. Tabelle 21).	77
Abbildung 37: Einfluss einer adjuvanten CTX auf das OS geschichtet nach der HLA-DRA Expression. a): HLA-DRA-L ($p<0,001$); b): HLA-DRA-H ($p<0,001$) (vgl. Tabelle 20).	79
Abbildung 38: Erhalt bzw. Nichterhalt einer adjuvanten CTX; Einfluss der TIL-Zahl auf das OS.	81

Abbildung 39: Einfluss einer adjuvanten CTX auf das OS geschichtet nach der MSLN-Expression. a): MSLN-L ($p < 0,001$); b): MSLN-H ($p > 0,001$) (vgl. Tabelle 24). 82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Publikationen zur Prognoserelevanz von HLA-II.....	31
Tabelle 2 : Spezifikationen der verwendeten Reagenzien. Die verwendeten Programme sind im Anhang zu finden.	44
Tabelle 3: Verwendetes Scoring System für MSLN (mod. Allred-Score). MSLN zeigt eine membranäre Färbung. Verwendeter Klon: SPM 143.....	45
Tabelle 4: Verwendetes Scoring System für HLA-DRA (mod. Allred-Score). Für HLA-DRA wurde ES und IS erfasst. Verwendeter Klon: TAL.1B5.	45
Tabelle 5: Klinische Charakteristika des untersuchten Kollektivs.	48
Tabelle 6: Deskriptive Statistik für MSLN-Expression im Gesamtkollektiv.	49
Tabelle 7: Mesothelin Expression und klinische Parameter.	51
Tabelle 8: Deskriptive Statistik für HLA-DRA (HLA-DRA-L = low, HLA-DRA-H = high).	56
Tabelle 9: HLA-DRA Expression und klinische Parameter.....	58
Tabelle 10: Deskriptive Statistik für CD3+/CD8- TILs/ HPF und Bildung Tertile.....	64
Tabelle 11: Zusammenhang von iTILs mit klinischen Parametern.	65
Tabelle 12: Zusammenhang von aTILs mit klinischen Parametern.	65
Tabelle 13: Zusammenhang von sTILs mit klinischen Parametern.	66
Tabelle 14: Zusammenhang zwischen TIL-Zahl und dem Resektionsstatus.....	67
Tabelle 15: Zusammenhang von HLA-DRA Expression und TIL-Zahl.....	70
Tabelle 16 Zusammenhang von MSLN-Expression und TIL-Zahl	72
Tabelle 17: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS mit iTILs geschichtet nach der HLA-DRA Expression	74
Tabelle 18: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS mit iTILs, geschichtet nach der MSLN-Expression.....	75
Tabelle 19: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS mit HLA-DRA, geschichtet nach der MSLN-Expression.	75
Tabelle 20: Einfluss von TIL-Zahl und Resektionsstatus auf das OS und DFS.	76
Tabelle 21: Einfluss von Resektionsstatus und HLA-DRA Expression auf OS und DFS	77
Tabelle 22: Klinische Daten und CTX-Status.	78
Tabelle 23: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS und DFS mit HLA-DRA, geschichtet nach dem CTX-Status, sowie die Kaplan-Meier-Analyse mit CTX vs. keine CTX zum Vergleich.....	79
Tabelle 24: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS und DFS mit TILs, geschichtet nach dem CTX-Status, sowie die Kaplan-Meier-Analyse mit CTX vs. keine CTX zum Vergleich	80

Tabelle 25: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS sowie DFS mit MSLN, geschichtet nach dem CTX-Status, sowie die Kaplan-Meier-Analyse mit CTX vs. keine CTX zum Vergleich.....	83
--	----

Abkürzungsverzeichnis

5-JÜL	5-Jahresüberleben
ADC	Antibody Drug Conjugate
APC	Antigen Presenting Cell
BOT	Borderline Tumor
BRCA	Breast Cancer Gene
CA-125	Cancer Antigen 125
CCNE1	Cyclin E1
CD	Cluster Of Differentiation
CD4 TIL	intratumorale CD4 ⁺ T-Zelle
CD4	Co-Rezeptor auf Th Zellen
CD8	Co-Rezeptor auf zytotoxischen T-Zellen
CIITA	Class II Major Histocompatibility Komplex Transaktivator
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
CTX	Chemotherapie
DAB	Diaminobenzidin
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DFS	Rezidivfreies Überleben
ECOG-PS	Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status
EOC	Epithelial Ovarian Cancer
FFPE	Formalinfixiert paraffineingebettet
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FOXP3	Forkhead Box Protein P3
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGSC	High Grade Serous Carcinoma
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLA-DRA	HLA-DR alpha chain
HLA-DRA-H	HLA-DRA hoch-exprimiert
HLA-DRA-L	HLA-DRA niedrig-exprimiert
HPF	High Power Field
HRD	Homologue Repair Deficit
IFN β	Interferon beta
IFN γ	Interferon gamma
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
INT	Intensität
IRS	Immunreaktivitäts-Score
JAK/STAT	Januskinase/ Signal Transducers And Activators Of Transcription
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Major Histocompatibility Complex

MPF	Megacaryocyte Potentiating Factor
MSLN	Mesothelin
MSLN-H	MSLN hoch-exprimiert
MSLN-L	MSLN niedrig-exprimiert
NIH	National Institutes Of Health
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLR	Nod-like Receptor
NSCLC	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
OS	Gesamtüberleben
OTTA	Ovarian Tumor Tissue Analysis
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PFS	progressionsfreies Überleben
R0-Resektion	Resektion in sano
R1-Resektion	Resektion mit mikroskopischem Rest
R-Status	Resektionsstatus
SMRP	Soluble Mesothelin-related Protein
STIC	Serous Tubal In-situ Carcinoma
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocyte
aTIL	alle im Core gezählten TIL
iTIL	im Epithel gezählte TIL
sTIL	im Stroma gezählte TIL
TCR	T-Zellrezeptor
TGFβ	Tumor Growth Factor beta
Th-Zelle	T-Helferzelle
ThCTL	zytotoxische Th-Zelle
TLS	Tertiary Lymphoid Structure
TMA	Tumor Micro Assay
TME	Tumor Micro-environment
TNBC	triple negative breast cancer
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

1.1 Epitheliale Ovarialkarzinome

1.1.1 Systematik und Ätiologie

Die Einteilung maligner Tumoren des Ovars ist komplex. Grundsätzlich kann eine Gliederung nach Ursprungszelle erfolgen: Epitheliale Tumoren, Granulosazelltumoren und Keimzelltumoren. Seit 2014 werden die epithelialen Tumoren des Ovars, der Tuben und des Peritoneums in WHO-Klassifikation und FIGO-Klassifikation gemeinsam klassifiziert. Die epithelialen Tumoren lassen sich histologisch und molekularpathologisch weiter unterteilen: Wie Abbildung 1 zeigt, nehmen Kurman und Shih aufgrund der unterschiedlichen molekularpathologischen Eigenschaften eine Unterscheidung der epithelialen Tumoren in Typ 1 und Typ 2 Tumoren vor (Kurman and Shih *et al.*, 2016).

Typ 1 Tumoren sind meist indolente langsam wachsende Tumoren und weisen, in frühen Stadien diagnostiziert, eine gute Prognose auf. Hierzu gehören, die histologischen Subtypen low-grade serös, klarzellig, endometrioid, seromuzinös sowie muzinös. Das muzinöse Karzinom zeichnet sich durch aktivierende Mutationen im K-Ras-Pathway sowie Mutationen im TP53-Gen aus. Bei muzinösen Malignomen im kleinen Becken sollte stets auch an einen Primarius aus dem Gastrointestinaltrakt und damit einhergehende pelvine Metastasen gedacht werden. Die übrigen Typ 1 Tumoren sind durch ein Fehlen einer TP53 Mutation gekennzeichnet. Als Risikofaktor und Ursprungsgewebe von klarzelligem, endometrioidem sowie seromuzinösem Karzinom gilt unter anderem die Endometriose. Häufige Treibermutationen sind Aktivierung im Wnt-β-Catenin Pathway, Inaktivierung von PTEN, PIK3CA Aktivierung, Inaktivierung des Chromatin Remodelling über ARID1A.

Gemäß der derzeit führenden Theorie, entstammt das low-grade seröse Karzinom dem Epithel der Tube, vornehmlich aus dem Bereich des Fimbrientrichters. Häufige Treibermutationen sind hier aktivierende Mutationen im K-Ras, MEK, B-Raf, ErbB2 Pathway. Semimaligne Borderline-Tumoren bilden den Übergang vom benignen Zystadenom bis hin zum Karzinom. Bei Diagnosestellung der Borderline-Tumoren liegen häufig nicht-invasive Implants

vor. Hierbei handelt es sich um Absiedlungen innerhalb des Peritoneums. Bei häufig diffuser peritonealer Aussaat der Borderline-Tumoren ist die Suche nach möglichen invasiven oder auch mikro-invasiven malignen Arealen eine diagnostische Herausforderung aber essenziell für Diagnostik und Tumorstaging. Die Diagnose eines Borderline-Tumors muss daher äußerst sorgfältig gestellt werden.

Die Gruppe der Typ 2 Tumoren besteht mehrheitlich aus den high-grade serösen Karzinomen (HGSC). Charakteristisch ist hier eine p53 Mutation sowie eine hohe Zahl genomischer Aberrationen. Der Erkrankungsgipfel liegt eher im späteren Lebensalter; sie wachsen schnell aber oft symptomfrei und disseminieren früh, sodass hier die Diagnose in späten Stadien gestellt wird und die Prognose oft schlecht ist. Betrachtet man die Statistik der Todesfälle durch Ovarialkarzinome, so sind 10% der Todesfälle durch die Gruppe der Typ 1 Tumoren bedingt, 90% durch Typ 2 Tumoren (Kurman and Shih 1999, 2016).

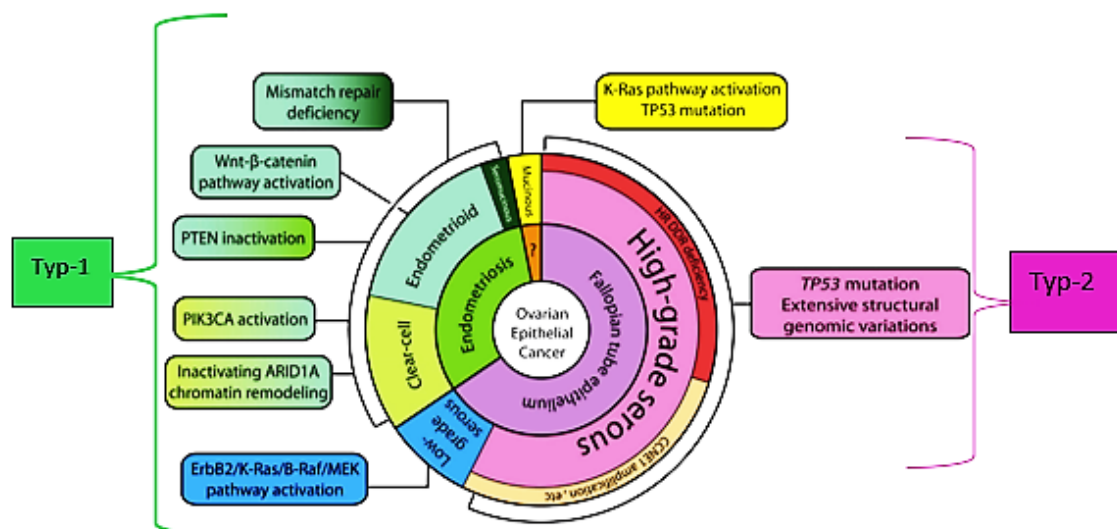


Abbildung 1: Schema zur Ätiologie der epithelialen Ovarialkarzinome. Charakteristische Mutationen (außen) zugeordnet zu Histotyp (mittlere Bande), sowie der möglichen Vorläuferläsionen (innere Bande). Die Typ 1 Tumoren (grün, blau und gelb) sind durch ein Fehlen einer TP53 Mutation gekennzeichnet. Häufige Treibermutationen sind hier KRAS-Mutationen und bei Diagnosestellung häufig nicht invasive Implants. Typ II Tumoren (rosa) zeichnen sich vor allem durch genetische Instabilität und eine aberrante TP53 Expression aus. Grafik modifiziert nach (Shih et al., 2021) Nutzung der Grafik mit Erlaubnis des Elsevier-Verlages unter der Lizenznummer 5945400737355.

1.1.2 Immunhistochemischer Diagnosealgorithmus

Die deutsche S3 Versorgungsleitlinie Ovarialkarzinom (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024) empfiehlt zusätzlich nach Köbel et al. zur histopathologischen Diagnose fakultativ die Anwendung eines immunhistochemischen Diagnosealgorithmus mit Antikörpern gegen WT1, p53, Napsin A sowie den Progesteronrezeptor (Köbel et al., 2016), wie Abbildung 2 zeigt. Die Autoren der Primärpublikation empfehlen, jedes Forschungskollektiv von Ovarialkarzinomen mithilfe des Algorithmus zu stratifizieren, um den erheblichen tumorbiologischen Unterschieden Rechnung zu tragen und die mitunter schwierige Diagnosestellung in Bezug auf die Reinheit der Kollektive zu verifizieren.

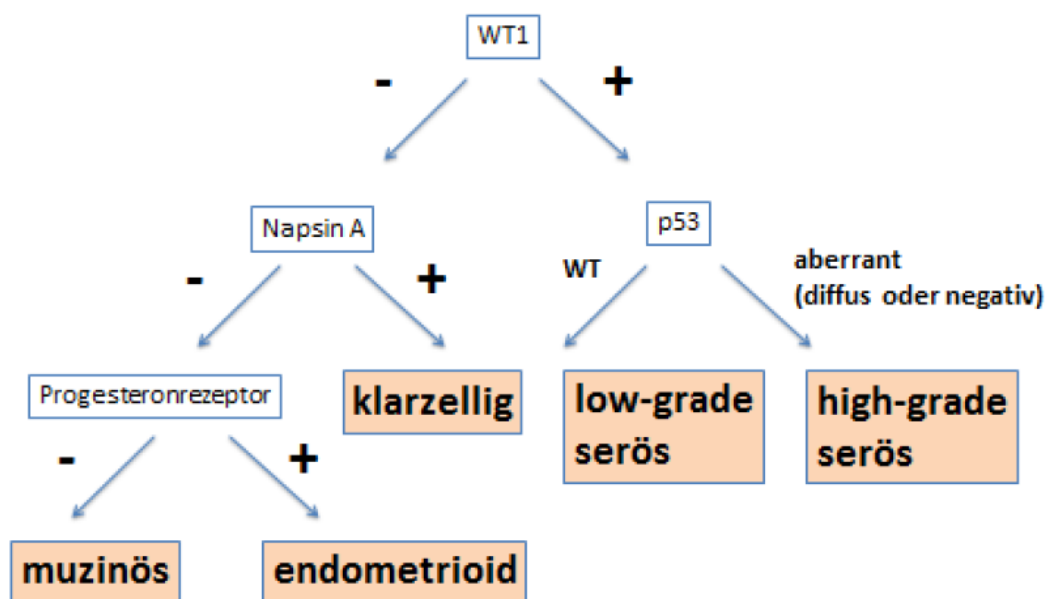


Abbildung 2: Diagnosealgorithmus für die Verwendung bei der Klassifikation epithelialer Ovarialkarzinome (EOC) auf Grundlage der Arbeit von Köbel et al. (Köbel et al., 2016). Seröse Karzinome lassen sich durch WT1 Positivität identifizieren, HGSC sind zusätzlich durch eine aberrante p53 Färbung definiert. Weiterhin dient Napsin A zur Identifikation der klarzelligen EOCs. Der Progesteronrezeptor ist nur bei endometrioiden EOCs positiv. Muzinöse EOCs sind durch das Fehlen von WT1, Napsin A sowie des Progesteronrezeptors zu identifizieren. (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020).

1.1.3 Epidemiologie

Ovarialkarzinome stehen unter den gynäkologischen Malignomen, betrachtet man die Inzidenz, an dritter Stelle. Im Vergleich zu anderen gynäkologischen Malignomen (die Malignome der Brustdrüse mit einbezogen) ist die Mortalität innerhalb der Erkrankten jedoch deutlich höher. Das fünf Jahres Überleben (5-JÜL) für alle Ovarialkarzinomdiagnosen beträgt zwischen 35% und 40% (Siegel et al., 2024). Eine oft sehr späte Diagnose (75% in Stadium 3 oder 4) und hohe Rezidivraten bzw. häufige frühe Rezidive nach platinbasierten Chemotherapien tragen zur hohen Mortalität bei. Unter den Ovarialkarzinomen ist die mit 50% (Kurman, 2019) häufigste Entität das high-grade seröse Karzinom, das auch Forschungsgegenstand dieser Arbeit ist.

1.1.4 Risikofaktoren

Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, nimmt mit steigendem Alter zu. Durch Multiparität sowie durch die Einnahme von oralen Antikontrazeptiva wird das Risiko reduziert. Im Gegensatz dazu erhöht sowohl eine frühe Menarche wie eine späte Menopause das Risiko zu erkranken; ebenso wie ein hoher sozioökonomischer Status (Kurman et al., 2019). Im Rahmen des Familiären Brust- und Eierstockkrebssyndroms haben Keimbahnträgerinnen einer BRCA1/2 – Mutation ein erhöhtes Erkrankungsrisiko: Bei einer BRCA1-Mutation besteht bis zum 69. Lebensjahr ein Risiko von 39%, bei einer BRCA2-Mutation besteht ein Risiko zwischen 11% und 22% (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

1.1.5 Diagnostik

Hinsichtlich der Primärdiagnose bei V.a. Ovarialkarzinom steht die vaginale Sonografie an erster Stelle (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024). Zur Planung der Operation kann eine erweiterte Bildgebung herangezogen werden. Keine bildgebende Methode hat sich in der Vergangenheit als gleichwertig zum chirurgischen Staging erwiesen. Zudem wird die Operabilität in der Bildgebung oft falsch eingeschätzt (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

Gynäkologische Tumoren werden zusätzlich zur UICC TNM Klassifikation gemäß der FIGO-Klassifikation gestaged. Die deutsche S3 Leitlinie empfiehlt ein chirurgisches Staging (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024). Vor Beginn einer (neoadjuvanten) Chemotherapie, welche in Einzelfällen in sehr späten Stadien erwogen werden kann, wird eine diagnosesichernde Biopsie empfohlen (Berek et al., 2018).

1.1.6 Screening und Früherkennung

Die deutsche S3-Leitlinie empfiehlt, innerhalb der Normalbevölkerung kein Screening mittels der Serum CA-125 Werte und/ oder transvaginaler Sonografie durchzuführen, da Studien zwar eine Diagnosestellung in früheren Stadien nachweisen konnten (Kobayashi et al., 2008, Menon et al., 2009), eine Reduktion der Mortalität bislang jedoch nicht stark genug untermauert werden konnte (Buys et al., 2011, van Nagell et al., 2011, Menon et al., 2009) - auch aufgrund methodischer Mängel der jeweiligen Studien (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024). Verwandten einer am Ovarialkarzinom erkrankten Patientin mit krankheitsrelevanter pathogenen Keimbahnmutation soll eine prophylaktische Operation angeboten werden. Screening-Untersuchungen konnten hier weder die Mortalität senken, noch eine zuverlässige Diagnose in frühen Stadien erreichen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

1.1.7 Das High-grade seröse Karzinom von Ovar, Tube und Peritoneum

Der folgende Abschnitt konzentriert sich auf die Beschreibung des high-grade serösen Karzinoms.

1.1.7.1 Ätiologie

Als Vorläuferläsion der high-grade serösen Karzinome von Ovar, Tube und Peritoneum gilt ein seröses in-situ Karzinom der Tuben (seröses tubares intraepitheliales Karzinom = STIC) mit zumeist aberranter TP-53 Expression und gesteigertem Proliferationsindex (Ki-67 Index oder Mib-1 Signatur (Kurman and Shih le, 2016, Shih et al., 2021, Kindelberger et al., 2007). Die erworbene TP53

Mutation gilt als eines der frühesten Ereignisse in der Entstehung von HGSC. In einer Metaanalyse betrug die Häufigkeit für ein HGSC 7,1%, nachdem zuvor die Diagnose STIC gestellt worden war (Linz et al., 2022). Die Inzidenz für ein STIC wird aktuell auf zwischen 0,6% bis zu 7% bei BRCA-Trägern geschätzt (Wethington et al., 2013).

Aus diesem Wissen ergibt sich für die pathologische Praxis laut deutscher Leitlinie, dass die Tuben samt Fimbrientrichter extensiv auf das Vorliegen eines STICs untersucht werden sollen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024). Die deutsche Leitlinie empfiehlt, dass allen Patientinnen mit geplanter operativer Hysterektomie eine opportunistische Salpingektomie angeboten werden soll (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

1.1.7.2 Molekulare Subtypen

Genetisch gelten HGSC mit einer Häufung von Chromosomenaberrationen als sehr instabil, dabei sind neben TP53 wiederkehrende Treibermutationen selten (Cope et al., 2013). Etwa 13% der HGSC-Patientinnen haben eine Keimbahnmutation im BRCA1/2 Gen (Cancer Genome Atlas Research, 2011).

Mithilfe von RNA-Analysen des NIH finanzierten Cancer Genome Atlas Research Network konnten 2011 erstmals vier molekulare Subtypen des HGSC definiert und anhand ihrer spezifischen Genexpressionsprofile benannt werden: HGSC vom mesenchymalen Typ, C1; HGSC vom immunoreaktiven Typ, C2; HGSC vom proliferativen Typ, C4; HGSC vom differenzierten Typ, C5 (Cancer Genome Atlas Research, 2011). Eine Arbeit der Forschungsgemeinschaft Ovarian Tumour Tissue Analysis-Konsortiums (OTTA), konnte eine Prognoserelevanz der Subtypen herausarbeiten: Dabei hatten HGSC vom immunoreaktiven Typ die beste Prognose gefolgt vom differenzierten, proliferativen und mesenchymalen Typ (Konecny et al., 2014). In einer weiteren Arbeit des OTTA-Konsortiums bestand ein prognostisch günstiger Zusammenhang zwischen dem differenzierten C4 Typ und Langzeitüberleben, besonders wenn die Tumoren einen hohen Anteil Tumorepithelzellen aufwiesen (Nelson et al., 2024). Die Autorengruppe merkte an, dass diesem Detail für das bessere Verständnis der

Immunkontrolle im HGSC in weiteren Studien mehr Beachtung geschenkt werden müsse. Die molekularen Subtypen des HGSC haben derzeit jedoch noch keine klinische Bedeutung und werden in der klinischen Routine nicht bestimmt (Kurman et al., 2019).

1.1.7.3 Klinik

Der Erkrankungsgipfel liegt für das HGSC im sechsten bis siebten Lebensjahrzehnt. Die Diagnose erfolgt meist im späten Stadium (FIGO III / IV), da typische Frühsymptome fehlen. Im fortgeschrittenen Stadium treten unspezifische Symptome meist durch intestinale Beteiligung oder den raumfordernden Prozess zu Tage, wie etwa abdominale Schmerzen, Völlegefühl, Verdauungsstörungen, Änderung der Miktionsfrequenz oder seltener vaginale Blutungen (Kurman et al., 2019, Berek et al., 2018).

Intraoperativ haben die Ovarien oftmals nur diskrete Auflagerungen, wobei sich die Haupttumormasse disseminiert im Peritoneum befindet. Häufig ist das von Metastasen durchsetzte Omentum majus mit dem Intestinum verbacken („omental cake“), was die Operabilität in vielen Fällen erschwert, selten limitiert und konsekutiv die Überlebensdauer beeinträchtigt. Erlaubt es der Allgemeinzustand der Patientin, ist eine optimale Zytoreduktion auch durch die Entfernung von weiteren Organen und ggf. die Notwendigkeit einer aufwendigen Rekonstruktion der Darmpassage anzustreben. Der Resektionsstatus ist ein gut belegter unabhängiger Prognosefaktor (du Bois et al., 2009).

1.1.7.4 Therapie

Die medikamentöse Primärtherapie des HGSC besteht in einer primären Operation mit angestrebtem optimalen Tumordebulking. Anschließend folgt für fortgeschrittene Stadien eine platinbasierte Chemotherapie ggf. unter Zunahme von Bevacizumab, welches das Gesamtüberleben insbesondere für HGSCs vom proliferativen Typ verlängern kann (Kommos et al., 2017). Unter einer platin-sensitiven Erkrankung versteht man ein Ansprechen auf die platinhaltige initiale Therapie und ein Rezidiv-Ereignis frühestens 6 Monate nach Abschluss der

Behandlung (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024). Bei Rezidiv einer platin-sensitiven Erkrankung sollen nach erneuter platinbasierter Chemotherapie PARP-Inhibitoren als Erhaltungstherapie eingesetzt werden (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

1.1.7.5 Prognose

Eine peritoneale Aussaat erfolgt besonders beim HGSC oft früh. Prognoselimitierend sind oft die Metastasen in die Bauchhöhle. Ein optimales Tumordebulking bestimmt die Prognose (du Bois et al., 2009).

Etwa 80% der Patientinnen sind initial Platin-sensitiv, etwa 70 % der Patientinnen entwickeln ein Rezidiv. Das 5-JÜL beträgt etwa 41% über alle Studien (Bachmann, 2023, Havasi et al., 2023, Menon et al., 2023).

1.2 T-Lymphozyten

Allen Tumorzellen, welche bis zur manifesten Krebserkrankung proliferieren, ist die Fähigkeit, dem Immunsystem zu entgehen, gemeinsam - die Fähigkeit zur Immunevasion (Hanahan and Weinberg, 2011).

Die Rolle der T-Lymphozyten bei der Krebsentstehung und Immunkontrolle ist zentral. Sie gehören, klassisch betrachtet, zur sogenannten zellulären adaptiven Immunantwort. Die T-Zellpopulation und ihre Funktionen innerhalb der Immunantwort sind sehr heterogen. Die Vorläuferzellen der T-Lymphozyten entstammen der CD34⁺ hämatopoetischen Stammzelle, werden im Knochenmark gebildet und reifen im Thymus aus. Fehlt das Thymusgewebe oder reift nur minimal aus, wie zum Beispiel beim Di-George-Syndrom, haben betroffene Patienten deutlich verringerte oder fehlende T-Zellzahlen. Allen T-Lymphozyten gemeinsam ist die Expression eines antigenspezifischen T-Zellrezeptors (TCR) und des Oberflächenproteins CD3.

Der TCR ist ein Heterodimer, besteht aus zwei Transmembrandomänen und ähnelt dem variablen Fragment eines Antikörpers wie schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Anders als Antikörper kann der TCR nur Peptide binden. Damit eine Bindung mit diesen aus Antigenen stammenden Peptiden zustande kommt, muss das Antigen intrazellulär prozessiert werden und die daraus resultierenden Peptide auf MHC-Molekülen an der Oberfläche von Zellen präsentiert werden. (Zum Mechanismus der Antigen Präsentation s. MHC und T-Zellaktivierung).

Die den TCR-codierenden Gen-Abschnitte sind in der Population noch heterogener als die Vielfalt an Immunglobulinen von naiven B-Zellen. Gleichzeitig gibt es Mechanismen zur Minimierung von autoaffinen T-Zellen, welche durch Bindung an körpereigene Peptide aktiviert werden können. So wird beispielsweise in Stromazellen im Thymusmark ein Protein exprimiert (AIRE), welches zur Expression von Proteinen aus anderen Geweben beiträgt (Anderson et al., 2002). Kommt es hier zu Fehlfunktionen können schwere Autoinflammationssyndrome entstehen.

In Abgrenzung zu den Immunglobulinen von B-Zellen kann der TCR nach der Aktivierung nicht durch Affinitätsreifung mit somatischer Hypermutation verändert werden (Murphy and Weaver, 2016).

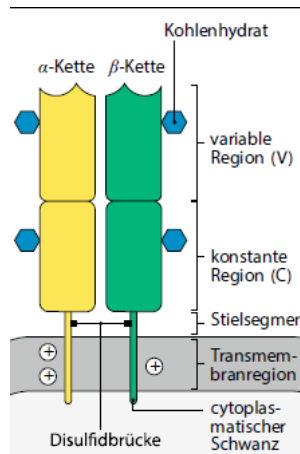


Abbildung 3: Der T-Zellrezeptor ist ein Heterodimer aus zwei Transmembrandomänen. Er ähnelt dem variablen Fragment eines Antikörpers. Anders als Antikörper kann der T-Zellrezeptor nur Peptide binden. (Murphy, K.M.T., P.; Walport, M., Janeway Immunologie. 9 ed. 2018: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; S.195). Nutzung der Grafik mit Genehmigung des Verlags Springer Berlin Heidelberg unter der Lizenznummer 1600254-1.

Die weiteren Ausführungen in dieser Arbeit beschränken sich auf die CD4⁺ T-Zellen, in der klassischen Immunologie T-Helferzellen (Th-Zelle) genannt, da traditionell angenommen wurde, dass sie keine unmittelbaren Effektorfunktionen aufweisen. Mehrheitlich weisen diese T-Zellen in Abgrenzung zu den CD8⁺ T-Zellen keine unmittelbar zytotoxischen Eigenschaften auf, sondern prägen, je nach Differenzierung, z.B. die Immunantwort der angeborenen Immunzellen (Makrophagen, Granulozyten) über ihre spezifischen Zytokinmuster, differenziert als Th1, Th2 oder Th17 Zellen, oder stimulieren als folliculäre Th-Zellen in Keimzentren die Affinitätsreifung der B-Zellen. Neuere Untersuchungen konnten auch in CD4⁺ T-Zellen cytotoxische Eigenschaften nachweisen (Cachot et al., 2021). Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) fallen auch unter die Gruppe der Th-Zellen. Diese werden klassischerweise durch die Expression von FOXP3 definiert und formen an Immunologischen Grenzflächen wie Schleimhäuten eine Immuntoleranz, welche eine überschießende Reaktion gegenüber Kommensalen z.B. im Darm verhindert.

Allen T-Zellen gemeinsam ist, dass sie bei Kontakt mit dem Antigen klonal expandieren und je nach Zytokinmilieu subdifferenzieren. Die Form der

Differenzierung wiederum wird durch die Interaktion des angeborenen Immunsystems mit dem Antigen bestimmt (s. T-Zellaktivierung). In vivo (Mausmodell) scheint die klassische Subtypdifferenzierung in die unterschiedlichen Subtypen (Th1, Th2, Th17) nicht nachweisbar zu sein, vielmehr kommt es je nach Pathogenexposition zu einer Zytokinexpression, welche im Verlauf der Infektion dynamisch ist und nicht einem Subtyp zuzuordnen ist (Kiner et al., 2021, van Beek et al., 2021).

1.2.1 T-Zellaktivierung

Um zur Effektorzelle zu werden, müssen T-Zellen aktiviert werden. Voraussetzung für eine adaptive Immunantwort ist, dass T-Zellen zirkulieren, deren TCRs ausreichend affin zum jeweiligen Antigen, bzw. zu einem Epitop des Antigens sind, um eine Konfigurationsänderung des TCRs zu bewirken. Dies geschieht im sekundären lymphatischen Gewebe. Damit eine CD4 positive Th-Zelle aktiviert werden kann, muss das Antigen von einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) auf einem MHC II Molekül präsentiert werden. APCs sind Zellen, welche über spezifische Rezeptoren oder membranständige Antikörper Antigene binden und Epitope des Antigens über MHC II an T-Zellen präsentieren können. Durch Chemotaxis sowie rezeptorvermittelt sind die Akteure der adaptiven Immunität im sekundären lymphatischen Gewebe derart angeordnet, dass ein Aufeinandertreffen von antigenpräsentierender Zelle sowie antigenaffiner T-Zelle besonders wahrscheinlich ist. So kann die klonale Expansion und Differenzierung des antigenspezifischen T-Zell Klons optimal gesteuert werden. Im Anschluss verlassen die aktivierten Effektorzellen das lymphatische Gewebe und rezirkulieren in den Kreislauf (Murphy and Weaver, 2016). Parallel vollzieht sich die Affinitätsreifung der B-Zellen, an deren Ende die Freisetzung von Antikörpern ins Blut als auch die Rezirkulation von Plasmazellen sowie Gedächtniszellen steht. Die Aktivierung einer naiven T-Zelle im sekundären lymphatischen Gewebe umfasst folgende Schritte:

1. Binden eines MHC: Peptid-Komplex auf einer APC an einen affinen TCR.

2. Ko-Stimulation über Rezeptoren: Liganden-Interaktion auf T-Zelle und APC. Diese beeinflusst wesentlich die Differenzierung der T-Zelle und kann sowohl aktivierend (CD28:B7.1/B7.2) als auch inhibitorisch (CTLA-4:B7.1/B7.2) sein.
3. Erst durch die Ausreifung der Interleukin 2 (IL2) Rezeptoren in der T-Zelle und durch autokrine Stimulation mit IL2 sowie linienspezifischer Interleukine der umliegenden Zelltypen erfolgt nun die klonale Expansion sowie Differenzierung der T-Zellklone in die unterschiedlichen Achsen (z.B. Tfh, Th1, Th2, Th17, Treg). (Murphy and Weaver, 2016).

1.2.2 CD4⁺ T-Zellen als Prognosefaktor bei soliden Neoplasien

CD4⁺ T-Zellen sind in Summe eine prognostisch günstige Zellpopulation bei soliden Malignomen. Bei der prognostischen Relevanz ist vor allem auch die Subdifferenzierung der T-Zellen wichtig. Die diskutierten Wirkmechanismen sind (modifiziert nach (Speiser et al., 2023)):

1. Direkt über cytotoxische CD4⁺-Zellen (ThCTLs) vermittelt (Oh and Fong, 2021): ThCTLs isoliert aus Proben von Patientinnen mit Melanom zeigten in vitro eine Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen, in welchen eine HLA-II Expression induziert wurde über Inkubation mit Interferon gamma (IFN γ) bzw. eine Transduktion von class II major histocompatibility complex transactivator (CIITA) (Cachot et al., 2021). Das Vorhandensein einer RNA-Signatur spezifisch für ThCTLs bei einer Patientinnengruppe mit Blasenkarzinom korrelierte mit dem Ansprechen auf eine anti-PD1 Therapie (Oh et al., 2020).
2. Indirekt über die Regulation angeborener wie adaptiver Immunzellen im Tumormikroenvironment (TME) durch Zytokine der CD4⁺ Subtypklassen: IFN γ , IL2 und TNF, klassischerweise Th1 Zytokine, hemmen die Angiogenese sowie Tumorproliferation. Regulatorische T-Zellen und follikuläre T-Zellen fördern das Tumorwachstum über die Hemmung der Immunaktivierung via CTLA4 bzw. den Verbrauch von aktivierendem IL2 (Kennedy and Celis, 2008, Borst et al., 2018, Speiser et al., 2023). Eine

eindeutige Zuordnung zu anti- und pro-Tumor Subtypen gilt als veraltet, da zum einen die Differenzierung der T-Zellklone weit komplexer ist als die traditionell beschriebenen Subtypen (Rutembusch et al., 2020, Kiner et al., 2021, van Beek et al., 2021) und zum anderen die Zytokine oft verschiedene Auswirkungen haben (Speiser et al., 2023).

3. CD4⁺ T-Zellen haben eine zentrale Rolle in der Orchestrierung der Prozesse in Keimzentren der sekundären lymphatischen Gewebe. Sie tragen zur Steuerung der Antikörperproduktion sowie der Differenzierung der aktivierten T-Zellen bei (Borst et al., 2018).

Zur Standardisierung der Nomenklatur und Vergleichbarkeit von Studienergebnissen definierte die Internationale Immuno-Oncology Biomarkers Working Group 2017 den Begriff der Tumorerinfiltrierenden Lymphozyten (TILs): Als "intra-epitheliale" Tumor infiltrierende Lymphozyten (iTILs) werden TILs benannt, welche im Tumor gezählt werden. Als "stromal" (sTILs) wurden TILs definiert, welche innerhalb 1,0 mm unterhalb der epithelialen Schicht liegen (Hendry et al., 2017, Hudry et al., 2022).

1.2.3 CD4⁺ T-Zellen als Prognosefaktor beim HGSC

In einem Kollektiv von 128 HGSC war das Vorhandensein von CD4⁺ TILs mit einer positiven Prognose assoziiert (Pinto et al., 2018b). In einer anderen Studie mit 76 EOCs hatte die CD4⁺ Lymphozytenzahl keinen Einfluss auf die Prognose, die CD4⁺ TILs korrelierten jedoch mit höheren Stadien. Im gleichen Kollektiv hatten die Typ II Tumoren die meisten CD4⁺ TILs (Arman Karakaya et al., 2021). In einer dritten Studie war eine hohe Zahl regulatorischer TILs mit einer schlechten Prognose assoziiert (Curiel et al., 2004)

In einer Untersuchung an 186 epithelialen Ovarialkarzinomen (EOCs) war die Abwesenheit von intraepithelialen Lymphozyten vergesellschaftet mit einer höheren Expression von VEGF sowie einer schlechteren Prognose (Zhang et al., 2003). In einer Untersuchung auf mRNA-Ebene war die Expression von IFN γ , einem Th1 Interferon, mit einem verbesserten 5-JÜL, die Expression von TGF β , einem Treg Interferon, mit einem reduzierten 5-JÜL korreliert (Nakamura et al.,

2019). IL17, ein klassisches Th17 Zytokin, gemessen im Aszites von EOC-Patientinnen, korrelierte in einer Untersuchung an 200 Patientinnen mit einem besseren Gesamt-Überleben (Kryczek et al., 2009). In einer weiteren Untersuchung an 97 Patientinnen mit high grade serösen Ovarialkarzinomen war die intratumorale CD4-Zahl mit einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert (Ukita et al., 2022).

1.3 MHC

Damit der TCR die Peptidsequenz von Pathogenen binden kann ist eine Gruppe von Oberflächenproteinen notwendig: Die major histocompatibility complexes (MHC). Benannt wurden sie 1958 vom Hämatologen Jean Dausset, der sie mit Kollegen initial auf Leukozyten nachwies, und sie daher human leukocyte antigen (HLA) nannte. Nur wenn eine ausreichende Übereinstimmung in diesen Genen besteht, ist die Wahrscheinlichkeit für eine Transplantatabstoßung niedrig genug. Die human leukocyte antigen Gene (HLA-Gene synonym zu MHC) sind hochpolymorph in der Population und überdies polygen in den Individuen. Es werden auf den homologen Chromosomen jeweils andere Genotypen derselben Klassen exprimiert. Die Bandbreite der Epitope, das sog. HLA-Ligandom, die für die TCR:APC-Interaktion zur Verfügung stehen, wird durch den individuellen Genotyp der MHC-Moleküle sowie Eigenschaften der jeweiligen Zellen bestimmt, somit besteht eine interindividuelle Heterogenität der Immunreaktion auch bei Infektionen mit identischen Antigenen (Rammensee et al., 2002). Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene MHC Molekül Klassen: Klasse I MHC sowie Klasse II MHC.

1.3.1 MHC I

MHC I wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Präsentiert werden Peptide aus dem Inneren der Zelle. MHC Klasse I: Peptid-Komplexe binden über den Korezeptor CD8 und den T-Zellrezeptor an CD8⁺ T-Zellen und bewirken eine Konformationsänderung. Das dient der Erkennung von fremden Proteinen wie sie zum Beispiel bei Virusinfektionen sowie in einer genetisch instabilen Tumorzelle (tumorassoziierter Antigene) gebildet werden. Im Rahmen der

Immunevasion verlieren viele Tumorzellen die Fähigkeit zur Expression von HLA I Molekülen (Garrido et al., 2010). Weiter soll auf die Klasse I Moleküle hier nicht eingegangen werden.

1.3.2 MHC II

Klassischerweise ist die Expression von MHC-II Molekülen auf antigenpräsentierende Zellen beschränkt. Im Unterschied zu MHC Klasse I werden auf MHC-II Molekülen Peptide aus dem extrazellulären Kompartiment bzw. Peptide, die sich bereits in Endosomen befinden präsentiert (z.B. sekretorische Proteine). MHC-II Moleküle dienen der Antigenpräsentation an CD4⁺ T-Zellen und binden über den TCR-Korezeptor CD4. Beiden MHC-Klassen gemeinsam ist, dass sie über eine Peptidbindungsstelle verfügen, in der einige exponierte Anker-Aminosäuren mit ihren Seitenketten über Wasserstoffbrücken mit dem Peptid eine stabile Bindung mit einer Vielzahl variabler Peptide eingehen können. Zudem ist die MHC II Peptidbindungsstelle offen, sodass anders als bei MHC I die Länge der Peptide nicht begrenzt ist.

Die Beladung der MHC-II Peptidbindungsstelle findet intrazellulär statt: Endosomen, die sich aus dem Golgi-Apparat abschnüren und die unbeladenes MHC-II beinhalten, fusionieren mit Endolysosomen, welche die Peptidfragmente der zu präsentierenden Proteine beinhalten. Das unbeladene MHC II Molekül ist bis zur Beladung mit den Peptidfragmenten an eine invariante Peptidkette (Ii) gebunden; so wird die Peptidbindungsstelle für eine ungerichtete Reaktion vor der Verschmelzung mit dem Endolysosom blockiert.

1.3.3 HLA-DR ein Isotyp von MHC II

Die MHC II Proteinfamilie besteht aus 3 Isotypen: HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ. Die Moleküle bestehen aus zwei Transmembranketten: α (34 kDa) und β (29 kDa) (vgl. Abbildung 4). Jede der Glykoproteinketten hat zwei Domänen. Beide Ketten bilden zusammen eine kompakte Struktur aus vier Domänen.

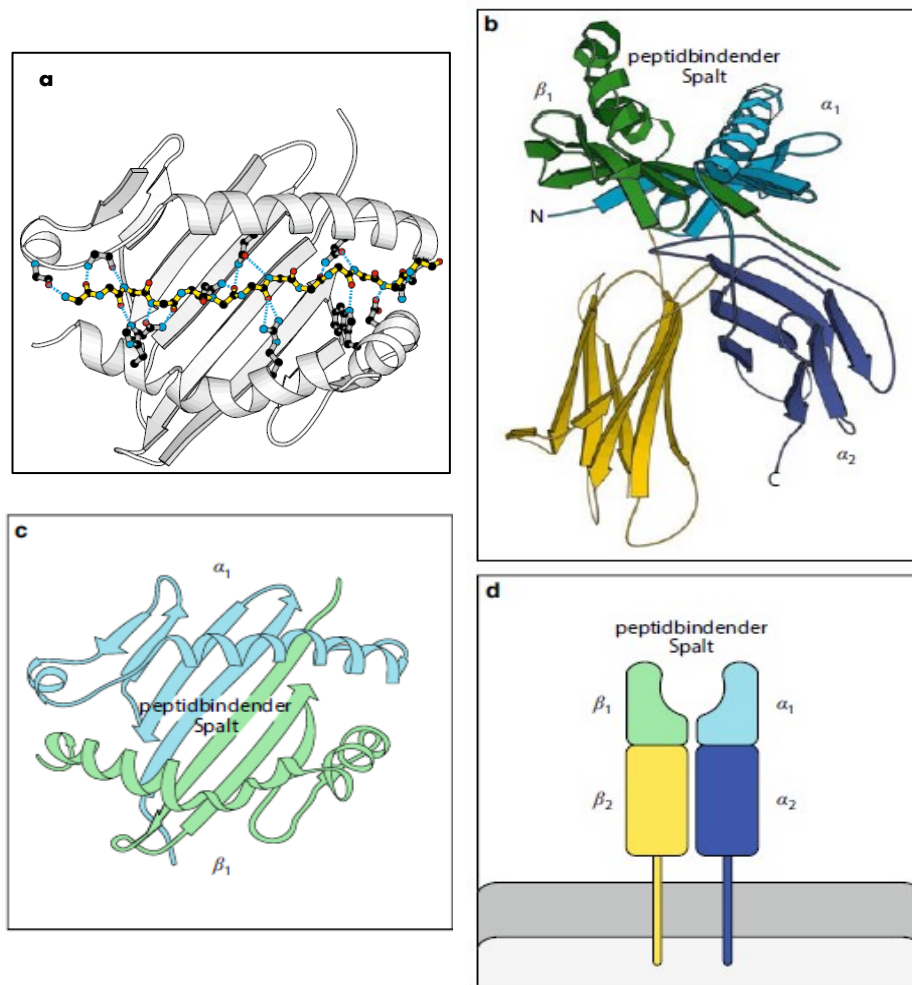


Abbildung 4: Schemazeichnung und Bändermodell von MHC II. a, b und c zeigen jeweils das Bändermodell, Abbildung a mit gebundenem Peptid (Peptidrückgrat gelb eingefärbt; Seitenketten der Anker-Aminosäuren des MHC II Moleküls grau eingefärbt, Wasserstoffbrücken blau gestrichelt). d zeigt schematisch ein MHC Klasse II Molekül. Modifiziert nach (Murphy, K.M.T., P.; Walport, M., Janeway Immunologie. 9 ed. 2018: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; S.198) Nutzung der Grafik mit Genehmigung des Verlags Springer Berlin Heidelberg unter der Lizenznummer 1600254-1.

HLA-DR setzt sich zusammen aus einer invarianten alpha-Kette, welche genetisch hochkonserviert ist, und einer genetisch polymorphen beta-Kette.

Die Varianz der Peptidbindungsstelle der HLA-DR Komplexe gehen auf die Polymorphismen der beta-Kette zurück (Dai et al., 2008). HLA-DP und HLA-DQ weisen sowohl alpha- als auch beta-Kette Polymorphismen auf (Victor A. McKusick, 1986).

Eine Arbeitsgruppe konnte 2016 eine hohe Übereinstimmung der Immunhistochemischen Detektion von MHC II exprimierenden Tumoren sowohl mit der Verwendung eines HLA-DR monoklonaren Antikörpers als auch eines

pan-MHC Antikörpers, welcher sowohl HLA-DR,-DQ -DP und -DX bindet, nachweisen (Johnson et al., 2016).

1.3.4 Die Regulation der MHC II Expression (in Tumorzellen)

Die Expression von MHC-II Molekülen ist nicht auf hämatopoetische Zellen beschränkt: Über das Th1 Zytokin IFN γ via JAK/STAT Signalwege kann die Expression von HLA-Klasse II Molekülen (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DO) induziert werden (Meraz et al., 1996, Rosa and Fellous, 1988). So werden MHC Klasse II Proteine zum Beispiel auch in der Diagnostik von Myositiden als Inflammationsmarker verwendet (Wiendl H., 2022). Dabei wird das Regulatorprotein class II transactivator (CIITA) aus der Familie der nucleotide-binding and leucine-rich-repeat Proteine (NLR) aktiviert (Chang et al., 1994, Ting et al., 2008). Es existieren vier Promotorregionen, welche die Expression unterschiedlicher Isoformen von CIITA kontrollieren (Muhlethaler-Mottet et al., 1998). Für die Induktion von HLA II in nicht-hämatopoetischen Zellen, ist der CIITA-Promoter IV der stärkste Treiber (Muhlethaler-Mottet et al., 1998, Piskurich et al., 1999, Waldburger et al., 2001). Auf die Expression von CIITA und damit auf MHC-II Moleküle haben neben IFN γ ebenfalls IL4, IL1 und LPS eine aktivierende Wirkung (Ting and Trowsdale, 2002). Einen hemmenden Einfluss haben TGF beta (Piskurich et al., 1999), IL10, IFN-beta, sowie PGE2 (Ting and Trowsdale, 2002).

Aufgrund der Induzierbarkeit von HLA-DR über IFN γ wird die Expression in Tumorzellen als Biomarker für inflammatorische Aktivität durch T-Zellen diskutiert (Axelrod et al., 2019). Eine Studie konnte eine konstitutive MHC II Expression in Melanomen via CIITA Promoter P1, welcher normalerweise nur in B-Zellen konstitutiv aktiv ist, jedoch auch in Abwesenheit von IFN γ zeigen (Deffrennes et al., 2001).

1.3.5 HLA-II als Prognosefaktor bei Tumoren

Die Expression von MHC II ist für viele Tumorentitäten belegt: Eine Vielzahl an Studien weist für eine HLA-II Expression auf Tumorzellen einen prognostischen Benefit nach (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht Publikationen zur Prognoserelevanz von HLA-II

Tumorentität	Publikation	Findings
Kolorektales Karzinom	(Bustin et al., 2001) (de Bruin et al., 2008); (Matsushita et al., 2006); (Andersen et al., 1993); (Løvig et al., 2002)	Expression Verbesserte Prognose
Pankreaskarzinom	(Gaida et al., 2012)	Mehr TILs
Adenokarzinom des Ösophagus	(Dunne et al., 2017)	Verbesserte Prognose
Melanom	(Brockner et al., 1984)	Expression
Larynxkarzinom	(Heng et al., 2023); (Sikorska et al., 1999)	Verbesserte Prognose, Ansprechen auf Anti-PD1 Therapie
Mamma CA	(Forero et al., 2016)	Verbesserte Prognose, mehr TILs

Bei Tumoren des Larynx, des Magens, des Pankreas, dem Mammakarzinom sowie dem kolorektalen Karzinom konnte die Expression von HLA-DR nachgewiesen werden und war mit einem längeren OS korreliert (Sikorska et al., 1999, Matsushita et al., 2006, Andersen et al., 1993, Løvig et al., 2002, Forero et al., 2016, Gaida et al., 2012). In einer Untersuchung an Patienten mit malignen Melanomen korrelierte die mit IHC nachgewiesene HLA-DR Expression positiv mit der CD4⁺ TIL- Zahl; die gezählten TILs wurden nicht weiter differenziert innerhalb der Th-Subtypen. Die Studie untersuchte weiterhin die prognostische Relevanz: Die HLA-DR Expression korrelierte mit einer besseren Prognose sowie auch dem Ansprechen auf eine anti-PD-1 Therapie. Zudem kamen unterschiedliche Antikörper zur Anwendung: Ein monoklonaler HLA-DR-Antikörper wurde mit einem pan-MHC II Antikörper verglichen, welcher HLA-DR, -DQ, -DP, -DX nachweisen kann. Es zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der Färbeargebnisse sowohl qualitativ als auch quantitativ. Eine HLA-DR Expression wurde hier als einerseits denkbarer Biomarker einer intratumoralen Inflammation und andererseits als möglicherweise funktionales Protein innerhalb der Antigenerkennungskaskade mit direkter Stimulation von CD4⁺ Th-Zellen durch Tumorzellen diskutiert (Johnson et al., 2016). In einer japanischen Studie an Magenkarzinomen aus 1994 korrelierte die immunhistochemisch nachgewiesene Expression von HLA-DR positiv mit einer vermehrten Invasion von nicht weiter

differenzierten TILs (Ma et al., 1994). Demgegenüber war in einer Untersuchung an Melanomen eine MHC II Expression mit aggressiveren Tumoren und einer schlechten Prognose korreliert. Hier wurde die MHC II Expression als Mechanismus zur Immunevasion diskutiert (Martins et al., 2009, Ostmeier et al., 2001).

1.3.6 HLA-II beim Ovarial CA

Es konnte gezeigt werden, dass Ovarialkarzinomzellen in Zellkultur mit IFN γ HLA-DRA exprimieren können (Gamzatova et al., 2007). In einer Untersuchung an 184 HGSC Patientinnen im Stadium III und IV war das OS der Gruppe mit hoher intratumoraler Expression von HLA-DMB einem Protein aus der Antigenprozessierungs-Kaskade von MHC II (Weber et al., 1996) signifikant länger als in der Gruppe mit niedriger intratumoraler HLA-DMB Expression. Ebenso korrelierte die CD8⁺ iTIL-Zahl positiv mit der HLA-DMB Expression (Callahan et al., 2008). Eine hohe Genexpression von HLA-DRB korrelierte signifikant mit einem verlängerten OS sowie DFS im Vergleich zur HLA-DRB schwachen Kontrollgruppe (Tegeler et al., 2022).

Eine Tübinger Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass HLA-DR auf EOC-Zellen heterogen exprimiert vorkommt, während es auf benignem Tubenepithel kaum exprimiert war. Eine weitere Analyse derselben Arbeitsgruppe zeigte, dass sich Peptide von im Tumor überexprimierten Genen wie unter anderem Mesothelin im Ligandom der HLA Klasse II finden (Schuster et al., 2017).

1.4 Konventionelle Chemotherapie und prätherapeutischer Immunstatus bei soliden Neoplasien

Dass der prätherapeutische Immunstatus mit dem Erfolg einer Chemotherapie korreliert, ist bereits gut belegt (Fridman et al., 2012, Zitvogel et al., 2011). So zeigte die Arbeit von Denkert et al., dass eine hohe Zahl an TILs in der diagnosesichernden Stanzbiopsie mit einem guten Ansprechen von Patientinnen mit Mammakarzinom auf eine neoadjuvante Anthrazyklin-/ Taxan- haltige Chemotherapie korreliert (Denkert et al., 2010). Auch eine Arbeit an Ovarialkarzinomen konnte zeigen, dass eine hohe Zahl CD3 positiver TILs mit einem guten Ansprechen auf eine Chemotherapie assoziiert war (Zhang et al., 2003).

Eine bereits bestehende spezifische CD4 anti-Tumor-Antwort korreliert mit einem verlängerten Gesamtüberleben. So wurde in einer Untersuchung an nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) die prätherapeutische Immunantwort gegenüber verschiedenen Telomerase-Epitopen, einem ubiquitären Tumorantigen, gemessen mit einem IFN γ -ELISPOT bestimmt. Das OS von Patienten, mit bereits vor Chemotherapie bestehender spezifischer Immunantwort war länger als das der Gruppe ohne reaktive T-Zellklone (Godet et al., 2012).

Einige cytotoxische Chemotherapien, darunter Anthrazykline und Paclitaxel, können einen immunogenen Zelltod auslösen. Darunter versteht man die Freisetzung von damage-associated molecular patterns (DAMPs). Dies trägt zu einer Immunisierung gegen den Tumor bei (Ahmed and Tait, 2020). Die Gabe von Paclitaxel konnte in einer Untersuchung an Ovarialkarzinomen einen immunogenen Zelltod der Tumorzellen auslösen (Lau et al., 2020).

1.5 Tumorantigen Mesothelin

Mesothelin ist ein ca. 69 kDa schweres Membranprotein. Es ist über Glycosylphosphatidylinositol in der Zellmembran verankert. Kodiert wird es durch das Gen *MSLN* auf dem kurzen Arm des Chromosom 16, 16p13.3. Durch monoklonale Antikörper, die aus der Immunisierung von Mäusen mit Zellen der OVCAR-3 Zelllinie stammen, wurde es erstmals als Antigen auf verschiedenen Geweben, darunter Ovarial- und Zervixkarzinomen, beschrieben (Chang et al., 1992). Es wird physiologischerweise von Mesothelzellen exprimiert (O'Leary et al., 2016). Außerdem wird es in epithelialen Ovarialkarzinomen, Mesotheliomen, Adenokarzinomen des Pankreas und einigen kolorektalen Adenokarzinomen überexprimiert (Hilliard, 2018). Es existieren mehrere RNA-Transkripte, welche durch alternatives Splicing generiert werden (O'Leary et al., 2016)(Abbildung 5).

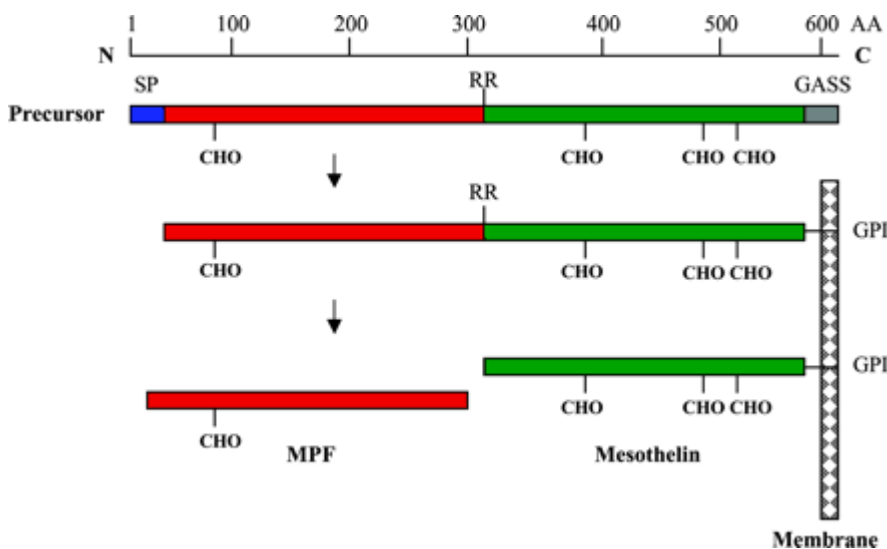


Abbildung 5 Die Syntheseschritte von MSLN. Zunächst wird aus dem Vorläufer mit 622 Aminosäuren (AA) und 77kDa Masse ein Signal Peptid (SP) abgespalten, anschließend erfolgt die Bindung an die Zellmembran via Glycosylphosphatidylinositol-Anker-Sequenz (GASS) und Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI). Zum Schluss wird der lösliche sogenannte megacaryocyte potentiation factor (MPF) an der Furinbindungsstelle (RR) abgespalten. (Hassan et al., 2004) © 2004, American Association for Cancer Research, Lizenznummer 6010731331550

Nach der Proteinbiosynthese wird zunächst ein Signalpeptid abgespalten. Im Anschluss wird ein lösliches Protein, genannt megacaryocyte potentiation factor (MPF), welches in vitro Megakaryozyten stimulieren kann (Kojima et al., 1995), von Furin proteolytisch abgespalten (Hassan et al., 2004).

Es existiert eine lösliche Form, auch soluble MSLN-related Protein (SMRP) genannt. Die Beteiligung von Proteasen parallel zum alternativen Splicing wird

als Entstehungsmechanismus von SMRP diskutiert (Sapede et al., 2008). Diese lösliche Form des Mesothelins kann im Serum von Patientinnen mit Ovarialkarzinom nachgewiesen werden (Huang et al., 2006). Dabei korreliert die Serumkonzentration direkt mit der Expression im Tumorgewebe (Hanaoka et al., 2017). Die genaue biologische Funktion von MSLN ist bislang ungeklärt. MSLN-defiziente Mäuse entwickeln und reproduzieren sich normal (Bera and Pastan, 2000). Eine Interaktion mit dem MAPK Pathway wird diskutiert (Chang et al., 2012, Chang et al., 2009). Als physiologischer Ligand wurde das Muzin CA-125 (Rump et al., 2004) identifiziert. CA-125 ist im Serum von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen erhöht und wird als Tumormarker verwendet. Es wird in den meisten Ovarialkarzinomen überexprimiert. Die MSLN:CA-125 Bindung soll zur Bildung von intraperitonealen Tumorzellaggregaten beitragen. Die dann im Zellverbund stabileren Tumorzellen können dadurch Mikrometastasen unter anderem im Peritoneum bilden (Hilliard, 2018, Coelho et al., 2020) (Abbildung 6).

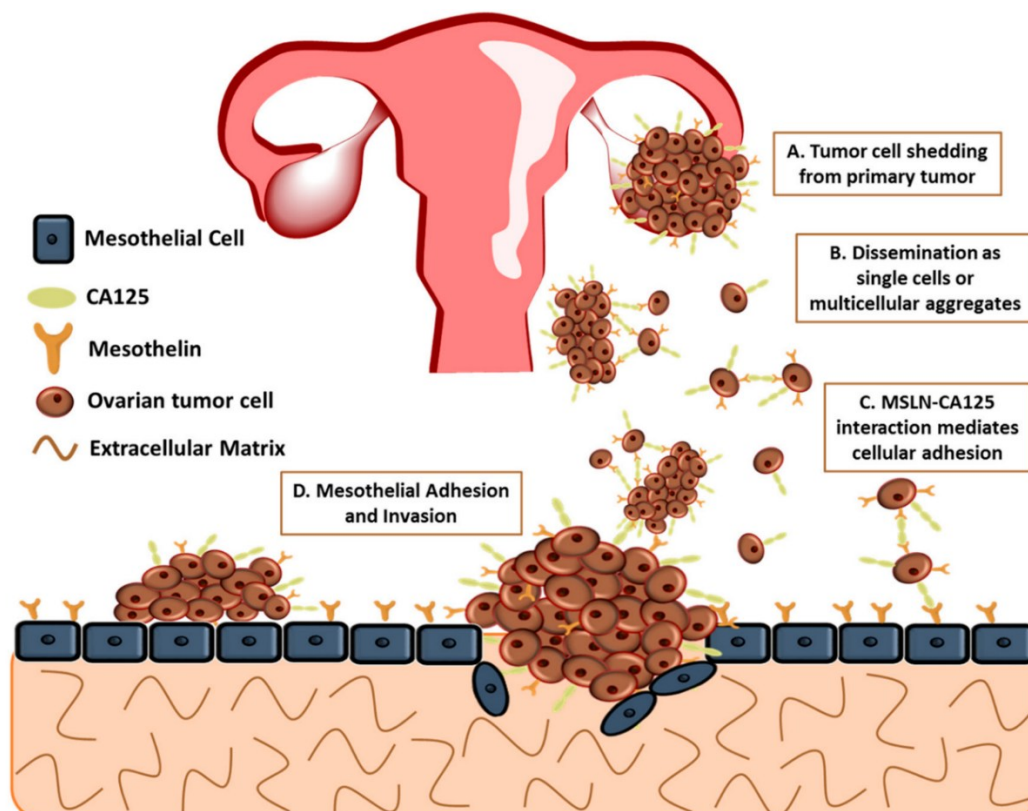


Abbildung 6: Die Mesothelin:CA 125 Bindung kann zur Bildung von Tumorzellverbänden beitragen. Die dann im Zellverbund stabileren Tumorzellen können Mikrometastasen im Peritoneum bilden. (Hilliard, 2018)
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Eine hohe MSLN-Expression korreliert in einigen Tumoren, wie z.B. kolorektalen Karzinomen (Inoue et al., 2020) und Adenokarzinomen der Lunge (Thomas et al., 2015), mit einem verringerten OS und DFS.

Ein Anti-Mesothelin antibody-drug conjugate (ADC), Anetumab ravtansine, zeigte in einer kleinen Phase 1b Studie an 65 Patientinnen mit MSLN-exprimierenden Ovarialkarzinomen Ansprechraten von bis zu 42 % (Santin et al., 2023). Zuvor war von Hassan et al. 2020 in einer Untersuchung an 145 Patienten mit MSLN-exprimierenden soliden Tumoren die Sicherheit und Anti-Tumoraktivität von Anetumab ravtansine gezeigt worden (Hassan et al., 2020). Für verschiedene Ovarialkarzinom-Modelle hatte 2018 eine Arbeitsgruppe der BAYER AG gezeigt, dass eine ADC-Monotherapie mit Anetumab ravtansine in vitro gute Antitumoraktivität ausschließlich bei MSLN-exprimierenden Tumoren zeigte (Quanz et al., 2018).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit möchte einen klinisch bedeutsamen Beitrag zur Stratifizierung und immunologischen Charakterisierung der Entität des high-grade serösen tubo-ovariellen Karzinoms leisten. An einem klinisch und pathologisch nach aktuellem Goldstandard stratifizierten Kollektiv von 387 Patientinnen wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Die Immunhistochemie stellt eine kosteneffiziente und zumeist überall verfügbare Methode dar. Zudem sind direkte Rückschlüsse auf Proteinexpression und deren Lokalisation im Tumor- und/oder tumorumgebenden Gewebe möglich. Die hier verwendeten Antikörper sind kommerziell erhältlich. Folgendes wurde untersucht:

- Die Zahl von CD3⁺/CD8⁻ Zellen als Korrelat von intratumoralen T-Helferzellen, einer T-Zellgruppe, welcher in der Vergangenheit eine den CD8⁺-T-Zellen untergeordnete Rolle zugeschrieben wurde, deren klinische Relevanz jedoch auch im Kontext der Immuntherapien neu bewertet werden muss.
- Auf den Tumorzellen exprimiertes HLA-DRA, das aus der Familie der MHC-Komplexe am höchsten konservierte Protein, welches möglicherweise ein weiterer geeigneter Marker ist, um die tumorspezifische inflammatorische Aktivität abzubilden.
- MSLN, ein physiologisch auf Mesothelzellen exprimiertes Membranprotein, welches derzeit wieder an Relevanz gewinnt, da aktuell zielgerichtete anti-MSLN-Therapien in klinischen Studien erprobt werden.

1.6.1 Konkrete Fragestellung zu CD3⁺/CD8⁻ TILs:

- Hat die TIL-Zahl einen positiven Einfluss auf OS bzw. DFS im Gesamtkollektiv?
- Ist es für das OS oder DFS relevant, ob es sich um stromale oder intraepitheliale Lymphozytenvorkommen handelt?
- Gibt es einen statistischen Zusammenhang zwischen einer schwächeren Tumordissemination, einem niedrigerem Tumorstadium, einem optimalen Resektionsstatus und der TIL-Zahl?

- Gibt es einen Unterschied zwischen der Gruppe mit einer hohen postoperativen/ prätherapeutischen TIL-Zahl und der Gruppe mit einer niedrigen postoperativen/ prätherapeutischen TIL-Zahl bezogen auf den Erfolg einer adjuvanten Chemotherapie?

1.6.2 Konkrete Fragestellung zu HLA-DRA:

- Hat HLA-DRA einen positiven oder negativen Einfluss auf OS bzw. DFS im Gesamtkollektiv?
- Gibt es einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der TIL-Zahl und der HLA-DRA Expression? Macht es einen Unterschied, ob die Lymphozyten hierbei im Epithel oder im Stroma gelegen sind?
- Gibt es einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen einer schwächeren Tumordissemination, bzw. einem niedrigerem Tumorstadium, einem optimalem Resektionsstatus und der HLA-DRA-Expression?
- Gibt es einen Unterschied zwischen der HLA-DRA hoch-exprimierenden Gruppe (HLA-DRA-H) und der HLA-DRA schwach-exprimierenden Gruppe (HLA-DRA-L) bezogen auf den Erfolg einer adjuvanten Chemotherapie?

1.6.3 Konkrete Fragestellung zu Mesothelin:

- Hat MSLN einen positiven oder negativen Einfluss auf das Gesamt- und/oder rezidiv-freie Überleben?
- Gibt es einen Hinweis darauf, dass stark MSLN exprimierende Tumoren, stärker disseminieren und somit ein höheres Tumorstadium und eventuell inkomplette Resektabilität aufweisen als MSLN-schwach exprimierende Tumoren?
- Gibt es einen Unterschied zwischen der MSLN-hoch exprimierenden Gruppe (MSLN-H) und der MSLN-schwach exprimierenden Gruppe (MSLN-L) bezogen auf den Erfolg einer adjuvanten Chemotherapie?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenpopulation

In dem hier untersuchten Kollektiv an HGSC sind Proben von 407 Patientinnen enthalten, die in der Universitätsfrauenklinik Tübingen zwischen den Jahren 1999 und 2016 die Diagnose eines high-grade serösen Ovarialkarzinoms erhielten. Alle unterzogen sich einer Operation und erhielten eine neoadjuvante bzw. adjuvante Chemotherapie. Die Therapie erfolgte in der Universitätsfrauenklinik Tübingen. Die pathologische Diagnostik erfolgte im Institut für Pathologie Tübingen. Die im Folgenden untersuchten Proben entstammen dem Archiv des Instituts für Pathologie Tübingen.

Bei der Operation handelte es sich um die tumortypische Operation mit angestrebter kompletter Zytoreduktion. Gemäß FIGO wurde ein operatives Staging durchgeführt und der Resektionsstatus sowie Histotyp dokumentiert. Ebenfalls wurden die folgenden klinischen Daten erhoben: Alter, Zeitpunkt der Diagnosestellung, der Erhalt von neoadjuvanter sowie adjuvanter Chemotherapie sowie die verabreichte Substanz. Im Follow-up wurden Überleben sowie das Datum der Rezidiv-Diagnose, als auch im Todesfall das Sterbedatum erhoben. Nicht erhoben wurde, ob Bevacizumab Teil des Therapieregimes war.

Die klinischen Daten zu den Fällen wurden in der Universitätsfrauenklinik Tübingen erhoben und von Herrn Prof. Dr. Stefan Kommoss und Herrn Dr. Marcel Grube mittels der RedCap Datenbank bereitgestellt. Die in die Auswertung eingeflossenen Parameter finden sich im Ergebnisteil wieder. Zusammengestellt wurde das Kollektiv aus Teilkollektiven der Vorgängerstudien von Fr. Dr. D. Pham, Fr. Dr. A. Fischer und Fr. Dr. Britta Ney. Ebenso wurden die pathologischen Untersuchungsberichte vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt. Histotyp, Resektionsstatus, FIGO-Stadium sowie Grading der untersuchten Tumorblöcke sind erhoben worden und in die Datenbank eingeflossen.

Zusätzlich zum Histotyp, entnommen aus den histopathologischen Befunden des Instituts für Pathologie, wurde mithilfe eines immunhistochemischen Algorithmus,

modifiziert nach Köbel et. al (Köbel et al., 2016), durch Frau Dr. Nina Neudeck, Frau Dr. Anna Fischer sowie Prof. Dr. Annette Staebler der Histotyp bzw. die finale Diagnose gemäß der WHO-Klassifikation von 2020 erneut klassifiziert und gegebenenfalls korrigiert. Siehe hierzu Doktorarbeit von Frau Dr. Nina Neudeck (Neudeck, 2023).

In die vorliegende Doktorarbeit sind nur die Fälle mit dem abschließenden Histotyp high-grade seröses Karzinom (HGSC) eingeflossen. Fälle mit anderen finalen histologischen Diagnosen wurden ausgeschlossen.

Das Projekt wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen im Rahmen des Projektes C14 aus dem SFB 685 bewilligt.

2.2 Erstellen von Tissue Microarrays (TMA)

Für die Zusammenstellung des Kollektivs wurden Proben von Ovarialkarzinomen über die Jahre retrospektiv von unterschiedlichen Mitarbeitenden aus dem Archiv des Pathologischen Instituts herausgesucht. Welche Schnitte den Primärtumor bzw. Metastasen tragen wurde den pathologischen Befunden entnommen. Im Anschluss daran wurden die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte aus dem Archiv herausgesucht und diese auf ihre Verfügbarkeit und Verwendbarkeit hin überprüft. Im Anschluss daran wurden von den zugehörigen Paraffinblöcken Schnitte erstellt. Auf diesen wurden durch Pathologen mit gynäkopathologischer Zusatzausbildung (Frau Prof. Dr. Annette Staebler oder Herrn PD Dr. Hans Bösmüller) die Regionen, die ausreichend vitale Tumorzellen tragen, markiert. Die Markierung wurde im Anschluss auf den Paraffinblock übertragen und daraus wurden schließlich, wie Abbildung 7 zeigt, mit einem Instrument zum Erstellen von Tumor Microarrays Stanzzylinder aus der tumortragenden Region entnommen und in einen vorbereiteten Empfänger-Paraffinblock eingefügt. Es wurden pro Patientin insgesamt 6 bis 12 Stanzproben mit einem Durchmesser von 0,6 mm gestanzt. Als Kontrollgewebe oder Platzhalter wurde benignes Tuben- oder Ovarialgewebe eingesetzt. Bei 12 verfügbaren Stanzproben wurden sechs aus zentralen Tumoranteilen und sechs aus peripheren Tumoranteilen entnommen. Bei Fällen, welche auf sechs Stanzproben vorliegen, wurden drei je

Ovar entnommen, um die potenzielle Tumorerheterogenität bei Bilateralität abzubilden. Beim Vorliegen eines unilateralen Tumors, wurden alle 6 Stanzproben aus dem betroffenen Ovar entnommen.

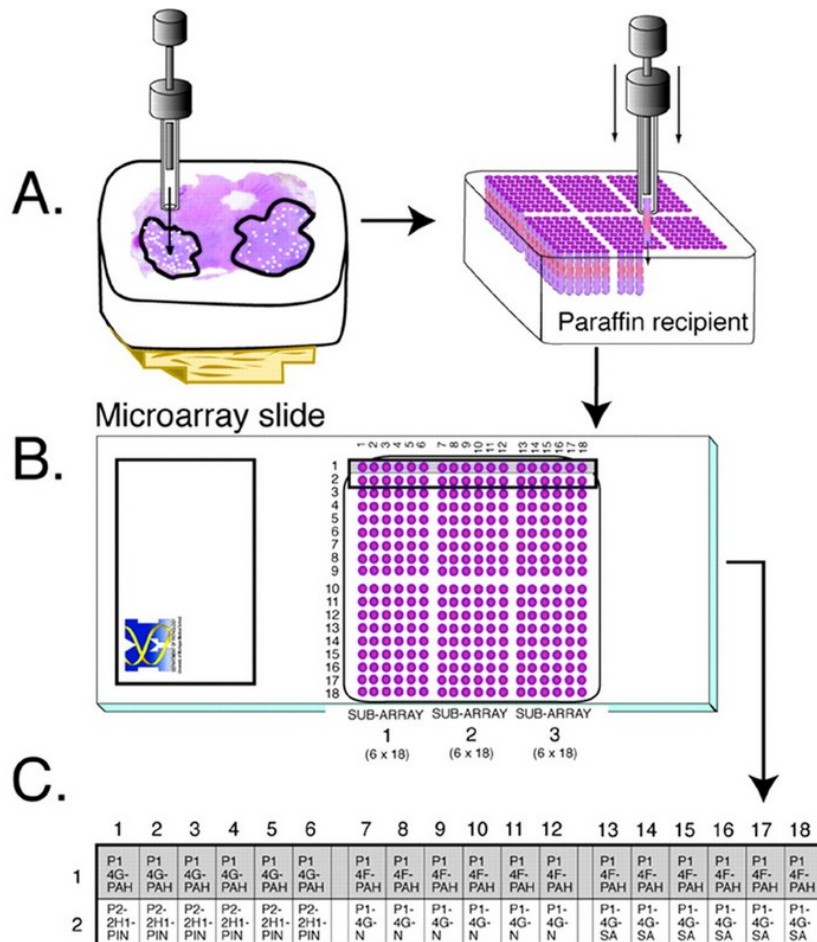


Abbildung 7: Arbeitsprozess bei der Erstellung von TMAs. A: Dem Paraffinblock wird aus dem markierten Bereich eine Probenstanze entnommen. Die entnommene Probenstanze wird in einen neuen Paraffinblock eingefügt. B: Schema eines Objektträgers mit einem Schnitt des TMA. Unterschiedliche Proben können nun auf einem Objektträger angefärbt und analysiert werden. C: Ein Stanzprotokoll trägt die Information, welche Proben an welchem Platz sitzen. Grafik entnommen aus (Manley et al., 2001); Nutzung der Grafik mit Erlaubnis des Elsevier-Verlages unter der Lizenznummer 6077680860890.

Die TMAs wurden anschließend 2-malig für 20 min bei 56°C erhitzt, damit die Stanzproben mit dem Matrixparaffinblock verschmelzen. Zur folgenden Immunhistochemie wurden von den TMAs 2,5 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf einen positiv geladenen Objektträger gezogen. Die Stanzprotokolle mit Herkunftsorgan und die anonymisierte Patienten ID sind für alle verwendeten TMAs aufgrund der großen Datenmenge digital zu erhalten. Ein Ausdruck ist im Institut für Pathologie Tübingen archiviert. Gleiches gilt für die händisch notierten Auswertungsergebnisse der Antikörperfärbungen.

Die Erstellung der TMAs wurde von Frau Christine Beschorner und von Frau Dr. med. Britta Ney durchgeführt. Die technische Umsetzung der TMA-Planung und Erstellung erfolgte für alle TMAs durch Frau Christine Beschorner. Die TMAs wurden von Frau Karen Greif sowie Christine Beschorner geschnitten. Das Ausheben der für die Studie in Frage kommenden Gewebeblöcke sowie die Archivarbeit wurde von Frau Dr. Anna Fischer, Frau Dr. Britta Ney, Frau Dr. Deborah Pham und Frau Dr. Nina Neudeck, Frau Karen Greif und Christine Beschorner geleistet. Für die TMA-Serien 52.1 – 52.5; 53.1 - 53.2; 54 erfolgte die Archivrecherche und Kollektivzusammenstellung durch Frau Dr. Britta Ney, Frau Dr. Anna Fischer, Herrn PD Dr. Hans Bösmüller und Frau Prof. Dr. Annette Staebler. Für die TMA-Serie 62.1 - 62.6 + 78 erfolgte die Archiv-recherche und Kollektivzusammenstellung durch Frau Dr. Jana Pasternak, Frau Dr. Anna Fischer, Frau Dr. Britta Ney.

2.3 Immunhistochemie

Die für diese Arbeit interessanten Protein- und Oberflächenmolekül-Marker wurden in unserem Kollektiv mithilfe von immunhistochemischen Färbungen (IHC) untersucht. Die so entstandenen Objektträger lassen sowohl eine HE-morphologische (Hämatoxylin-Eosin) als auch Protein-biochemische Analyse des Gewebes zu (IHC zur präzisen Verortung der Protein-/Antigen-Lokalisation).

2.3.1 Einzelfärbung

Für MSLN und HLA-DRA wurden Einzelfärbungen angefertigt. Verwendet wurde ein dreistufiges System mit DAB (s. Tab.1; s. Abb. 8). Der ausgewählte Primärantikörper wird von einem polyklonalen Sekundärantikörper (HQ-Linker) gebunden. Dieser ist spezifisch für Immunglobuline der Spezies Maus und Kaninchen und bindet zur Signalverstärkung den tertiären Antikörper, an den das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden ist. Dieses bewirkt unter Zugabe von H₂O₂ und 3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) braune Präzipitate an den antigentragenden Zellkompartimenten. Anschließend folgt eine Gegenfärbung mit HE zur histomorphologischen Beurteilbarkeit. Nachfolgend

findet das sog „Blueing“ statt, um die HE Färbung in helle Blautöne umzufärben: Mithilfe von Lithium-Ionen und dem Anheben des pH-Werts wird der Farbton der HE-Färbung geändert; die Spezifika der Färbung bleiben gleich (Roche).

2.3.2 Doppelfärbung CD3/CD8

Um intratumorale CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺ TILs) zu identifizieren, verwendeten wir eine CD3/CD8 Doppelfärbung. CD3 ist ein Ko-Rezeptor des TCR und wird auf allen T-Zellen exprimiert. CD8 ist ein Membranprotein, welches zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen sowie dendritische Zellen exprimieren. Bei der Doppelfärbung wurden ausschließlich Lymphozyten gezählt, welche rot (CD3⁺), nicht aber braun (CD8⁺) angefärbt wurden. Diese Färbung identifiziert T-Zellen, welche CD8 negativ sind. In diese Gruppe fallen alle CD4⁺ T-Zellen und zu einem kleinen Anteil doppelt negative T-Zellen (Wu et al., 2022).

Für die CD3/CD8 Doppelfärbung wurde zunächst die Färbung mit dem anti-CD8 Primärantikörper und dem DAB-Kit aufgebracht. Im Anschluss daran wurde der anti-CD3 Primärantikörper aufgebracht und mithilfe einer indirekten IHC rot angefärbt. Der verwendete Sekundärantikörper ist konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (s. Tabelle 2, Abbildung 8).

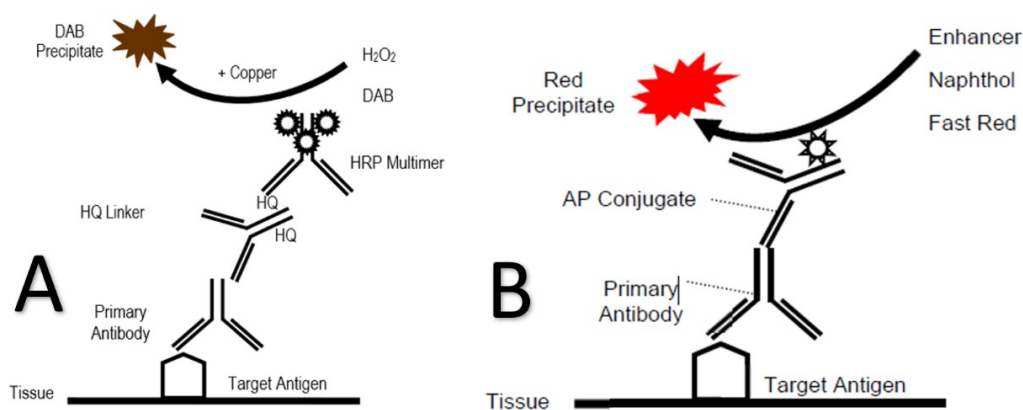


Abbildung 8: Schemazeichnung des OptiView DAB IHC Detection Kits (A) und des UltraView AP red Detection Kits (B).
A: Ein Primärantikörper bindet einen Sekundärantikörper, passend für mehrere Spezies (HQ Linker) und dieser bindet einen Tertiär Antikörper, welcher mit HRP gekoppelt ist welches unter Zugabe von Kupfer DAB ausfällt. (Produktdatenblatt für OptiView DAB IHC Detection Kit; Ventana Medical Systems, Inc. Arizona/ USA 06/2011)
B: Ein Primärantikörper bindet einen Sekundärantikörper, welcher direkt mit alkalische Phosphatase gekoppelt welche Naphthol fast red ausfällt (AP Conjugate). (Produktdatenblatt für UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit, Ventana Medical Systems, Inc., Arizona USA 04/2022)

Im Anschluss daran erfolgt die HE-Gegenfärbung und das Blueing. Die Immunhistochemischen Färbungen wurden an den Immunfärbesystemen Ventana Benchmark XT und Ventana Benchmark Ultra mit kommerziell erhältlichen Antikörpern und Reagenzien (s. Tabelle 2) durchgeführt.

Tabelle 2 : Spezifikationen der verwendeten Reagenzien. Die verwendeten Programme sind im Anhang zu finden.

	Antikörper Klon; Herstellerinformation	Spezies	Verdünnung Antikörper	Detektion Kit	Gerät
MSLN	Klon: SPM 143, GTX15230, GeneTex	Maus monoklonal	1:100	OptiView DAB Detektion Kit der Fa. Roche	Ventana Benchmark XT Programm 8
HLA- DRA:	Klon: TAL.1B5, Code-Nr. M0746, Dako	Maus monoklonal	1:400	OptiView DAB Detektion Kit der Fa. Roche	Ventana Benchmark XT Programm 8
DF (CD3), rot	Klon: SP7, CI597R06 CI597C01, CI597C002, DCS ImmunoLine	Kaninchen IgG	1:50	UltraView Universal AP Detektion Kit der Fa. Roche	Ventana Benchmark Ultra Programm 243
DF (CD8), braun	Klon: C8/144B Code M7103, Dako	Maus Monoklonal	1:150	OptiView DAB Detektion Kit der Fa. Roche	Ventana Benchmark Ultra Programm 243

Die Antikörper für HLA-DRA und MSLN wurden von Hand auf die Objektträger pipettiert. Anschließend wurde das Programm des Vollautomaten fortgeführt. Im Anschluss wurden die Schnitte durch eine Verdünnungsreihe entwässert: Alkohol absteigend in der Konzentration von 1:100, 1:10, 1:1, Xylol in der Konzentration von 1:100, und von Hand mit einem Deckglas versehen. Die Färbung und weitere Prozessierung wurde von Frau Karen Greif, Frau Christine Beschorner sowie in Einzelfällen von mir selbst durchgeführt.

Abbildung 9 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt eines Anti-MSLN/ HE gefärbten TMAs, welcher auf 12 Cores einen Fall abbildet.

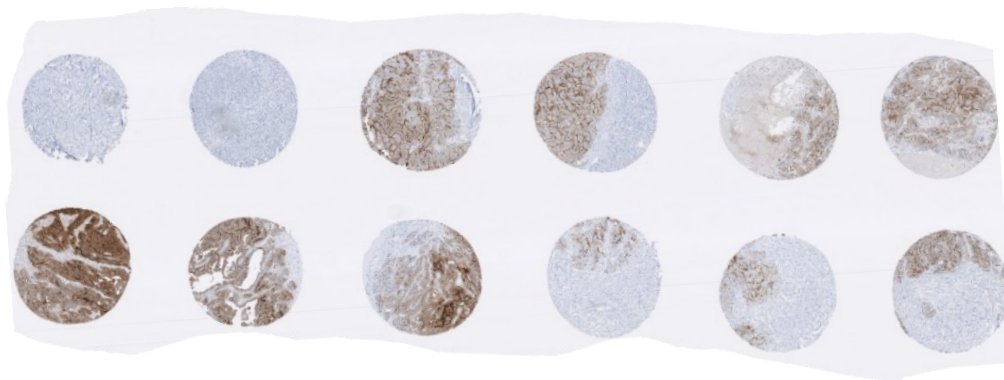


Abbildung 9: Abbildung eines mit Anti-Mesothelin/ HE gefärbten TMAs. Abgebildet wird ein Fall auf 12 Stanzproben; Scans erstellt mithilfe von Roche Ventana DP 200 slide scanner, bearbeitet mit ViewPoint; PreciPoint GmbH Alois-Steinecker-Straße 22 85354 Freising, Bavaria, Germany.

2.3.3 Immunhistochemische Scores

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für MSLN (s. Tabelle 3) und HLA-DRA (s. Tabelle 4) wurde ein Immunreaktivitätsscore (IRS) ähnlich dem Allred-Score entwickelt.

Tabelle 3: Verwendetes Scoring System für MSLN (mod. Allred-Score). MSLN zeigt eine membranäre Färbung. Verwendeter Klon: SPM 143.

Positive Zellen %	Expression Score (ES)	Intensität	Intensität Score (IS)
0	0	keine	0
1-10	1	schwach	1
11-50	2	intermediär	2
51-80	3	stark	3
>80	4		
Gesamtscore: ES x IS			

Tabelle 4: Verwendetes Scoring System für HLA-DRA (mod. Allred-Score). Für HLA-DRA wurde ES und IS erfasst. Verwendeter Klon: TAL.1B5.

Positive Zellen %	Expression Score (ES)	Intensität	Intensität Score (IS)
0	0	keine	0
1-10	1	schwach	1
11-50	2	intermediär	2
51-80	3	stark	3
>80	4		

Die CD4⁺ Lymphozyten wurden nach ihrem Vorkommen intraepithelial (= intratumoral), stromal oder im gesamten Core numerisch ausgezählt und dies wurde, getrennt aufgeführt, je Core dokumentiert.

2.4 Datenerhebung

2.4.1 Immunhistochemische Auswertung und Erhebung der molekularen Daten

Die immunhistochemische Auswertung wurde für MSLN und HLA-DRA von mir selbst vorgenommen und im Anschluss von Frau Prof. Dr. Annette Staebler (für MSLN) bzw. Frau Dr. Anna Fischer (für HLA-DRA) bestätigt bzw. korrigiert, und von mir dokumentiert und digitalisiert. Die Auswertung der Doppelfärbung CD3/CD8 wurde von Frau Dr. Anna Fischer durchgeführt und von mir dokumentiert und digitalisiert.

2.5 Statistische Analyse

Die Rohdaten wurden von mir mittels EXCEL (Microsoft Corporation, 2018. Microsoft Excel, <https://office.microsoft.com/excel>.) verarbeitet. Daraus wurden für Mesothelin Mittelwert, Minimum und Maximum errechnet. Für HLA-DRA wurden Mittelwert, Minimum, Maximum und Median jeweils für Intensität und Expression errechnet. Für die CD3/CD8 Doppelfärbung wurden Mittelwert, Maximum, Minimum und Median jeweils für iTILs/ sTILs und aTILs errechnet. Für einzelne fehlende Daten bezüglich einzelner Marker wurde angenommen, dass das Fehlen der Daten keinem systematischen Fehler unterliegt, somit wurden inkomplette Fälle nicht zensiert. Die statistischen Analysen wurden mithilfe von IBM SPSS Statistics durchgeführt (IBM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp).

3 Ergebnisse

3.1 Das untersuchte Kollektiv - Deskriptive Statistik der klinischen Parameter

Das final untersuchte Kollektiv enthält Proben und auswertbare Daten von 387 Patientinnen, die zwischen den Jahren 1999 und 2015 operiert wurden. Die Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 25 und 90 Jahre alt (MW 62 Jahre; Std. Abw. 11 Jahre). Die Patientinnen wiesen größtenteils ein FIGO-Stadium 3 oder höher auf (n=341; 81%). Eine komplette Resektion (R0) konnte in 139 Fällen (36,4%), eine mikroskopisch inkomplette Resektion (R1) in 146 Fällen (38%) erreicht werden. Ein makroskopischer Rest-Tumor (R2-Resektion) musste in 90 Fällen (23%) belassen werden (s. Tabelle 5). Von 387 Patientinnen erhielten 282 (72%) eine adjuvante Chemotherapie gemäß Beschluss der interdisziplinären Tumorkonferenz analog den jeweils gültigen Therapieempfehlungen; in der Mehrheit Carboplatin + Paclitaxel. Der Erhalt der jeweiligen Substanz sowie die zusätzliche Gabe eines anti-VEGF Antikörpers (Bevacizumab) wurde in dieser Untersuchung nicht weiter differenziert. Für das OS im Kollektiv ergaben sich folgende Kennzahlen: Minimum: 4 Tage (Tod); Maximum: 6894 Tage (last follow up; 18,8 Jahre); Median: 1017 Tage = 2,7 Jahre; Std.-Abw. Tage; 5-JÜL: 28%; 10-JÜL: 9,6%.

Tabelle 5: Klinische Charakteristika des untersuchten Kollektivs.

Klinische Charakteristika des untersuchten Kollektivs			
		Anzahl	Anteil in %
Gesamt		387	100%
Alter beim Zeitpunkt der Diagnose			
Jünger als 60 Jahre		140	36%
Älter als 60 Jahre		247	64%
FIGO-Stadium			
I		14	4%
II		28	7%
III		275	71%
IV		66	17%
Fernmetastasen			
M0		251	65%
M1		66	17%
Keine Angabe		70	18%
Resektionsstatus			
R0; 0mm		139	36%
R1; 1 bis 10 mm		146	38%
R2; mehr als 10 mm		90	23%
Keine Angabe		12	3%
Adjuvante Chemotherapie			
erhalten		282	72%
Nicht erhalten		103	27%
Keine Angabe		2	1%
Gesamtüberleben			
5 Jahresüberleben		107	28%
10 Jahresüberleben		37	9,6%

3.2 Zusammenhang von Mesothelin, HLA-DRA sowie der CD4-Zellzahl mit klinischen Parametern

Um zu überprüfen, ob sich die klinischen Parameter Alter, FIGO-Stadium und Resektionsstatus zwischen den einzelnen Expressionsstufen von HLA-DRA, MSLN bzw. der Lymphozytenzahl unterscheiden, wurden Kreuztabellen erstellt.

3.2.1 Mesothelin Muster der Immunfärbung und Expression

MSLN zeigte in der Regel aufgrund seiner Funktion als Membranprotein und Lokalisierung innerhalb der Zelle eine zumeist moderate membranäre Färbung (vgl. Abbildung 10). Für den Marker MSLN wurden je Fall Minimum, Maximum sowie Mittelwert des IRS (Immune Reactivity Score = modifizierter Allred Score) erhoben. Technisch bedingt lagen für 40 Fälle keine Daten vor. Die Fälle ohne Daten zu MSLN blieben jedoch für die übrigen Analysen erhalten. Im untersuchten Kollektiv konnten somit 347 Fälle bezüglich ihrer Mesothelin-Expression ausgewertet werden (vgl. Tabelle 6). Die größte Trennschärfe in den Überlebenskurven wurde bei Verwendung des maximalen IRS je Fall erreicht, daher wurde dieser Parameter für alle Analysen und Statistiken verwendet.

Tabelle 6: Deskriptive Statistik für MSLN-Expression im Gesamtkollektiv.

Mesothelin	N (%)
Auswertbare Fälle	347
IRS < 8 (MSLN-L)	175 (45%)
IRS ≥ 8 (MSLN-H)	172 (44%)
Mittelwert	6,4
Median	6,0
Std. Abweichung	2,8

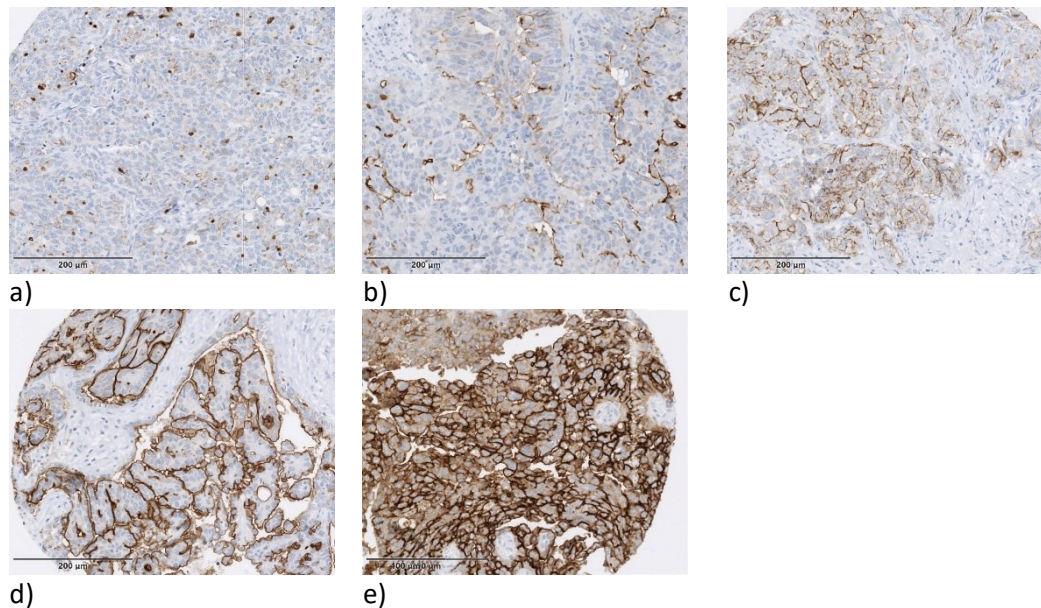


Abbildung 10: Ausgewählte Scans der MSLN-Färbung in 20x Vergrößerung. MSLN zeigt eine membranäre Expression: a) IRS 1; b) IRS 4; c) IRS 6; d) IRS 8; e) IRS 12. Eigene Aufnahmen bearbeitet mit ViewPoint; PreciPoint GmbH Alois-Steinecker-Straße 22 85354 Freising, Bavaria, Germany.

3.2.2 Korrelation der Mesothelin Expression mit klinischen Parametern

Das Alter der Patientinnen, Resektionsstatus sowie die FIGO-Stadien unterschieden sich nicht signifikant über die IRS-Expressionsstufen von MSLN. Auffällig war, dass FIGO I und II keine sehr hohen MSLN-Werte aufwiesen. Es zeigte sich eine Tendenz, dass sowohl iTILs und aTILs (CD4⁺ TIL-Zahlen/HPF) mit steigendem MSLN abnahmen. Die Mittelwerte der iTILs ($p=0,690$; ANOVA) sowie der aTILs ($p=0,480$; ANOVA) unterschieden sich über die Stufen von MSLN nicht signifikant. Das OS ($p=0,420$) sowie das DFS ($p=0,369$) nahm bei steigendem IRS tendenziell ab, wenngleich auch hier keine Signifikanz erreicht wurde (Tabelle 7 zeigt die Daten).

Tabelle 7: Mesothelin Expression und klinische Parameter.

Mesothelin - maximaler IRS						
	Niedrig (IRS 0-4) N (%)	Moderat (IRS 6) N (%)	Hoch (IRS 8-9) N (%)	Sehr hoch (IRS 12) N (%)	Total N (%)	P value, Pearson χ^2
Alter (Jahre)						$\chi^2=0,943$
<60	32 (25,6%)	33 (26,4%)	51 (40,8%)	9 (7,2 %)	125 (36%)	
>60	57 (25,7%)	53 (23,9%)	97 (43,7%)	15 (6,8%)	222 (64%)	
FIGO Stage						$\chi^2=0,376$
I	2 (16,7%)	5 (41,7%)	5 (41,7%)	0 (0%)	12 (3,5%)	
II	11 (44,0%)	6 (24,0%)	8 (32,0%)	0 (0%)	25 (7,3%)	
III	63 (25,2%)	58 (23,2%)	109 (43,6%)	20 (8,05)	250 (72,9%)	
IV	13 (23,2 %)	16 (28,6%)	24 (42,9%)	3 (5,4%)	56 (16,3 %)	
Resektions- status						$\chi^2=0,721$
R0 (0mm)	36 (29,0%)	28 (22,6%)	54 (43,5%)	6 (4,8%)	124 (35,7%)	
R1 (1-10mm)	33 (24,8%)	35 (26,3%)	54 (40,6%)	11 (8,3%)	133 (38,3%)	
R2 (>10mm)	16 (20,5%)	20 (25,6%)	36 (46,2%)	6 (7,7%)	78 (22,5%)	
R unbekannt	4 (33,3 %)	3 (25%)	4 (33,3)	1 (8,3%)	12 (3,5%)	
CD4 iTIL/ HPF MW						ANOVA p=0,690
MW	6,9	6,9	6,0	5,4	6,4	
(SD)	9,5	8,1	6,4	5,5	7,7	
(min - max)	0 - 65,0	0 - 43,3	0 - 36,3	0,1 - 25,1	0 - 65,0	
CD4 sTIL/ HPF MW						ANOVA p=0,480
MW	5,7	6,7	6,6	4,5	6,3	
(SD)	5,9	6,5	8,8	4,4	7,7	
(min-max)	0-31,0	0-29,5	0,1-75,2	0-14,4	0-75,2	
CD4 aTIL /HPF MW						ANOVA p=0,666
MW	12,6	13,6	12,6	9,9	12,7	
(SD)	13,2	13,1	13,1	9,2	13,0	
(min - max)	0 -96	0 – 69,2	0,1- 89,9	0,7- 39,3	0- 96,0	
Medianes OS (Tage)	1112	1235	921	1011	1032	p=0,420
Medianes DFS (Tage)	506	482	464	412	473	P=0.369
Mesothelin Expression Gruppen						
	MSLN-L (IRS <8)		MSLN-H (IRS ≥8)			
Medianes OS (Tage)	1180		927			p=0,113
Medianes DFS (Tage)	499		453			p= 0,288

3.2.3 Mesothelin Expression und Resektionsstatus

Hinsichtlich der MSLN-Expression zeigte sich ein Trend zu negativer Korrelation mit dem Resektionsstatus (Abbildung 11). Je höher Mesothelin exprimiert war, desto häufiger lag eine R2 oder R1 Situation vor, wenngleich diese statistisch nicht signifikant war ($\chi^2=0,017$).

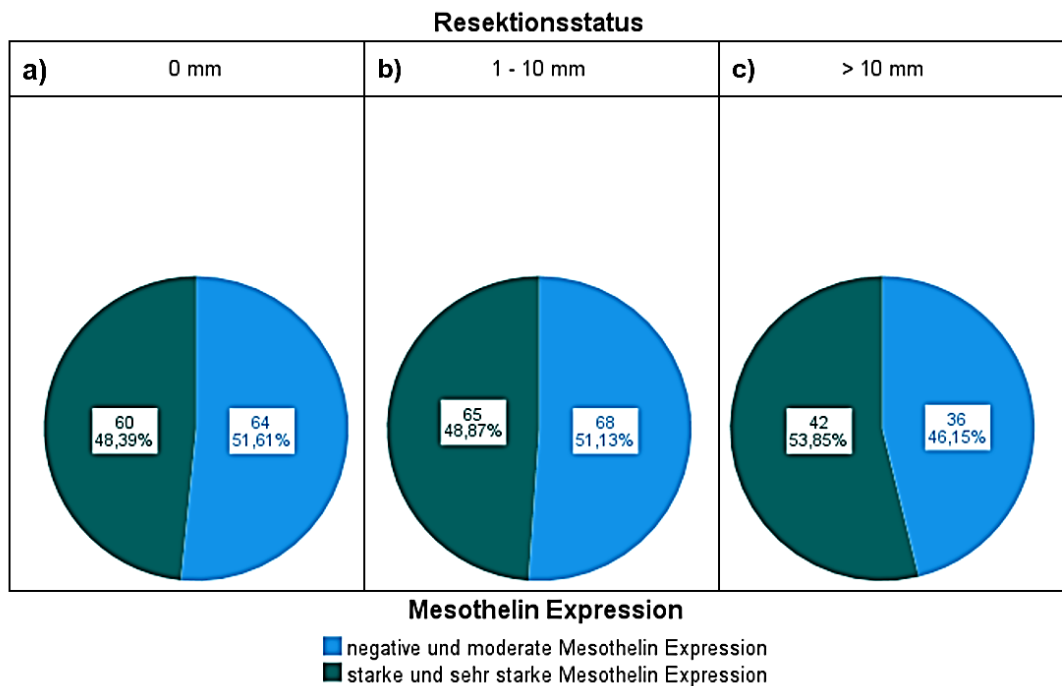


Abbildung 11: Korrelation von Resektionsstatus mit Mesothelin-IRS: Fälle mit Mesothelin -Expression IRS ≥ 8 zeigen eine Tendenz zu vermehrter R2 Resektion gegenüber den Fällen mit Mesothelin-Expression IRS < 8 ($\chi^2=0,721$).

3.2.4 Prognostische Relevanz der Mesothelin Expression

Im untersuchten Kollektiv verwendeten wir für die Überlebenszeitanalysen die maximalen IRS-Werte je Fall, wodurch der größte Unterschied im medianen OS erreicht wurde. Die medianen Überlebenszeiten sind in Tabelle 7 aufgeführt.

3.2.4.1 Mesothelin - Überlebenszeitanalyse

Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebensverteilungen festgestellt. Das kürzeste mediane OS (921 Tage) wurde für die Gruppe mit starker MSLN-Expression (IRS = 8-9; n = 148 Fälle) errechnet. Das längste mediane OS (1235 Tage) wurde für die Fälle mit moderater MSLN-Expression (IRS = 6; n = 86 Fälle) errechnet. Das mediane OS der Fälle mit negativer und

schwacher Expression (IRS = 0-4; n = 89 Fälle) mit 1112 Tagen bzw. das der Fälle mit sehr starker Expression (IRS = 12; n = 24) mit 1011 Tagen unterschieden sich kaum (Abbildung 12).

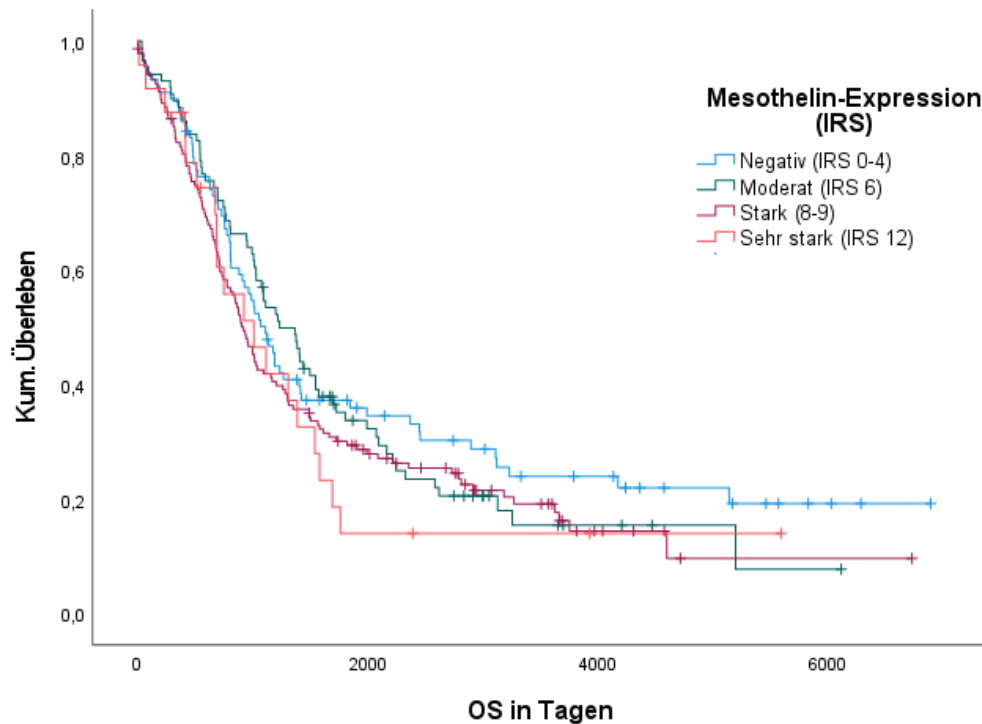


Abbildung 12: Einfluss der MSLN-Expression auf das OS ($p=0,420$; vgl. Tabelle 7).

Beim DFS findet sich eine Tendenz zu früheren Rezidiven mit steigendem MSLN-IRS (DFS im Gesamtkollektiv: 473 Tage), obgleich keine Signifikanz erreicht wurde ($p=0,369$) (Abbildung 13). Für MSLN IRS 0-4 betrug das DFS 506 Tage; das für MSLN IRS 6 betrug 482 Tage; das für IRS 8-9 464 Tage und für IRS >8 412 Tage.

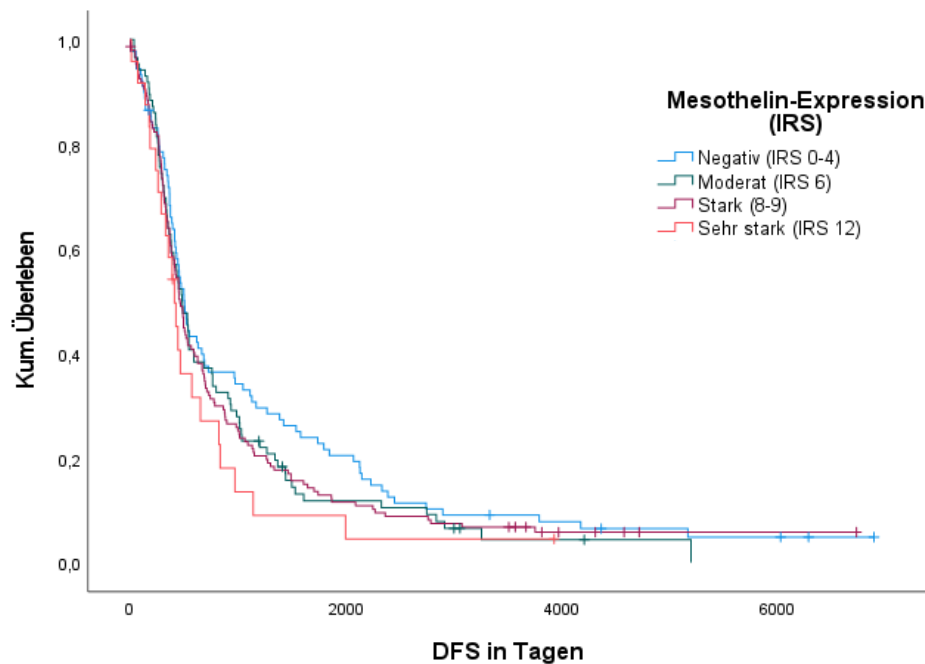


Abbildung 13: Einfluss der MSLN-Expression auf das DFS ($p=0,369$; vgl. Tabelle 7).

3.2.4.2 Mesothelin Gruppenbildung

Der größte Unterschied des medianen OS wurde erreicht bei dem Vergleich einer negativen oder moderaten MSLN-Expression (MSLN-L; $n=175$ Fälle) mit einer starken und sehr starken MSLN-Expression (MSLN-H; $n=172$ Fälle), (vgl. Tabelle 7).

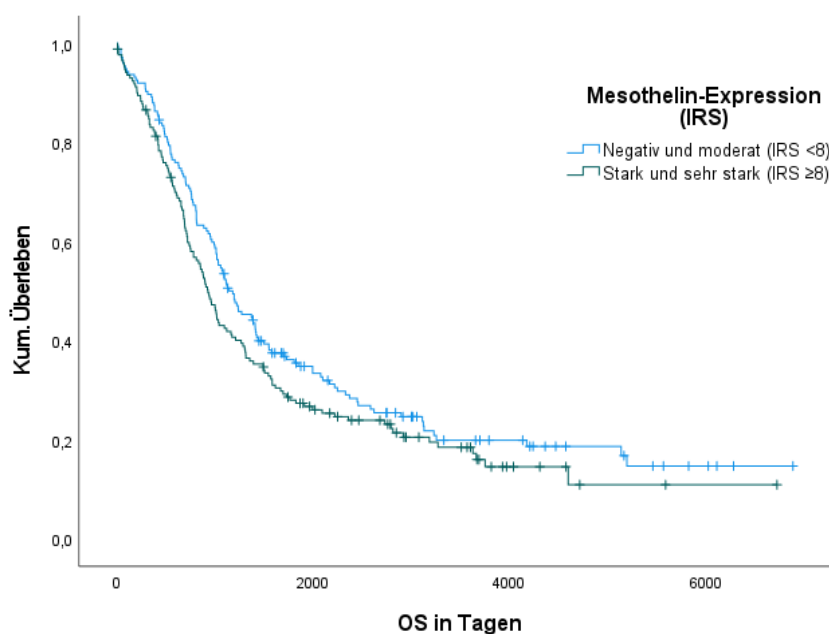


Abbildung 14: Einfluss der MSLN- Expression auf das OS ($p= 0,133$; vgl. Tabelle 7)

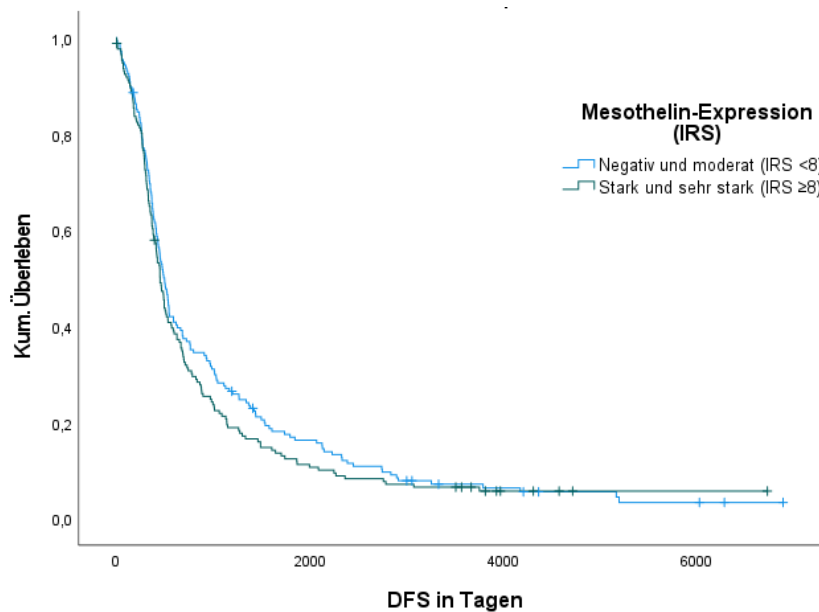


Abbildung 15: Einfluss der MSLN-Expression auf das DFS ($p=0,288$; vgl. Tabelle 7).

Sowohl für OS als auch DFS wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebensverteilungen festgestellt (s. Abbildung 14 + Abbildung 15). Bei Patienten der MSLN-H Gruppe, betrug das OS im Median 927 Tage, bei Patienten der MSLN-L Gruppe im Median 1180 Tage ($p=0,113$). Bei Patienten der MSLN-H Gruppe betrug das DFS im Median 453 Tage, bei Patienten der MSLN-L Gruppe im Median 499 Tage ($p=0,288$).

3.2.5 HLA-DRA Muster der Immunfärbung und Expression

HLA-DRA wird in seiner Funktion als antigenpräsentierendes Protein membranär auf Tumorzellen exprimiert. Makrophagen zeigten vermehrt eine starke Färbung und mussten aus der Bewertung herausgehalten werden (vgl. Abbildung 16).

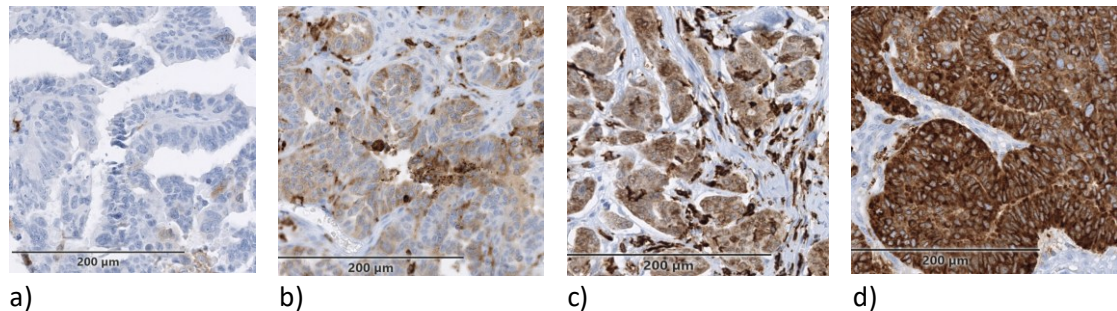


Abbildung 16: Ausgewählte Scans der HLA-DRA Färbung in 20 x Vergrößerung. HLA-DRA zeigt eine membranäre Expression. Makrophagen mussten aus der Bewertung herausgehalten werden. a) INT 0; b) INT 1; c) INT 2; d) INT 3
Eigene Aufnahmen, bearbeitet mit ViewPoint; PreciPoint GmbH Alois-Steinecker-Straße 22 85354 Freising, Bavaria Germany

Für den Marker HLA-DRA wurde je Fall Minimum, Maximum, Median sowie Mittelwert des IRS erhoben. Zudem wurde die Intensität der Expression separat dokumentiert. Für 349 Fälle lagen Daten zu HLA-DRA vor. Technisch bedingt fielen 38 Fälle aus der Datenanalyse heraus. Abbildung 16 zeigt exemplarische Proben der unterschiedlichen Intensitätsstufen aus unserem Kollektiv. Die größte Trennschärfe in den Überlebenskurven wurde bei Verwendung der maximalen Intensität je Fall erreicht, daher entschieden wir uns dafür, diesen Parameter für alle Analysen zu verwenden. Für die maximale Intensität je Fall ergab sich ein Mittelwert von 2,07 (SD = 1,0), ein Maximalwert von 3,0 und ein Minimalwert von 0 (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 8: Deskriptive Statistik für HLA-DRA (HLA-DRA-L = low, HLA-DRA-H = high).

HLA-DRA	N (%)
Auswertbare Fälle	349
Intensität < 2 (HLA-DRA-L)	80 (21%)
Intensität ≥ 2 (HLA-DRA-H)	269 (69%)
Mittelwert	2,07
Median	2,0
Std. Abweichung	1,0

3.2.6 Korrelation der HLA-DRA Expression mit klinischen Parametern

Das Alter der Patientinnen sowie die FIGO-Stadien unterschieden sich nicht signifikant bezogen auf die HLA-DRA Expression. Der Resektionsstatus unterschied sich je nach HLA-DRA Expression ($\chi^2 = 0,011$ zweiseitig; s. Tabelle 9). Höhere Intensitäten von HLA-DRA waren quantitativ häufiger vorzufinden. Mit steigender Intensität von HLA-DRA waren höhere CD3⁺/ CD8⁻ TIL Vorkommen assoziiert, bezogen auf iTILs sowie aTILs ($p < 0,001$; ANOVA). In Bezug auf das mediane OS und DFS waren korrelierend zur HLA-DRA Intensität statistisch signifikante längere Überlebenszeiten zu beobachten. OS sowie DFS ($p = 0,012$ bzw. $p = 0,043$ (Log-Rank-Test)) werden im entsprechenden Kapitel behandelt.

Tabelle 9: HLA-DRA Expression und klinische Parameter.

HLA-DR alpha chain - maximale Intensität						
	INT 0 N (%)	INT 1 N (%)	INT 2 N (%)	INT 3 N (%)	Total N (%)	P value, Pearson χ^2
Alter (Jahre)						$\chi^2=0,355$
<60	8(22,9%)	18(40,0%)	47(36,7%)	54(38,3%)	127(36,4%)	
>60	27(77,1%)	27(60,0%)	81(63,3%)	87(61,7%)	222(63,6%)	
FIGO Stage						$\chi^2=0,297$
I	0 (0%)	0 (0 %)	7 (5,6%)	5 (3,6%)	12 (3,5%)	
II	3 (8,6%)	1 (2,3 %)	11 (8,7%)	11 (7,9%)	26 (7,5%)	
III	27 (77,1%)	39 (88,6%)	84 (66,7%)	103 (73,6%)	253 (73,3%)	
IV	5 (14,3%)	4 (9,1%)	24 (19,0%)	21 (15,0%)	54 (15,7%)	
Resektionsstatus						$\chi^2=0,011^*$
R0 (0mm)	11 (33,3%)	10 (22,7%)	46 (37,4%)	60 (43,8%)	127 (37,7%)	
R1 (1-10mm)	12 (36,4%)	15 (34,1%)	49 (39,8%)	56 (40,9%)	132 (39,2%)	
R2 (>10mm)	10 (30,3%)	19 (43,2%)	21 (22,8%)	28 (15,3%)	78 (23,1%)	
R unbekannt	2 (5,7%)	1 (2,2%)	5 (3,9%)	4 (2,8%)	12 (3,4%)	
CD3+/CD8- Epithelial MW / HPF						ANOVA $p<0,001^*$
MW	2,8	3,9	5,0	9,3	6,4	
SD)	4,4	5,1	5,8	9,3	7,6	
min - max)	0,0-22,3	0,0-29,8	0,0-43,3	0,0-65,0	0,0-65,0	
CD3+/CD8- Gesamt MW/ HPF						ANOVA $P<,0001^*$
MW	7,3	7,8	10,9	17,3	12,7	
(SD)	8,1	7,1	10,0	16,3	13,0	
(min-max)	0,1-30,0	0,1-36,3	0,0-69,2	0,0-96,0	0,0-96,0	
CD3+/CD8- Stromal MW/ HPF						ANOVA $p<0,001^*$
MW	4,5	3,9	5,9	8,0	6,3	
SD	6,6	4,0	6,1	9,7	7,7	
(min - max)	0,0-30,1	0,0-15,3	0,0-48,3	0,0-75,2	0,0-75,2	
Medianes OS (Tage)	778	921	1078	1171	1032	Log Rank $p=0,012$
Medianes DFS (Tage)	425	382	500	496	473	Log-Rank $p=0,043$
HLA-DRA Expression Gruppen						
	HLA-DRA-L (INT 0-1)		HLA-DRA-H (INT 2-3)			
Medianes OS (Tage)	809		1127		1032	$p=0,001$
Medianes DFS (Tage)	394		496		473	$p=0,004$

3.2.7 HLA-DRA Expression und Resektionsstatus

Um zu testen, ob die HLA-DRA Expression einen Einfluss auf die Operabilität der Tumoren hat, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt ($\chi^2 = 0,011$). Es zeigte sich, dass der Anteil von HLA-DRA-H Tumoren bei den Fällen mit R0-Resektion (83,5%) höher war als bei Fällen, bei denen ein mikroskopischer Rest (R1) verblieb (79,5%) bzw. nur eine R2 Resektion erreicht wurde (62,8%) (s. Abbildung 17).

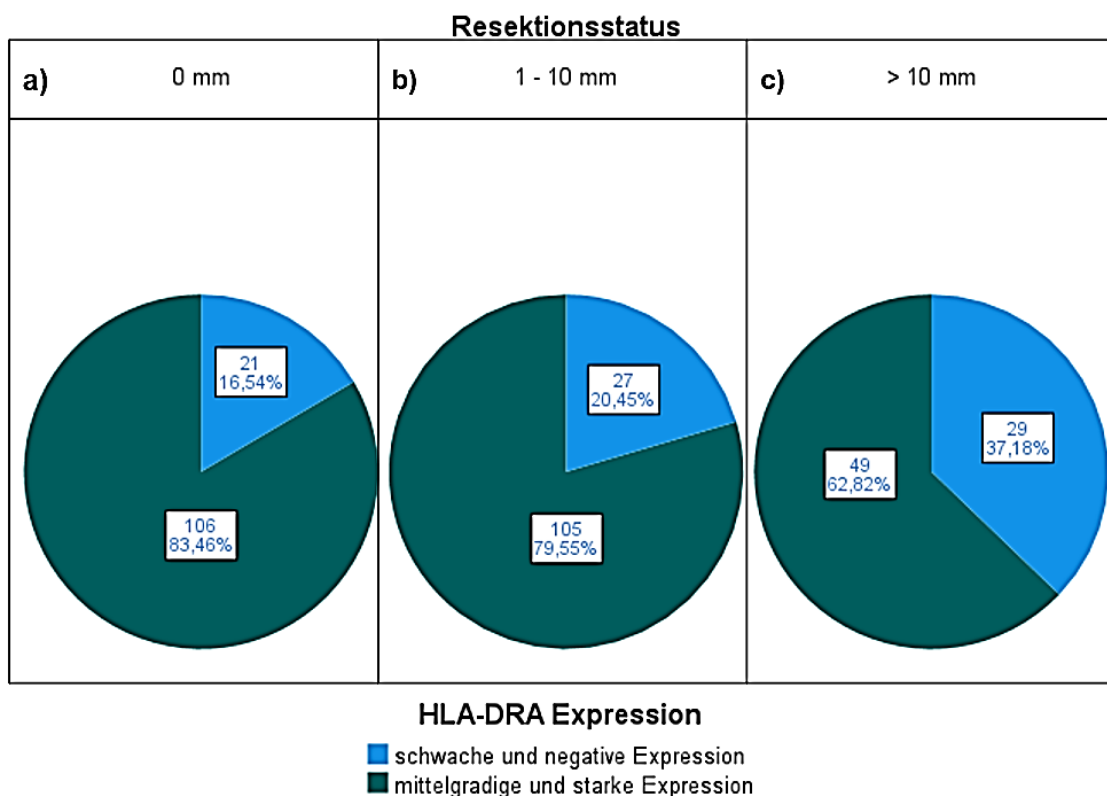


Abbildung 17: Korrelation von Resektionsstatus mit Intensität der HLA-DR Expression: Fälle mit HLA-DR Expression IRS >2 zeigen vermehrt einen R1 bzw. R0 Status ($\chi^2=0.011$) verglichen mit den Fällen mit HLA-DRA Expression IRS ≥ 2 .

3.2.8 Prognostische Relevanz der HLA-DRA Expression

Im untersuchten Kollektiv wurden die Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit von der maximalen Intensität je Fall durchgeführt, wodurch der größte Unterschied im medianen Überleben erreicht wurde.

3.2.8.1 HLA-DRA - Überlebenszeitanalyse

Der HLA-DRA IRS war für das OS ebenfalls signifikant ($p=0,001$), allerdings schnitten sich die Kurven von moderater und starker Expression nach ca. 3000

Tagen. Beim IRS ist zu beachten, dass hier die Expression und die Intensität vermischt werden: Ein moderater IRS beispielsweise mit einer INT 3 und einer Expression 2 kann aber auch mit einer INT 2 und Expression 3 erreicht werden. Nach 3000 Tagen nähern sich die beiden Kurven von starker Intensität und mittlerer Intensität an (Abbildung 18 a), schneiden sich jedoch nicht. Es ist davon auszugehen, dass für diesen Bereich der Unschärfefeffer des IRS verantwortlich ist. Für die weiteren Analysen wurde daher mit der Intensität allein weitergerechnet, um so die klonale Tumorbilogie abzubilden.

Für OS als auch DFS wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebensverteilungen festgestellt ($p = 0,012$). Die Abbildungen 18 a) bzw. 19 zeigen das OS bzw. DFS für das Kollektiv aufgeteilt nach der HLA-DRA Expression.

Das kürzeste mediane OS (778 Tage) wurde für die Gruppe mit negativer HLA-DRA-Expression ($n = 35$, 10%) errechnet. Das längste mediane OS mit 1171 Tagen wurde für die Fälle mit starker HLA-DRA Expression ($n = 141$, 40%) errechnet. Das entspricht einer Differenz von 393 Tagen (12,9 Monaten). Das mediane OS der Fälle mit schwacher Expression ($n = 45$ Fälle, 13%) betrug 921 Tage, das der Fälle mit moderater Expression ($n = 128$ Fälle, 37%) 1078 Tage.

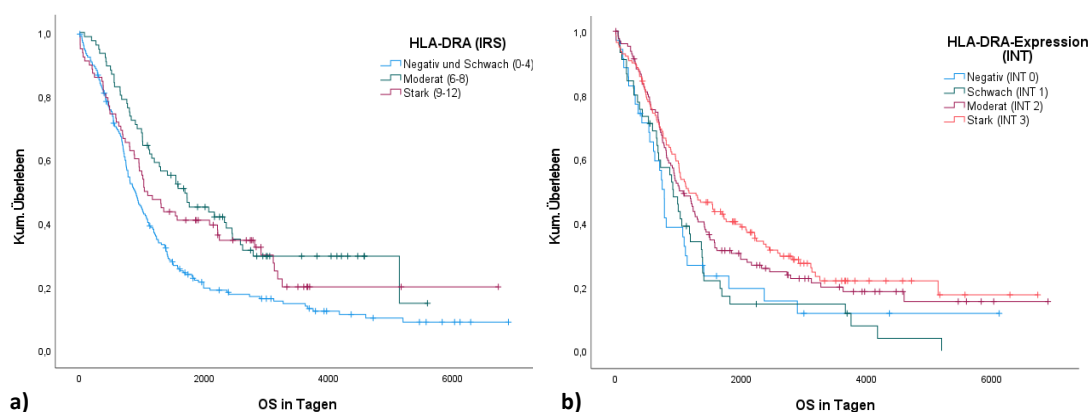


Abbildung 18: Einfluss der HLA-DRA Expression auf das OS. a) OS und HLA-DRA IRS ($p=0,001$) b) OS und HLA-DRA INT ($p=0,012$; vgl. Tabelle 9)

Für das DFS wurde ein zwar geringerer aber noch signifikanter Unterschied zwischen den Überlebensverteilungen festgestellt ($p = 0,043$), wobei sich hier grafisch die Kurven schneiden (vgl. Abbildung 19). Das höchste mediane DFS mit 500 Tagen wurde für Fälle mit moderater HLA-DRA Expression festgestellt

(n = 128, 37%), das kürzeste mediane DFS mit 382 Tagen für Fälle mit schwacher HLA-DRA-Expression (n = 45, 13%). Das entspricht einer Differenz von 118 Tagen (3,8 Monaten). Die Fälle mit starker Expression (496 Tage, n = 141, 40%) sowie negativer Expression (425 Tage, n = 35, 10%) lagen dazwischen.

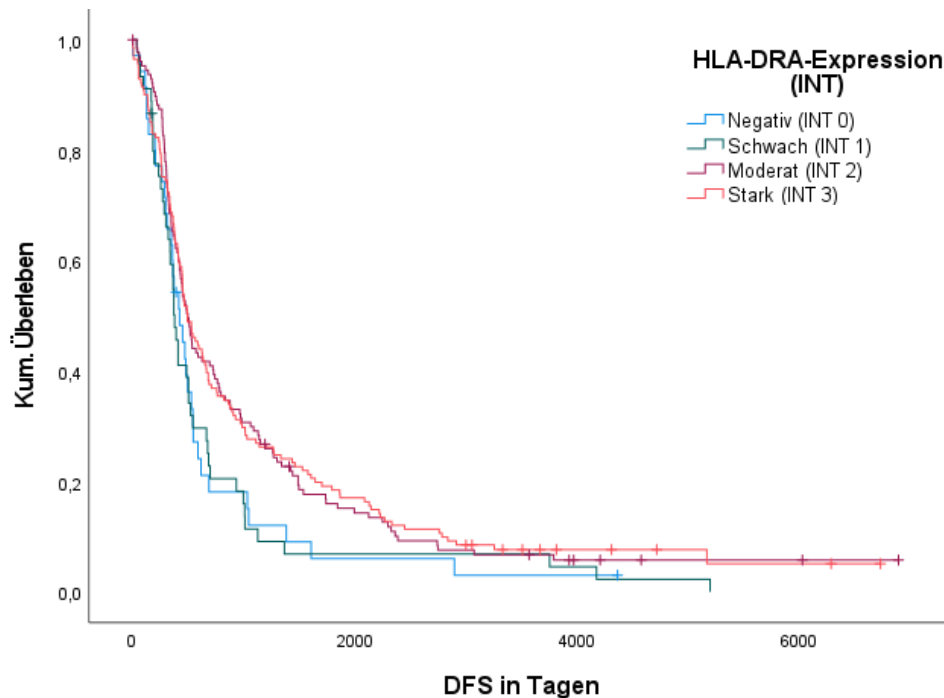


Abbildung 19: Einfluss der HLA-DRA Expression auf das DFS ($p=0,043$; vgl. Tabelle 9).

3.2.8.2 HLA-DRA Gruppenbildung

Als Cut-Off Wert wurde für HLA-DRA eine maximale Intensität von 2 festgelegt. Dieser Cut-Off wurde für die kombinierten Analysen verwendet. Bei Patientinnen mit mittelgradiger und hoher Intensität von HLA-DRA (HLA-DRA-H) betrug das OS im Median 1127 Tage (n = 269, 77%) und das DFS im Median 496 Tage. Bei Patientinnen mit negativer und niedriger Intensität von HLA-DRA (HLA-DRA-L) betrug das OS im Median 809 Tage (n = 80, 23%) und das DFS im Median 394 Tage. Sowohl OS (Mediane Differenz 318 Tage, $p=0,001$) als auch DFS (Mediane Differenz 102 Tage, $p=0,004$) unterschieden sich statistisch signifikant (s. Abbildung 20 + Abbildung 21).

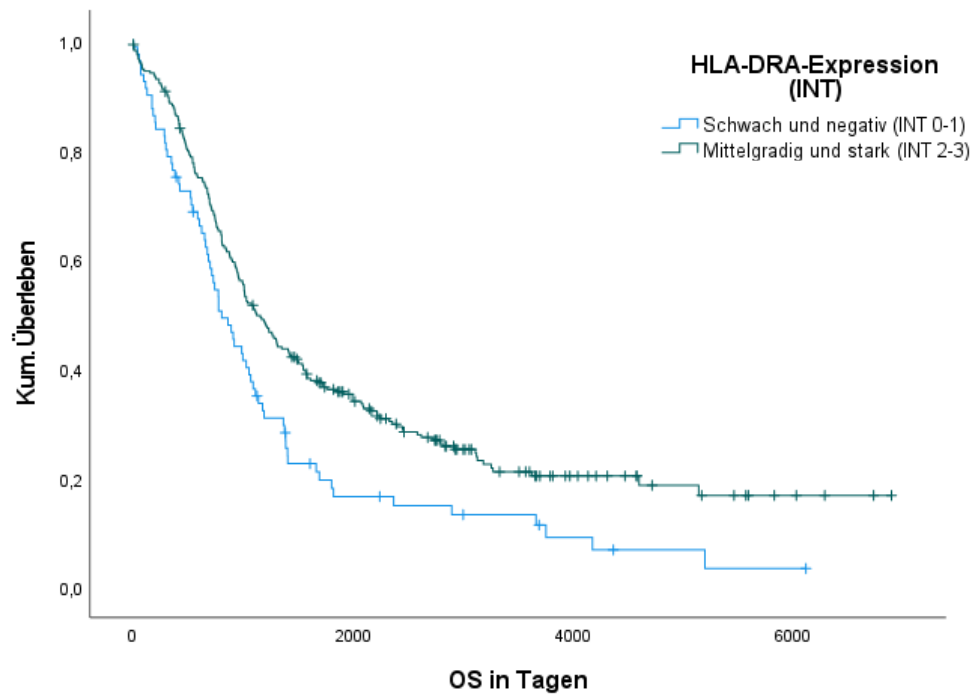


Abbildung 20: Einfluss der HLA-DRA Expression auf das OS. ($p=0,001$; vgl. Tabelle 9)

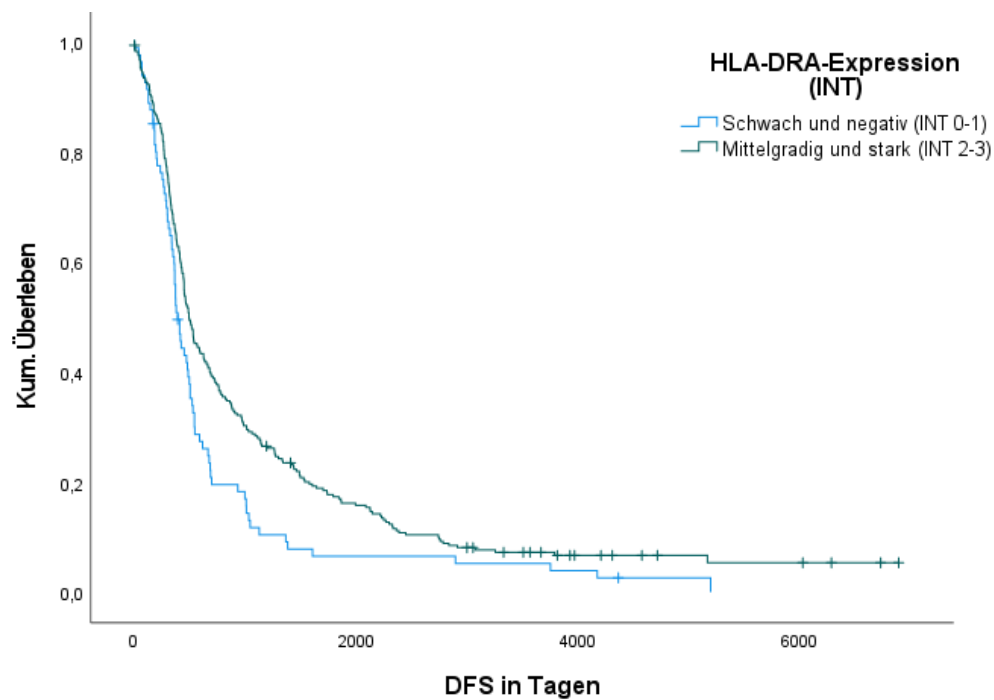


Abbildung 21: Einfluss der HLA-DRA Expression auf das DFS ($p=0,004$; vgl. Tabelle 9)

3.2.9 TILs im Tumorstroma sowie Tumorepithel - Doppelfärbung CD8/CD3

Die CD3/ CD8 Doppelfärbung wurde etabliert um CD4⁺ Th-Zellen zu identifizieren. Die CD3⁺ /CD8⁻ Zellen wurden separat in Tumorstroma (sTIL) und Tumorepithel (iTIL) ausgezählt. Abbildung 22 zeigt beispielhaft eigene Färbungen.

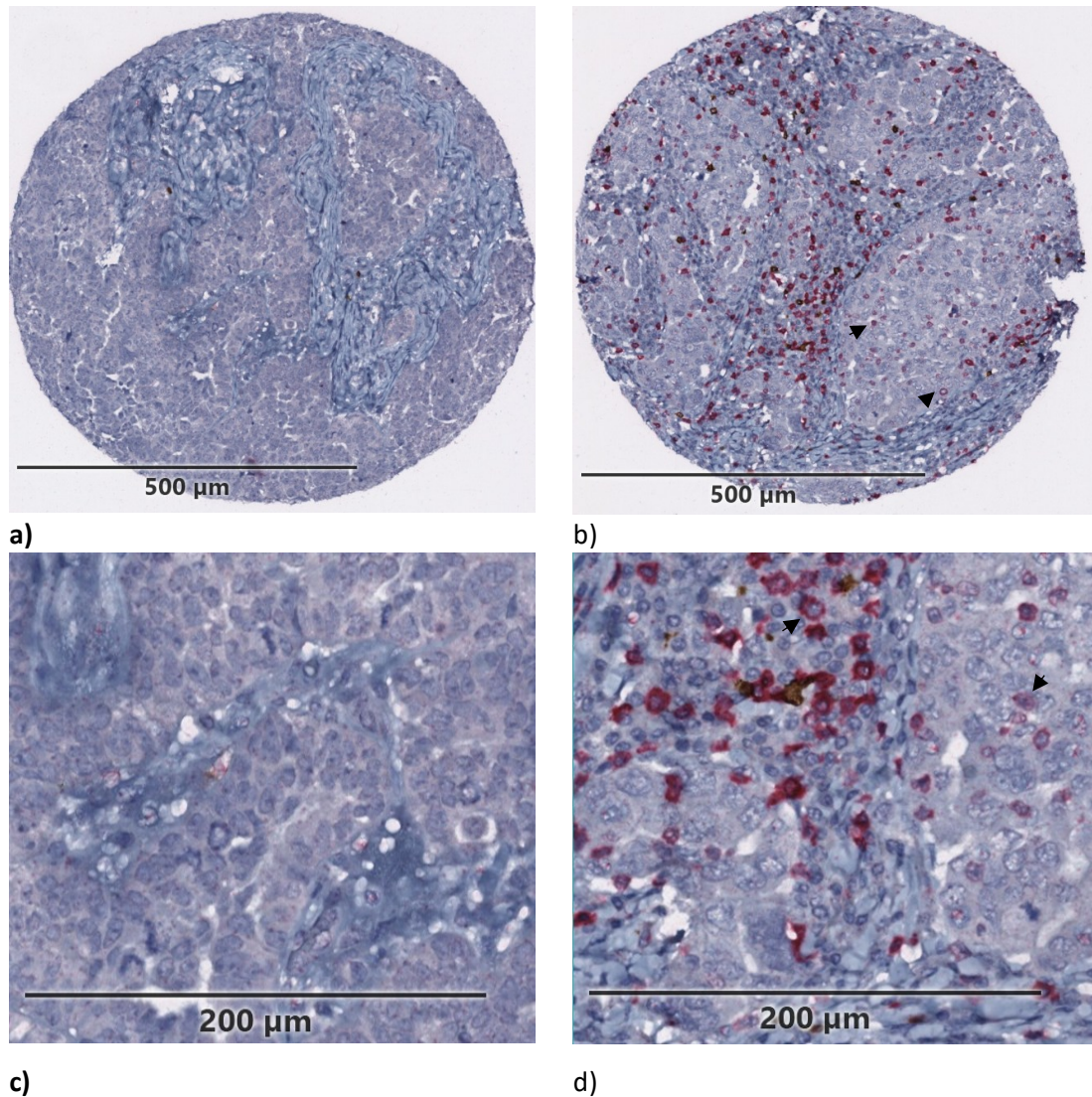


Abbildung 22: Ausgewählte Scans der Doppelfärbung mit anti-CD8 (braun) und anti-CD3 (rot) in 4x bzw. 20x Vergrößerung. a) und c) demonstrieren einen Fall ohne nennenswerte stromale oder epitheliale TILs, b) und d) demonstrieren einen Fall mit hoher CD3⁺/CD8⁻ iTIL-Zahl und hoher sTIL-Zahl (Pfeile). Eigene Aufnahmen, bearbeitet mit ViewPoint; PreciPoint GmbH Alois-Steinecker-Straße 22 85354 Freising, Bavaria, Germany.

Es wurde zudem ein Gesamtwert aller CD3⁺ /CD8⁻ TILs (aTILs) je Core als Summe von CD3⁺ /CD8⁻ iTILs und CD3⁺ /CD8⁻ sTILs errechnet. Die CD3⁺ /CD8⁻ Lymphozyten wurden pro High Power Field (HPF) gezählt; das entspricht der Lymphozytenzahl im Hauptgesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung. Es wurden

jeweils Minimum, Maximum, Mittelwert je Fall für sTILs, iTILs sowie aTILs errechnet. Für die statistischen Analysen wurde der errechnete Mittelwert pro Fall verwendet: MW iTILs: 6,4/HPF; MW sTILs: 6,3/HPF, MW aTILs: 12,7/HPF. Für die Überlebensanalysen wurden Tertile gebildet: obere Tertile iTILs (MW 14 /HPF); mittlere Tertile iTILs (MW 4 /HPF); untere Tertile iTILs (MW 1 /HPF). Tabelle 10 gibt die deskriptive Statistik wieder.

Tabelle 10: Deskriptive Statistik für CD3+/CD8- TILs/ HPF und Bildung Tertile

	untere Tertile	mittlere Tertile	obere Tertile	Total
aTIL MW				
MW/ HPF	2,99	9,19	25,44	12,70
(min - max)	0,0-5,9	6,1-13,1	13,5-96	0,0-96,0
sTIL MW				
MW/ HPF	1,12	3,92	13,36	6,33
(min - max)	0-2,3	2,4-5,7	5,9-75,2	0,0-75,2
iTIL MW				
MW/ HPF	1,08	4,00	14,33	6,37
(min - max)	0,0-2,3	2,4-6,3	6,4-65	0,0-65,0

3.2.10 Lymphozyten und Zusammenhang mit klinischen Parametern

Die klinischen Parameter des Patientinnenkollektivs in Zusammenhang mit den iTILs, sTILs und aTILs werden in den Tabellen 11-13 dargestellt. Die TIL-Zahlen unterschieden sich im Hinblick auf das Alter der Patientinnen nicht wesentlich. Hinsichtlich der FIGO-Stadien ist zu vermerken, dass hohe FIGO-Stadien tendenziell weniger mit erhöhten iTIL und sTIL-Zahlen assoziiert waren, bzw. umgekehrt niedrige FIGO Stadien I und II vermehrt gesteigerte Lymphozytenvorkommen aufwiesen. Die aTILs waren für die Verteilung der FIGO-Stadien nicht relevant. Die Mehrzahl der R0 resezierten Fälle wies iTILs im obersten Tertil auf. Für sTILs und aTILs war diese Tendenz deutlich schwächer. Das OS und DFS war über die Tertile der TILs ungleich verteilt: Für alle zeigte sich, dass sich das mediane Überleben mit steigender TIL-Zahl verbesserte. Die höchste Signifikanz wurde bei den iTILs erreicht.

Tabelle 11: Zusammenhang von iTILs mit klinischen Parametern.

CD3+/CD8- TILs/ HPF - iTILs Tertile					
	Untere Tertile N (%)	Mittlere Tertile N (%)	Obere Tertile N (%)	Total N (%)	P value, Pearson χ^2
Alter (Jahre)					$\chi^2=0,101$
<60	35 (27,6%)	41 (32,3%)	51 (40,2%)	127 (36,5%)	
>60	81 (27,6%)	74 (32,3%)	66 (40,2%)	221 (63,5%)	
FIGO Stage					$\chi^2=0,003^*$
I	2 (16,7%)	2 (16,7%)	8 (66,7%)	12 (3,5%)	
II	4 (16,0%)	7 (28,0%)	14 (56,0%)	25 (7,3%)	
III	89 (35,5%)	79 (31,5%)	83 (33,1%)	251 (73%)	
IV	18 (32,1%)	27 (48,2%)	11 (19,6%)	56 (16,3%)	
Resektions- status					$\chi^2=0,005^*$
R0 (0mm)	32 (25,4%)	36 (28,6%)	58 (46,0%)	126 (36,2%)	
R1 (1-10mm)	52 (39,1%)	48 (36,1%)	33 (24,8%)	133 (38,2%)	
R2 (>10mm)	29 (37,7%)	26 (33,8%)	22 (28,6%)	77 (22,1%)	
R unbekannt	3 (25,0%)	5 (41,7%)	4 (33,3%)	12 (3,5%)	
Medianes OS (Tage)	809	1018	1727	1018	$p < 0,001$
Medianes DFS (Tage)	378	491	653	469	$P < 0,001$

Tabelle 12: Zusammenhang von aTILs mit klinischen Parametern.

CD3+/CD8- TILs/ HPF - aTILs Tertile					
	Untere Tertile N (%)	Mittlere Tertile N (%)	Obere Tertile N (%)	Total N (%)	P value, Pearson χ^2
Alter (Jahre)					$\chi^2=0,513$
<60	49 (38,6%)	38 (29,9%)	40 (31,5%)	127 (36,5%)	
>60	72 (32,6%)	75 (33,9%)	74 (33,5%)	221 (63,5%)	
FIGO Stage					$\chi^2=0,312$
I	2 (16,7%)	6 (50,0%)	4 (33,3%)	12 (3,5%)	
II	7 (28,0%)	7 (28,0%)	11 (44,0%)	25 (7,3%)	
III	90 (35,9%)	76 (30,3%)	85 (33,9%)	251 (73,0%)	
IV	20 (35,7%)	23 (41,1%)	13 (23,2%)	56 (16,3%)	
Resektions- status					$\chi^2=0,201$
R0 (0mm)	36 (28,6%)	47 (37,3%)	43 (34,1%)	126 (36,2%)	
R1 (1-10mm)	49 (36,8%)	39 (29,3%)	45 (33,8%)	133 (38,2%)	
R2 (>10mm)	32 (41,6%)	27 (35,1%)	18 (23,4%)	77 (22,1%)	
R unbekannt	4 (33,3%)	0 (0,0%)	8 (66,7%)	12 (3,4%)	
Medianes OS (Tage)	921	1018	1209	1018	$p=0,011$
Medianes DFS (Tage)	451	466	520	469	$p=0,058$

Tabelle 13: Zusammenhang von sTILs mit klinischen Parametern.

CD3+/CD8- TILs/ HPF - sTILs Tertile					
	Untere Tertile N (%)	Mittlere Tertile N (%)	Obere Tertile N (%)	Total N (%)	P value, Pearson χ^2
Alter (Jahre)					$\chi^2=0,853$
<60	36 (28,3%)	50 (39,4%)	41 (32,3%)	127 (36,5%)	
>60	69 (31,2%)	83 (37,6%)	69 (31,2%)	221 (63,5%)	
FIGO Stage					$\chi^2=0,072$
I	5 (41,4%)	3 (25,0%)	4 (33,3%)	12 (3,5%)	
II	7 (28,0%)	4 (16,0%)	14 (56,0%)	25 (7,3%)	
III	76 (30,3%)	98 (39,0%)	77 (30,7%)	251 (73,0%)	
IV	15 (26,8%)	27 (48,2%)	14 (25,0%)	56 (16,3%)	
Resektions- status					$\chi^2=0,980$
R0 (0mm)	40 (31,7%)	47 (37,3%)	39 (31,0%)	126 (36,2%)	
R1 (1-10mm)	39 (29,3%)	54 (40,6%)	40 (30,1%)	133 (38,2%)	
R2 (>10mm)	23 (29,9%)	29 (37,7%)	25 (32,5%)	77 (22,1%)	
R unbekannt	3 (25%)	3 (25%)	6 (50%)	12 (3,4%)	
Medianes OS (Tage)	930	1011	1209	1018	p=0,008
Medianes DFS (Tage)	453	451	506	469	p=0,351

3.2.11 TILs und Resektionsstatus

Um zu testen, ob eine hohe Lymphozytenzahl einen Einfluss auf die Operabilität der Tumoren hat, wurde ein t-Test durchgeführt. Korrelat für die Operabilität war, ob operativ eine R0 Resektion erreicht wurde. Die Gruppe der Fälle, in denen eine R0 Resektion erfolgt war, wurde mit der Gruppe, in der ein mikroskopischer oder makroskopischer Rest (R1-Resektion + R2-Resektion) verblieb, verglichen. Es zeigte sich, dass die R1 und R2 resezierten Fälle signifikant weniger iTILs ($p<0,001$) und aTILs ($p=0,001$) aufwiesen gegenüber der R0 resezierten Fälle. Die Mittelwerte der sTILs unterschieden sich zwischen den zwei Gruppen wenig ($p=0,058$), obgleich auch hier die Tendenz zu mehr sTILs bei R0 resezierten Fällen sichtbar war. Abbildung 23 veranschaulicht den Mittelwertvergleich (Tabelle 14) im Fehlerbalkendiagramm.

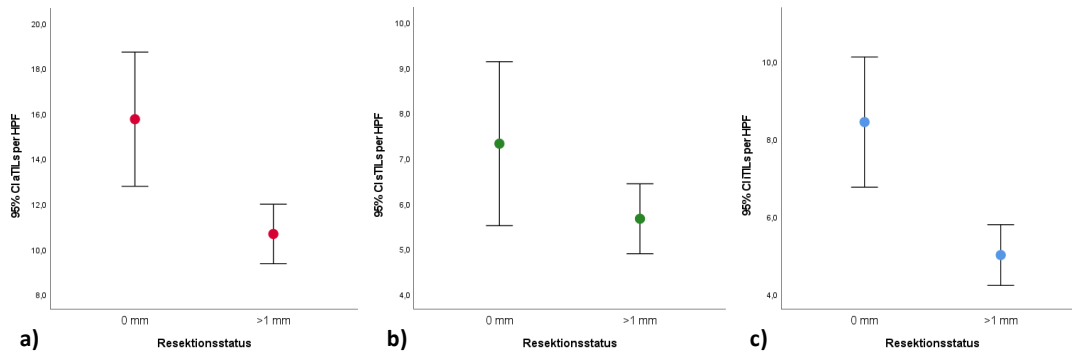


Abbildung 23: Zusammenhang zwischen TIL-Zahl und dem Resektionsstatus; Mittelwertvergleich und Fehlerbalkendiagramm. Es zeigt sich, dass die Fälle, bei denen ein Rest >1 mm verblieb (R1 und R2), signifikant weniger iTILs (blau, $p<0,001$) und aTILs (rot, $p=0,001$) aufweisen gegenüber der R0 resezierten Fälle. Die sTILs sind für den Resektionsstatus weniger relevant (grün, $p=0,058$).

Tabelle 14: Zusammenhang zwischen TIL-Zahl und dem Resektionsstatus

	Resektionsstatus		T - test
	0 mm	>1 mm	
iTILs per HPF	8,4 (9,5)	5,0 (5,7)	$p<0,001$
MW (SD)			
sTILs per HPF	7,3 (10,3)	5,7 (5,6)	$p=0,058$
MW (SD)			
aTILs per HPF	15,7 (16,8)	10,7 (9,7)	$p=0,001$
MW (SD)			

3.2.12 Prognostische Relevanz der TIL-Subgruppen im HGSC - TILs

Überlebenszeitanalyse

Die Patientinnen mit hohen Lymphozytenzahlen im Tumorepithel (oberste Tertile) wiesen ein deutlich verbessertes medianes OS (1727 Tage) auf verglichen mit Patientinnen mit niedrigen iTILs (809 Tage, $p<0,001$) (Abbildung 24). Das mediane OS der Patientinnen mit Lymphozytenzahlen im mittleren Tertilenbereich entsprach in etwa dem medianen Gesamtüberleben im Kollektiv (1018 Tage).

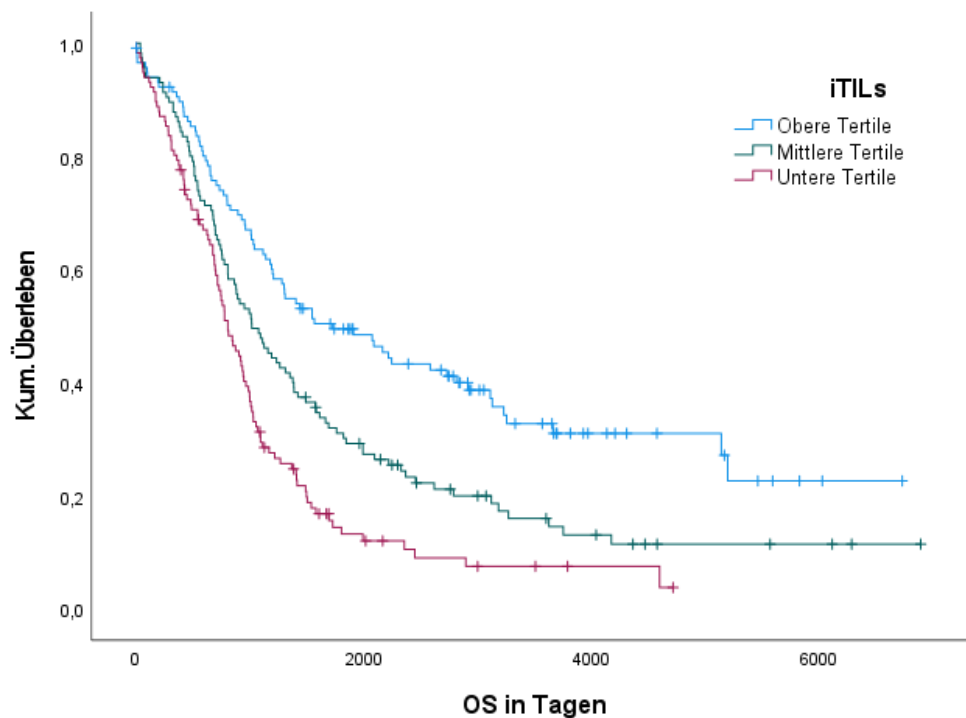


Abbildung 24: Einfluss der iTILs auf das OS ($p < 0,001$ vgl. Tabelle 11).

Bemerkenswert war, dass das mediane Gesamtüberleben der oberen Tertile von iTILs um knapp 22,8 Monate bzw. 1,9 Jahre länger ist als das Überleben im Gesamtkollektiv. Dieser Effekt war für die aTILs und die sTILs nicht zu beobachten. Der Effekt der sTILs (Abbildung 25b) auf das mediane OS war weniger signifikant ($p = 0,008$), wobei das mediane OS der Fälle im oberen Tertilenbereich (1209 Tage) auch hier länger war als das der Fälle im mittleren (1011 Tage) bzw. unteren Tertilenbereich (930 Tage). Das OS wird ebenfalls signifikant von der Lymphozytenzahl im gesamten Tumorgewebe (aTILs, Abbildung 25a) beeinflusst, jedoch insgesamt schwächer ($p = 0,011$). So ergibt sich für das obere Tertil ein Median von 1209 Tagen und für das mittlere (1018 Tage) bzw. untere Tertil ein Median von 921 Tagen. Für die kombinierten Analysen wurden die Tertile der intraepithelialen CD3⁺ /CD8⁻ Lymphozyten (iTILs) verwendet.

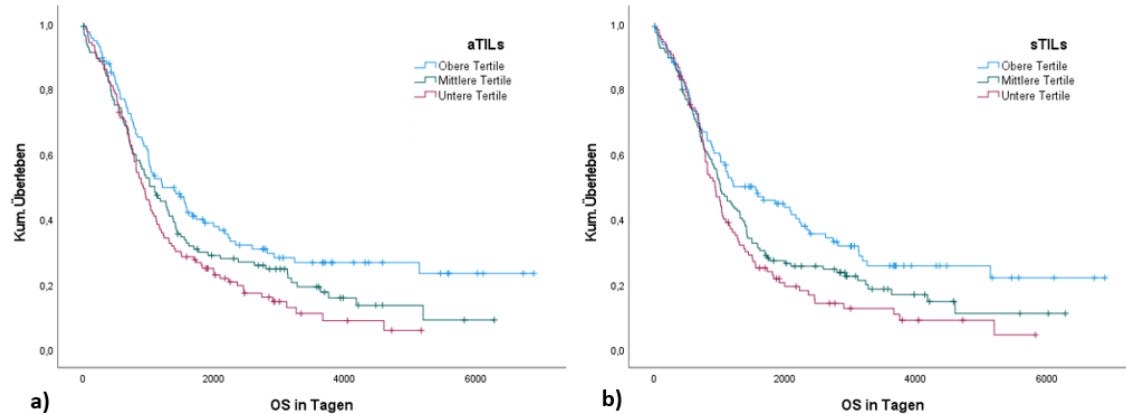


Abbildung 25: Einfluss von sTILs ($p=0,008$) (b) und aTILs ($p=0,011$) (a) auf das OS (vgl. Tabelle 12 und 13).

Beim DFS ist das mediane Gesamtüberleben der Patientinnen mit iTILs im oberen Tertilenbereich mit 653 Tagen etwa um 6 Monate verlängert gegenüber dem medianen OS des Kollektivs (Abbildung 26).

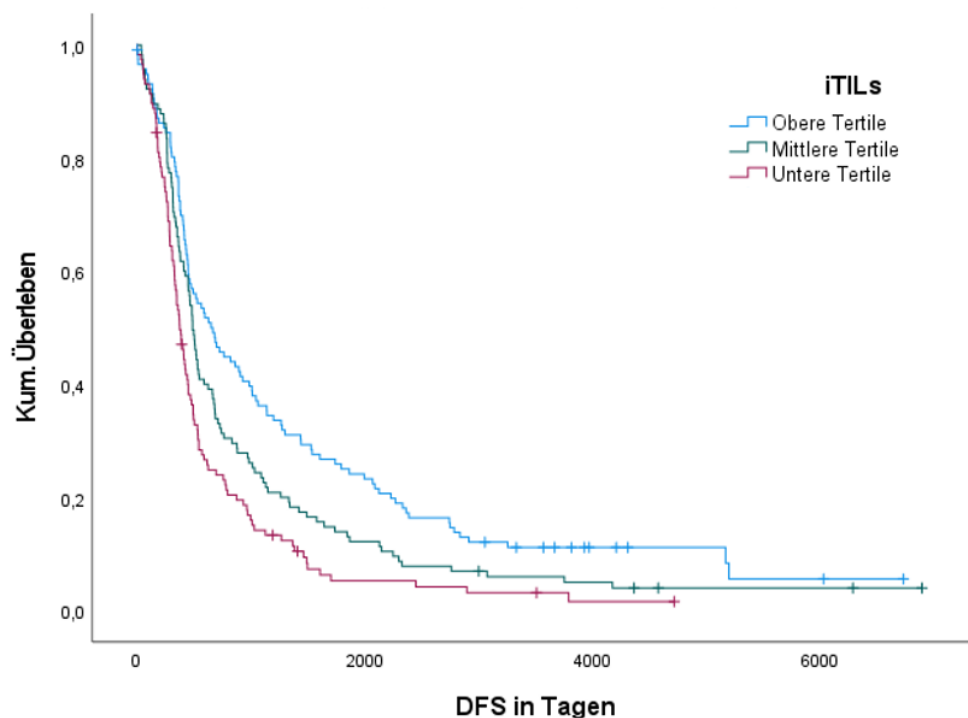


Abbildung 26: Einfluss der iTILs auf das DFS ($p<0,001$; vgl. Tabelle 11).

Abbildung 27 zeigt das DFS für sTILs und aTILs.

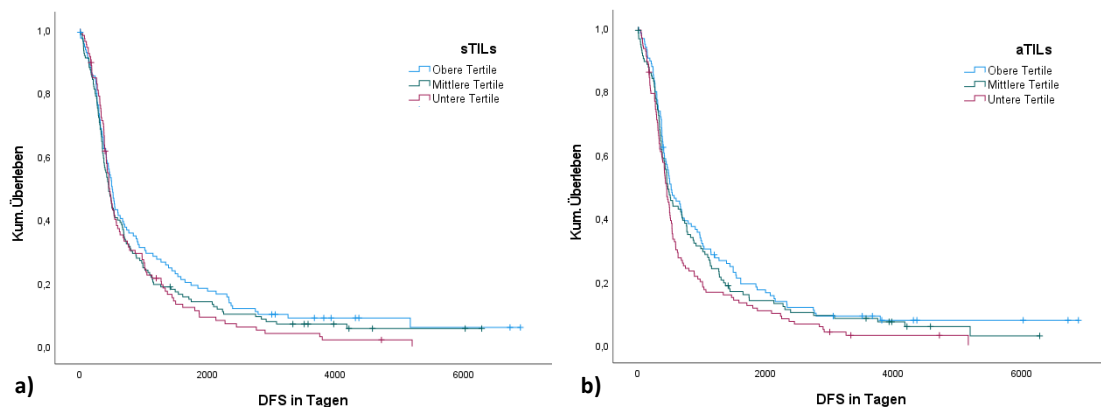


Abbildung 27: Einfluss von a) sTILs ($p=0,351$) bzw. b) aTILs ($p=0,058$) auf das DFS (vgl. Tabelle 12 und 13).

3.3 Korrelation von Mesothelin, HLA-DRA-Status und TIL-Vorkommen

3.3.1 Zusammenhang zwischen HLA-DRA Expression und $CD3^+ / CD8^-$ TILs

Zwischen der HLA-DRA-Expression und der epithelialen Lymphozytenzahl besteht grafisch ein annähernd linearer Zusammenhang. Tabelle 15 zeigt die Mittelwerte der Lymphozytenzahlen sowie Signifikanzniveau von ANOVA und t-Test. Für iTILs sowie aTILs wird sowohl in ANOVA als auch t-Test eine Signifikanz $<0,001$ erreicht. Die sTILs-Zahl nimmt ebenfalls mit steigender HLA-DRA Intensität zu, jedoch mit $p=0,004$ bzw. $p=0,005$ in ANOVA bzw. t-Test weniger signifikant.

Tabelle 15: Zusammenhang von HLA-DRA Expression und TIL-Zahl.

	Negative Expression Mittelwert (SD)	schwache Expression Mittelwert (SD)	moderate Expression Mittelwert (SD)	starke Expression Mittelwert (SD)	ANOVA	t- test
iTILs per HPF	2,8 (4,4)	3,9 (5,1)	5,0 (5,8)	9,3 (9,3)	$p<0,001$	$p<0,001$
sTILs per HPF	4,5 (6,6)	3,9 (4,0)	5,9 (6,1)	8,0 (9,7)	$p=0,004$	$p=0,005$
aTILs per HPF	7,3 (8,1)	7,8 (7,1)	10,9 (10,0)	17,3 (16,3)	$p<0,001$	$p<0,001$

Abbildung 28 demonstriert die signifikante Korrelation von HLA-DRA-Expression und Anzahl der TILs. Grafisch zeigt sich für die iTILs ein annähernd linearer

Zusammenhang. Die Kurve für sTILs weicht von der idealen linearen Kurve ab.

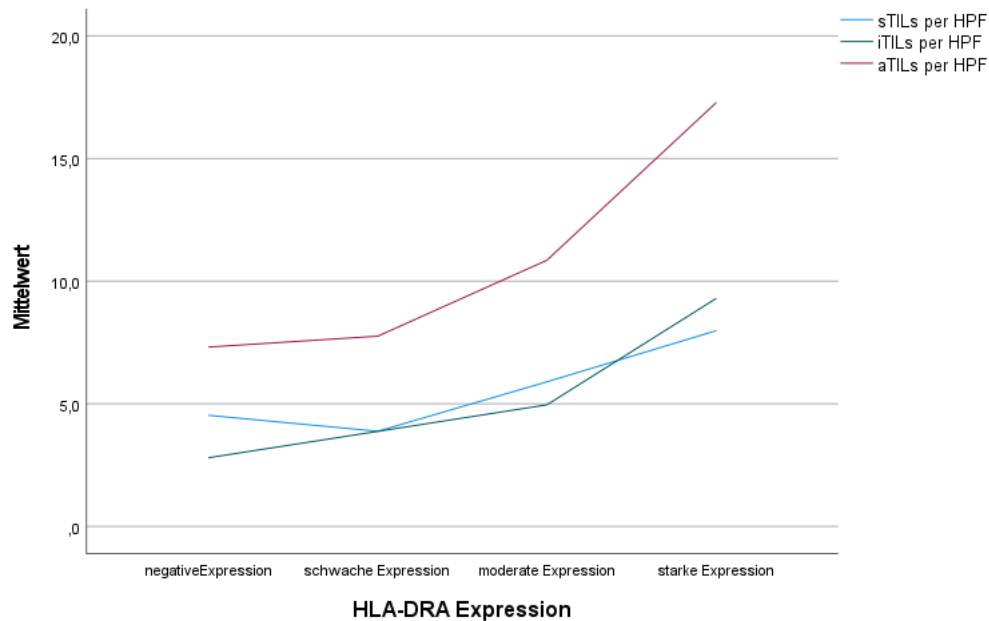


Abbildung 28: Trend der Verteilung der Lymphozytenzahlen - Korrelation mit der HLA-DRA Expression. Rot) aTILs Mittelwerte je Fall $p < 0,001$; blau) sTILs Mittelwerte je Fall $p = 0,004$, grün) iTILs MW je Fall, $p < 0,001$.

Das Fehlerbalkendiagramm in Abbildung 29 a) - c) verdeutlicht den signifikanten Unterschied des Mittelwerts der TILs zwischen der HLA-DRA-L Gruppe und der HLA-DRA-H Gruppe.

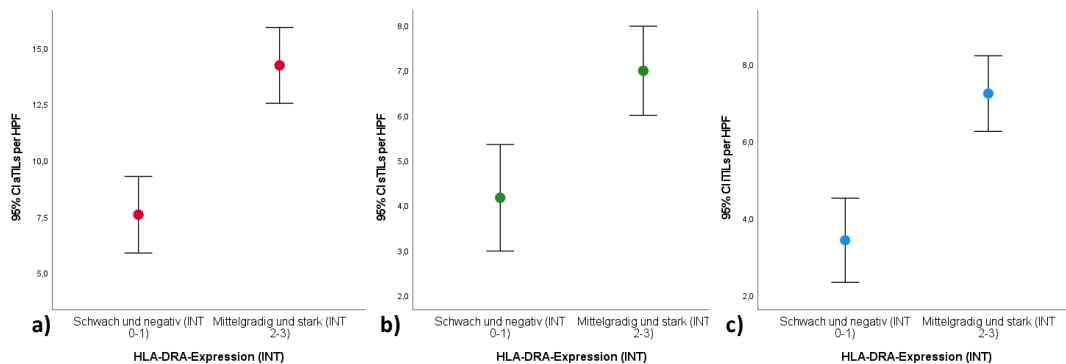


Abbildung 29: Zusammenhang zwischen TIL-Zahl und HLA-DRA. Fehlerbalkendiagramm mit Mittelwert und 95% Konfidenzintervall für iTIL (blau, $p < 0,001$), sTILs (grün, $p = 0,005$), aTILs (rot, $p < 0,001$).

3.3.2 Korrelation von MSLN und CD3⁺ / CD8⁺ TILs

Zwischen den IRS-Stufen von Mesothelin unterscheiden sich die Mittelwerte der TILs weder in der ANOVA noch im t-Test signifikant (s. Tabelle 16).

Tabelle 16 Zusammenhang von MSLN-Expression und TIL-Zahl

	Negative Expression Mittelwert (SD)	Schwache Expression Mittelwert (SD)	Moderate Expression Mittelwert (SD)	Starke Expression Mittelwert (SD)	ANOVA	t-Test
iTILs per HPF	6,9 (9,5)	6,9 (8,1)	6,0 (6,4)	5,4 (5,5)	p=0,690	p=0,246
aTILs per HPF	12,6 (13,2)	13,6 (13,1)	12,6 (13,1)	9,9 (9,2)	p=0,480	p=0,512
sTILs per HPF	5,7(5,9)	6,7 (6,5)	6,6 (8,8)	4,5 (4,4)	p=0,666	p=0,961

Die Mittelwerte von aTILs sowie iTILs sind in der MSLN-H Gruppe geringer als in der MSLN-L Gruppe. Der Mittelwerte der sTILs bleiben weitestgehend stabil, ungeachtet der MSLN-Expression. Grafisch zeigt sich eine Tendenz hin zu einer abnehmenden epithelialen Lymphozytenzahl bei steigender Mesothelin Expression (s. Abbildungen 30+31).

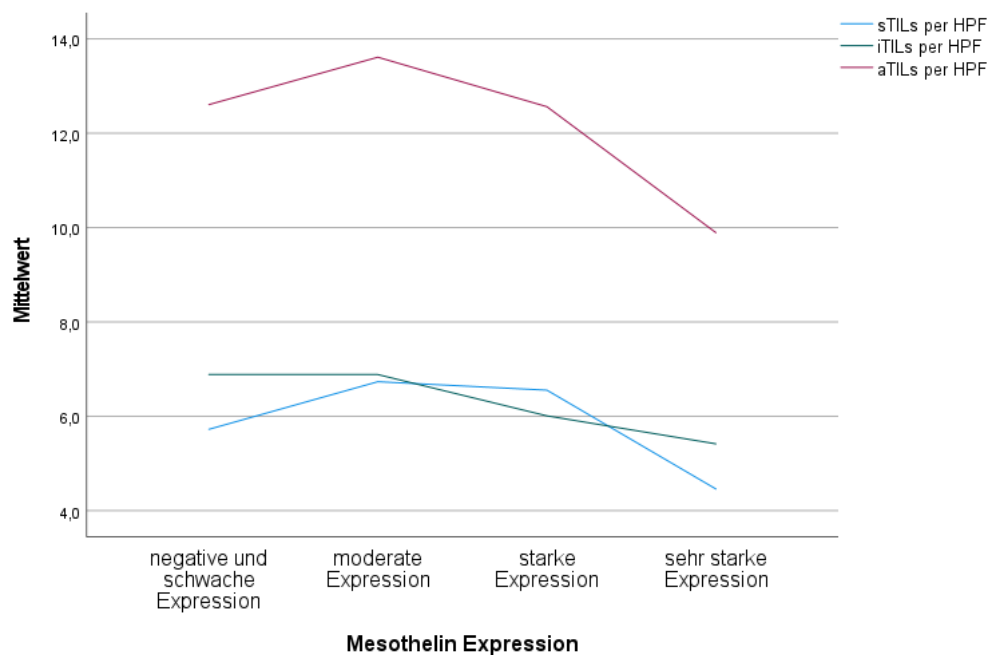


Abbildung 30: Trend der Verteilung der Lymphozytenzahlen - Korrelation mit der MSLN Expression (ANOVA). Rot: aTILs Mittelwerte je Fall, $p=0,080$; blau: sTILs Mittelwerte je Fall, $p=0,550$, grün: iTILs MW je Fall, $p=0,689$.

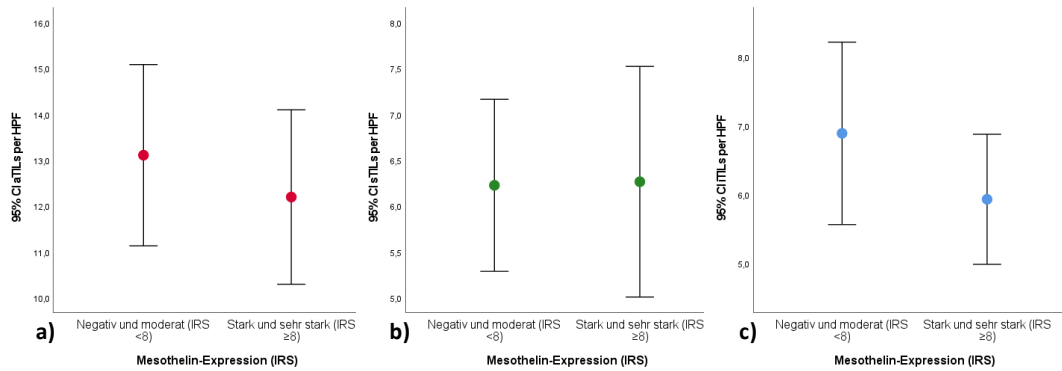


Abbildung 31: Zusammenhang zwischen TIL-Zahl und MSLN. Fehlerbalkendiagramm mit Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Rot: aTILs; grün: sTILs; blau: iTILs.

3.4 Subgruppenanalyse Gesamtüberleben nach Mesothelin, HLA-DRA und CD3+ / CD8- TILs

3.4.1 CD3+ / CD8- und HLA-DRA

Der Einbezug des HLA-DRA Expressionsstatus verändert den Einfluss, den die Lymphozytenzahlen auf das OS haben. Hierbei zeigt sich, dass sich viele iTILs und zusätzlich eine hohe HLA-DRA Expression besonders günstig auf das OS auswirken.

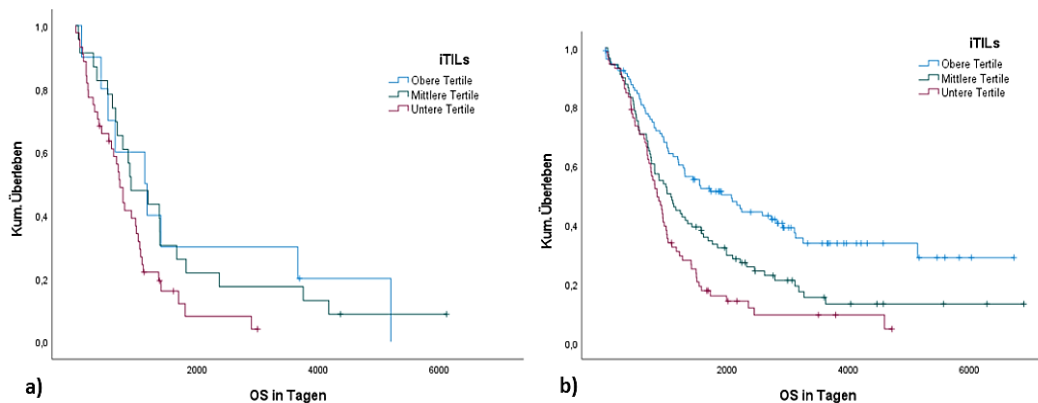


Abbildung 32: Einfluss der iTILs auf das OS geschichtet nach der HLA-DRA Expression. a): HLA-DRA-L ($p=0,096$); b): HLA-DRA-H ($p<0,001$) (vgl. Tabelle 17).

Die kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS nach den Tertilen der iTILs ist in der Gruppe mit zusätzlich HLA-DRA-H signifikanter als in der Gruppe mit zusätzlich HLA-DRA-L ($p < 0,001$ vs. $p = 0,096$). In der Einzelanalyse betrug das mediane OS bei iTILs im obersten Tertil 1727 Tage. In der kombinierten Analyse betrug das OS bei iTILs im Obersten Tertil und zusätzlich HLA-DRA-H 2076

Tage. Bei den Fällen mit iTILs im obersten Tertil und HLA-DRA-L betrug die mediane Überlebensdauer für dasselbe Tertil nur noch 1142 Tage (s. Abbildung 32 und Tabelle 17).

Tabelle 17: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS mit iTILs geschichtet nach der HLA-DRA Expression

HLA-DRA- L(n)	Medianes OS in Tagen	HLA-DRA-H (n)	Medianes OS in Tagen
iTILs obere Tertile (10)	1142	iTILs obere Tertile (105)	2076
iTILs mittlere Tertile (23)	912	iTILs mittlere Tertile (89)	1078
iTILs untere Tertile (44)	732	iTILs untere Tertile (72)	852
Gesamtkollektiv (77)	809	Gesamtkollektiv (266)	1030

3.4.2 T-Lymphozyten und Mesothelin

Die Kombination des lymphozytären immunologischen Milieus mit dem Mesothelin-Expressionsstatus verändert den Einfluss, den die Lymphozytenzahlen auf das Gesamtüberleben haben.

Die Überlebensverteilungen basierend auf den Tertilen der epithelialen Lymphozyten, geschichtet nach dem Expressionsmuster von MSLN, unterscheiden sich sowohl in der MSLN-H als auch in der MSLN-L Gruppe signifikant ($p < 0,001$), während in der MSLN-H Gruppe, die Kurven grafisch weniger stark getrennt sind (s. Abbildung 33).

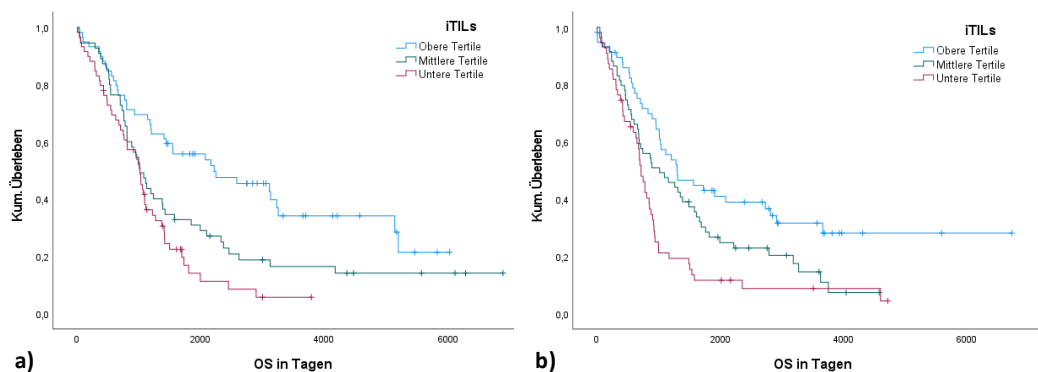


Abbildung 33: Einfluss der iTILs auf das OS geschichtet nach der MSLN-Expression. a): MSLN-L ($p < 0,001$); b): MSLN-H ($p < 0,001$) (vgl. Tabelle 18).

Betrachtet man das mediane OS, so lässt sich der Einfluss der iTILs besser abbilden: Im Gesamtkollektiv hatte die Gruppe der Fälle mit iTIL-Zahlen im obersten Tertil eine OS von 1727 Tagen. Für dasselbe Tertil der MSLN-H Gruppe

betrug das OS 1306 Tagen. In der MSLN-L Gruppe betrug das OS für dasselbe Tertil 2219 Tage (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS mit iTILs, geschichtet nach der MSLN-Expression.

MSLN-L (n)	Medianes OS in Tagen	MSLN-H (n)	Medianes OS in Tagen
iTILs obere Tertile (59)	2219	iTILs obere Tertile (58)	1306
iTILs mittlere Tertile (55)	1017	iTILs mittlere Tertile (59)	1018
iTILs untere Tertile (59)	1018	iTILs untere Tertile (55)	717
Gesamtkollektiv (173)	1142	Gesamtkollektiv (172)	927

3.4.3 HLA-DR und Mesothelin

Der Mesothelin-Expressionsstatus verändert den Einfluss, den die HLA-DRA Expression auf das Gesamtüberleben hat (vgl. Abbildung 34 und Tabelle 19). Die HLA-DRA hoch-exprimierenden (HLA-DRA-H) Fälle im Gesamtkollektiv haben eine mediane Überlebensdauer von 1127 Tagen. Die HLA-DRA-H und MSLN-H Fälle hingegen haben eine mediane Überlebensdauer von 1002 Tagen, wohingegen die HLA-DRA-H und MSLN-L Fälle eine mediane Überlebensdauer von 1237 Tagen aufweisen und damit das OS sogar geringfügig verbessern ($p = 0,048$).

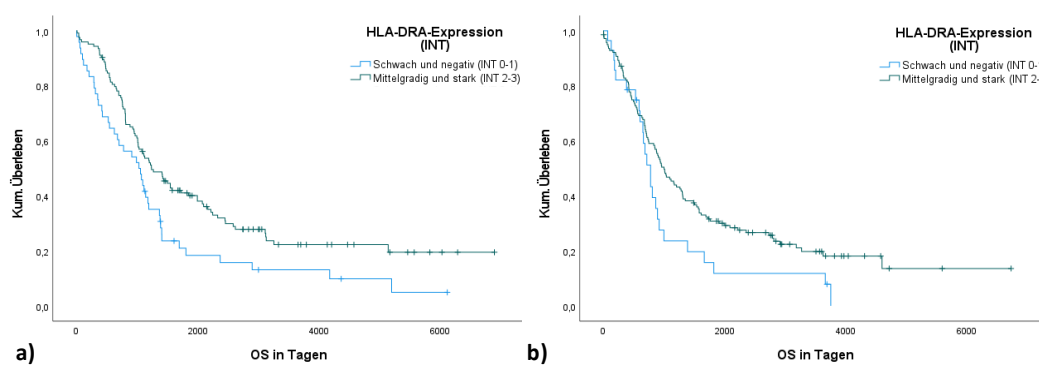


Abbildung 34: Einfluss von HLA-DRA auf das OS geschichtet nach der MSLN Expression. a): MSLN-L ($p < 0,048$); b): MSLN-H ($p = 0,008$) (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS mit HLA-DRA, geschichtet nach der MSLN-Expression.

MSLN-L (n)	Medianes OS in Tagen	MSLN-H (n)	Medianes OS in Tagen
HLA-DRA-L (48)	1030	HLA-DRA-L (28)	779
HLA-DRA-H (124)	1237	HLA-DRA-H (141)	1002
Gesamtkollektiv (172)	1142	Gesamtkollektiv (169)	921

3.5 Einfluss des von HLA-DRA und TIL-Status auf das Gesamtüberleben abhängig von Resektionsstatus

3.5.1 TIL-Status

Einer der am besten belegten unabhängigen Prognosefaktoren ist der Resektionsstatus. Lediglich die iTIL-Zahl ist prognostisch unabhängig vom Resektionsstatus relevant und signifikant mit R0-Status ($p<0,001$) und R1+R2 resezierten Fällen ($p=0,008$) assoziiert. Die aTILs (R0: $p=0,447$ bzw. R1+R2: $p=0,056$) und sTILs (R0: $p=0,002$ bzw. R1+R2: $p=0,269$) sind nicht unabhängig vom Resektionsstatus relevant für das OS (Abbildung 35 und Tabelle 20).

Tabelle 20: Einfluss von TIL-Zahl und Resektionsstatus auf das OS und DFS.

	R0		R1	
	Medianes OS in Tagen (n)	Medianes DFS in Tagen (n)	Medianes OS in Tagen (n)	Medianes DFS in Tagen (n)
Gesamtkollektiv	2076 (126)	787 (126)	779 (210)	378 (210)
aTILs				
Signifikanzniveau	$p=0,447$	$p=0,671$	$p=0,056$	$p=0,161$
Log-Rank Test				
untere Tertile	1498 (36)	589 (36)	779 (81)	383 (81)
mittlere Tertile	1615 (47)	823 (47)	699 (66)	378 (66)
obere Tertile	2248 (43)	967 (43)	912 (63)	376 (63)
sTILs				
Signifikanzniveau	$p=0,002$	$p=0,189$	$p=0,269$	$p=0,415$
Log-Rank Test				
untere Tertile	1284 (40)	628 (40)	779 (62)	391 (62)
mittlere Tertile	1764 (47)	823 (47)	713 (83)	352 (83)
obere Tertile	3257 (39)	898 (39)	88 (65)	408 (65)
iTILs				
Signifikanzniveau	$p<0,001$	$p=0,009$	$p=0,008$	$p=0,049$
Log-Rank Test				
untere Tertile	967 (32)	537 (32)	718 (81)	342 (81)
mittlere Tertile	2458 (36)	975 (36)	745 (74)	451 (74)
obere Tertile	2918 (58)	987 (58)	1016 (55)	408 (55)

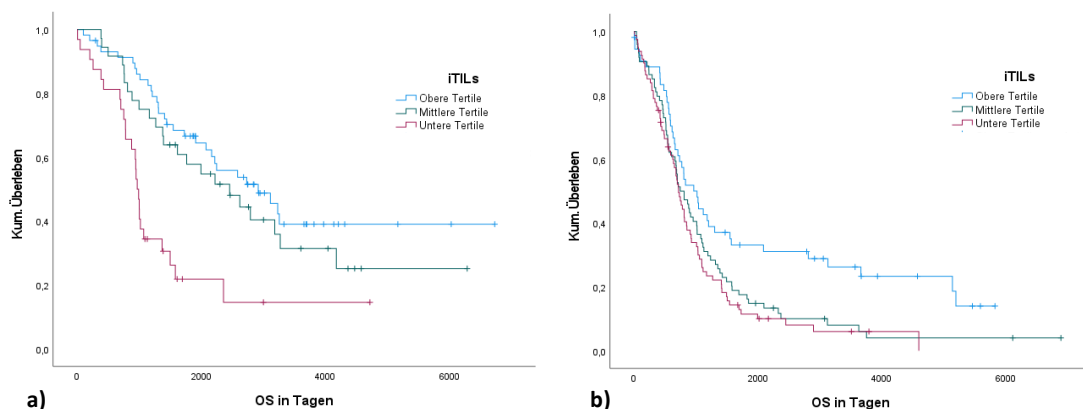


Abbildung 35: Einfluss des iTIL-Status auf das OS geschichtet nach dem Resektionsstatus. a): R0 ($p<0,001$); b): R1+R2 ($p=0,008$) (vgl. Tabelle 20).

3.5.2 HLA-DRA

Die HLA DRA Expression (R0: $p=0,112$ bzw. R1+R2: $p=0,049$) ist nicht unabhängig vom Resektionsstatus relevant für das OS vgl. Tabelle 21. Interessanterweise trennt der HLA-DRA Status in der R1+R2 Gruppe sowohl bei OS ($p=0,049$) als auch DFS ($p=0,086$) die Überlebenskurven stärker als in der R0 Gruppe vgl. Abbildung 36.

Tabelle 21: Einfluss von Resektionsstatus und HLA-DRA Expression auf OS und DFS

	R0		R1+ R2	
	Medianes OS in Tagen (n)	Medianes DFS in Tagen (n)	Medianes OS in Tagen (n)	Medianes DFS in Tagen (n)
Gesamt-kollektiv	2076 (127)	777 (127)	801 (210)	378 (210)
Signifikanzniveau Log-Rank Test	$p=0,112$	$p=0,118$	$p=0,049$	$p=0,086$
HLA-DRA-H	2221 (106)	823 (106)	813 (154)	391 (154)
HLA-DRA-L	1369 (21)	531 (21)	677 (56)	362 (56)

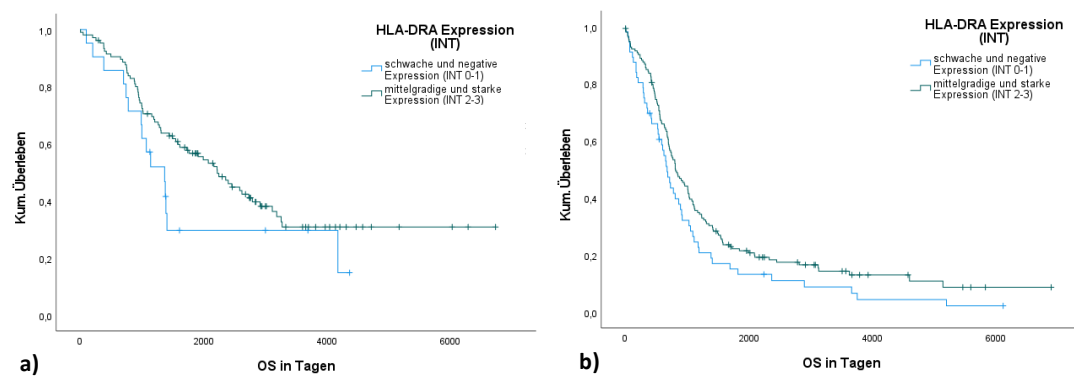


Abbildung 36: Einfluss der HLA-DRA Expression auf das OS geschichtet nach dem Resektionsstatus. a): R0 ($p=0,112$); b): R1+R2 ($p=0,049$) (vgl. Tabelle 21).

3.6 Einfluss einer adjuvanten Chemotherapie auf das Gesamtüberleben abhängig von MSLN, HLA-DRA und TIL-Status

3.6.1 Einfluss einer adjuvanten Chemotherapie auf OS und DFS im Gesamtkollektiv

Wir haben für unser Kollektiv untersucht, ob unsere MSLN, HLA-DRA und die TIL-Zahl mit dem Erfolg einer Chemotherapie (CTX) assoziiert ist. In unserem Kollektiv wurde das Gesamtüberleben und DFS durch eine Chemotherapie verlängert. Tabelle 22 zeigt die klinischen Parameter je nach CTX-Status. In unserem Kollektiv erhielten 103 Patientinnen keine adjuvante CTX. 282 Patientinnen erhielten eine platinbasierte CTX je nach gültiger Leitlinie.

Tabelle 22: Klinische Daten und CTX-Status.

	CTX nicht erhalten	CTX erhalten
Gesamt	103	282
Alter		
<60	18	121
>60	85	161
FIGO	100	281
I	6	8
II	7	20
III	64	210
IV	23	43
Resektionsstatus		
0	25	113
1+2	74	161
OS in Tagen (p<0,001)	636	1161
DFS in Tagen (p=1,94)	382	485

3.6.2 HLA-DRA

Die Überlebensverteilungen basierend auf dem Erhalt oder Nichterhalt einer adjuvanten Chemotherapie unterschieden sich sowohl in der HLA-DRA-H Gruppe als auch in der HLA-DRA-L Gruppe signifikant (p<0,001 im Log-Rank-Test). Die Patientinnen lebten jedoch im Median in der HLA-DRA-L-Gruppe weniger lange unter Chemotherapie als im Gesamtkollektiv unter Chemotherapie (999 Tage vs. 1161 Tage). Bei HLA-DRA-H lag das OS bei Erhalt einer adjuvanten CTX deutlich über dem ohne Erhalt einer adjuvanten CTX (1417 vs. 745 Tage, p < 0,001). Bei Patientinnen mit geringer HLA-DRA-Expression war das DFS länger, wenn sie eine adjuvante CTX bekamen (209 vs. 453 Tage). Bei den Patientinnen mit hoher HLA-DRA-Expression war der Unterschied zwischen

Erhalt und Nichterhalt bezogen auf das DFS marginal (445 vs. 513 Tage). Im Gesamtkollektiv war der Unterschied im DFS je nach Erhalt oder Nichterhalt einer adjuvanten CTX mit 485 vs. 382 Tagen ($p=0,194$) geringer (s. Abbildung 37 und Tabelle 23).

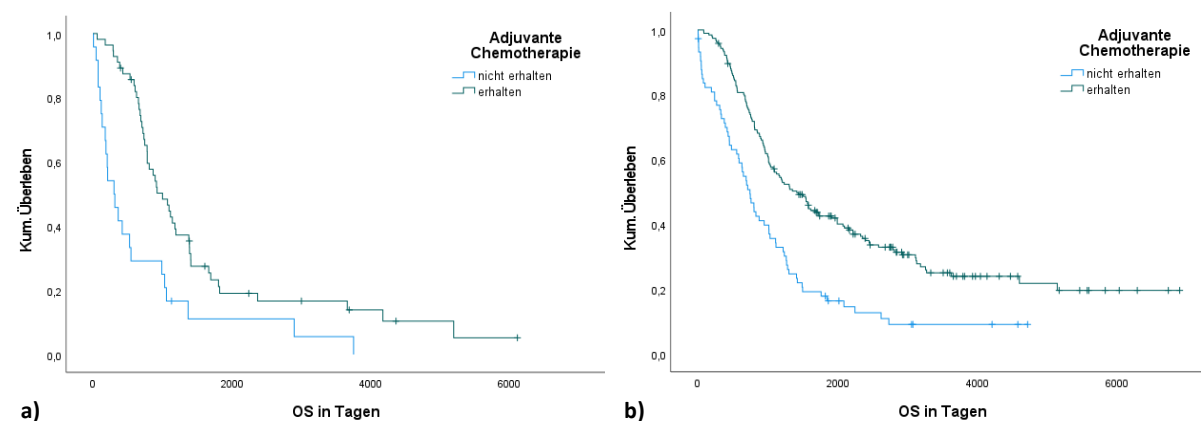


Abbildung 37: Einfluss einer adjuvanten CTX auf das OS geschichtet nach der HLA-DRA Expression. a): HLA-DRA-L ($p<0,001$); b): HLA-DRA-H ($p<0,001$) (vgl. Tabelle 20).

Tabelle 23: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS und DFS mit HLA-DRA, geschichtet nach dem CTX-Status, sowie die Kaplan-Meier-Analyse mit CTX vs. keine CTX zum Vergleich.

	Adj. CTX erhalten		Adj. CTX nicht erhalten		Signifikanzniveau Log-Rank Test	
	Medianes OS in Tagen (n)	Medianes DFS in Tagen (n)	Medianes OS in Tagen (n)	Medianes DFS in Tagen (n)	OS	DFS
Gesamt- kollektiv	1161 (282)	485 (282)	636 (103)	382 (103)	<0,001	0,194
HLA-DRA-H	1417 (193)	513 (193)	745 (74)	445 (74)	<0,001	0,205
HLA-DRA-L	999 (56)	453 (56)	301 (24)	209 (24)	<0,001	0,153

3.6.3 TIL-Status

Wir haben in unserem Kollektiv untersucht, ob der TIL-Status mit dem Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den Patientinnen, welche eine adj. CTX erhielten und denen, welche keine adj. CTX erhielten, korreliert. Wir untersuchten dies für aTILs, iTILs und sTILs. Abbildung 38 zeigt die Kaplan-Meier Kurven für das OS für iTILs, sTILs und aTILs. Grafisch lässt sich erkennen, dass bei sTILs und iTILs der Unterschied zwischen den Kurven mit zunehmender

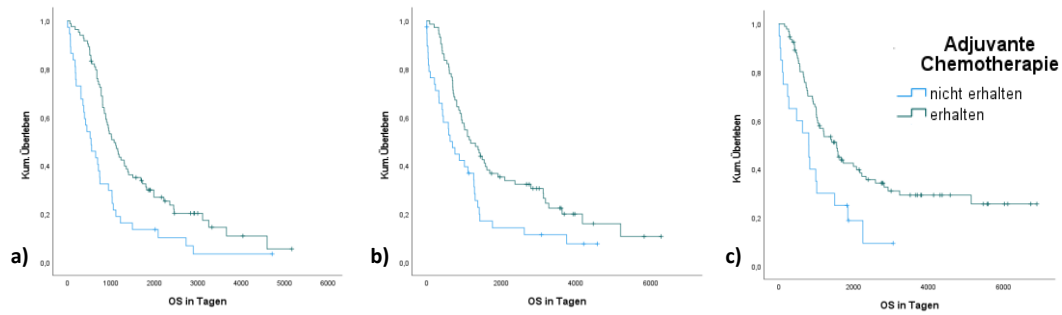
TIL-Zahl größer wird. Die übrigen Werte für aTILs und sTILs sind der Tabelle 24 zu entnehmen.

Tabelle 24: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS und DFS mit TILs, geschichtet nach dem CTX-Status, sowie die Kaplan-Meier-Analyse mit CTX vs. keine CTX zum Vergleich

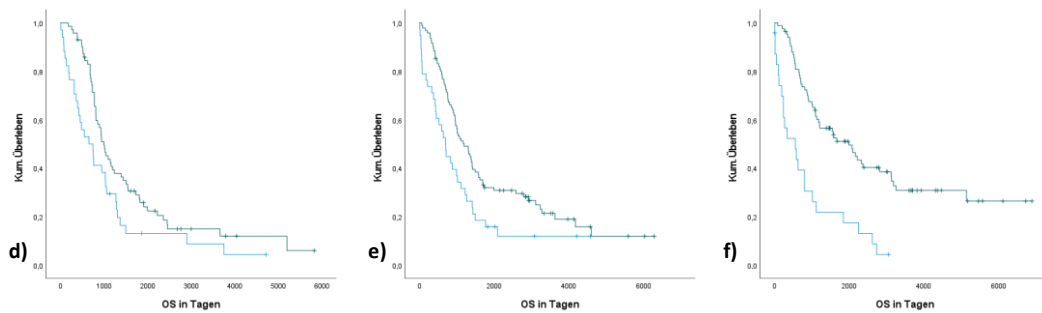
	Erhalt adjuvante CTX		Nichterhalt adjuvante CTX		Signifikanzniveau Log-Rank Test	
	Medianes OS in Tagen (n)	Medianes DFS in Tagen (n)	Medianes OS in Tagen (n)	Medianes DFS in Tagen (n)	OS	DFS
Gesamtkollektiv	1161 (282)	485 (282)	636 (103)	382 (103)	<0,001	0,194
aTILs						
untere Tertile	1078 (84)	453 (84)	545 (37)	332 (37)	< 0,001	0,436
mittlere Tertile	1180 (73)	485 (73)	691 (39)	449 (39)	0,005	0,702
obere Tertile	1542 (93)	538 (92)	801 (20)	382 (20)	0,005	0,222
sTILs						
untere Tertile	999 (71)	453 (71)	652 (34)	452 (34)	0,022	0,944
mittlere Tertile	1193 (95)	451 (95)	691 (38)	445 (38)	0,010	0,979
obere Tertile	1995 (84)	532 (84)	556 (24)	239 (23)	< 0,001	<0,005
iTILs						
untere Tertile	921 (73)	391 (73)	636 (43)	342 (43)	0,024	0,526
mittlere Tertile	1127 (88)	500 (88)	525 (26)	346 (26)	0,018	0,672
obere Tertile	2585 (89)	691 (89)	804 (27)	419 (27)	< 0,001	0,128

Am stärksten war ein Effekt für die iTILs abzulesen. Im Gesamtkollektiv hatte die Gruppe der Fälle, die eine adjuvante Chemotherapie erhielten, eine mediane Überlebensdauer von 1161 Tagen. In der Gruppe der Fälle, die eine adjuvante Chemotherapie erhielten und gleichzeitig eine epitheliale Lymphozytenzahl im oberen Tertil aufwiesen, betrug die mediane Überlebensdauer 2585 Tage. Unter den Fällen, die eine adjuvante Chemotherapie erhielten und eine Lymphozytenzahl im untersten Tertil präsentierten, betrug die mediane Überlebensdauer 921 Tage ($p < 0,001$ vs. $p = 0,024$). Hervorzuheben in diesem Kontext ist das generell vermehrte Vorkommen von TILs, sowohl intraepithelial als auch stromal, gemessen an der obersten Tertile, und der Erhalt einer neoadjuvanten Behandlung (allesamt mit statistischer Signifikanz).

Einfluss einer adjuvanten CTX auf das OS - aTILs Tertile aufsteigend



Einfluss einer adjuvanten CTX auf das OS - sTILs Tertile aufsteigend



Einfluss einer adjuvanten CTX auf das OS - iTILs Tertile aufsteigend

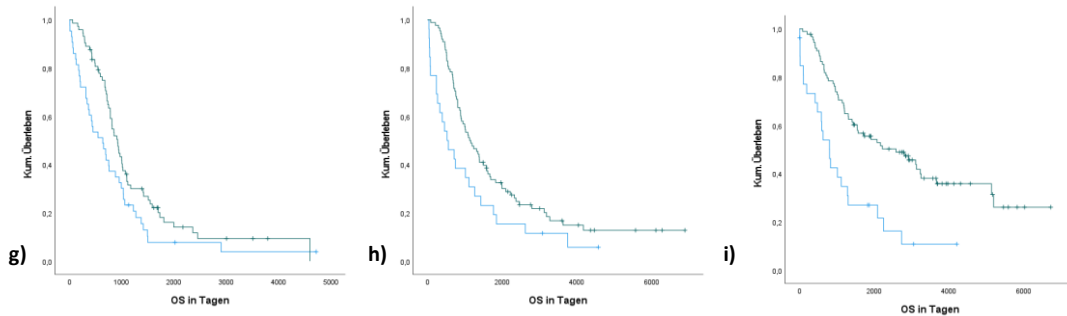


Abbildung 38: Erhalt bzw. Nichterhalt einer adjuvanten CTX; Einfluss der TIL-Zahl auf das OS.

a) aTILs untere Tertile, $p < 0,001$; b) aTILs mittlere Tertile, $p = 0,005$; c) aTILs obere Tertile, $p = 0,005$; d) sTILs untere Tertile, $p = 0,022$; e) sTILs mittlere Tertile, $p = 0,010$; f) sTILs obere Tertile, $p < 0,001$; g) iTILs untere Tertile, $p = 0,024$; h) iTILs mittlere Tertile, $p = 0,018$; i) iTILs obere Tertile, $p < 0,001$ (vgl. Tabelle 23).

3.6.4 Mesothelin

Die Mesothelin-Expression verändert den Einfluss, den der Erhalt einer adjuvanten Chemotherapie auf das Gesamtüberleben hat, wenig, wie Abbildung 39 zeigt.

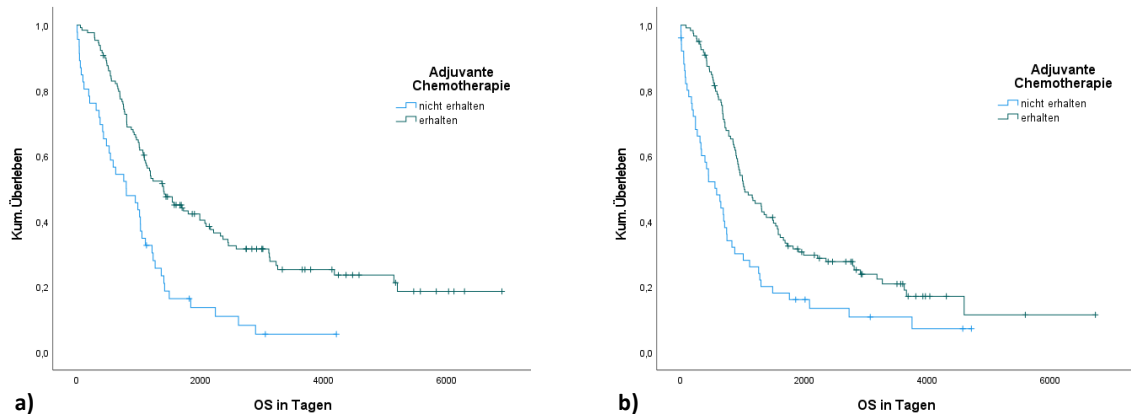


Abbildung 39: Einfluss einer adjuvanten CTX auf das OS geschichtet nach der MSLN-Expression. a): MSLN-L ($p < 0,001$); b): MSLN-H ($p > 0,001$) (vgl. Tabelle 24).

Die Überlebensverteilungen basierend auf dem Erhalt oder Nichterhalt adjuvanter Chemotherapie unterscheiden sich sowohl in der Gruppe mit hoher und sehr hoher Mesothelin-Expression als auch in der Gruppe mit negativer und mittelgradiger Mesothelin-Expression signifikant ($p < 0,001$ im Log-Rank-Test; vgl. Tabelle 25). Die Patientinnen lebten jedoch im Median weniger lange unter Chemotherapie in der MSLN-High Gruppe (1407 Tage vs. 1032 Tage). Im Gesamtkollektiv hatte die Gruppe der Fälle, die eine adjuvante Chemotherapie erhielten, eine mediane Überlebensdauer von 1161 Tagen. Beim DFS ließen sich keine Unterschiede in Abhängigkeit vom MSLN-Status feststellen.

Tabelle 25: Kombinierte Kaplan-Meier Analyse des OS sowie DFS mit MSLN, geschichtet nach dem CTX-Status, sowie die Kaplan-Meier-Analyse mit CTX vs. keine CTX zum Vergleich

	Adj.CTX erhalten		Adj. CTX nicht erhalten		Signifikanzniveau Log-Rank Test	
	Medianes OS in Tagen (n)	Medianes DFS in Tagen (n)	Medianes OS in Tagen (n)	Medianes DFS in Tagen (n)	Unterschied im OS	Unterschied im DFS
Gesamt- kollektiv	1161 (282)	485 (282)	636 (103)	382 (103)	<0,001	0,194
MSLN negative und moderate Expression	1407 (129)	506 (1299)	801 (846)	405 (46)	<0,001	0,192
MSLN starke und sehr starke Expression	1032 (120)	489 (120)	583 (51)	337 (851)	<0,001	0,312

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat an einem großen klinischen Kollektiv von 387 Patientinnen mit Ovarialkarzinomen die Rolle der Expression von HLA-DRA bzw. Mesothelin auf HGSC-Tumorzellen sowie die prognostische Relevanz der Präsenz intraepithelialer CD3⁺/CD8⁻ T-Zellen untersucht. Als Haupt-Endpunkte wurden OS bzw. DFS mit einem Follow-up über 18,8 Jahre betrachtet. Das untersuchte Kollektiv von 387 Patientinnen mit der Diagnose highgrade seröses tuboovarielles Karzinom ist pathologisch und immunhistochemisch nach aktuellem diagnostischen Goldstandard re-klassifiziert und damit sehr rein.

Es wurden nur Patientinnen mit dem Typ high-grade seröses Karzinom von Peritoneum, Tube oder Ovar eingeschlossen.

Die Zusammensetzung unseres Kollektivs ist hinsichtlich des Alters der Patientinnen - 64% der Patientinnen waren zum Diagnosezeitpunkt älter als 60 Jahre - und der Zusammensetzung der FIGO-Stadien - in 71 % der Fälle erfolgte die Diagnosestellung im FIGO Stadium III - annähernd repräsentativ. Das 5 JÜL liegt in unserem Kollektiv bei 27%. In der aktuellen S3 Leitlinie wird das 5 JÜL für alle Formen des Ovarialkarzinoms bei 43% beschrieben (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Dass das OS in unserem nur aus HGSC bestehenden Kollektiv darunter liegt, ist plausibel: Für fortgeschrittene Erkrankungen sinkt das in der Literatur beschriebene 5 JÜL auf 29 % (Reid et al., 2017).

4.1 Immunhistochemie und Auswertungs-Algorithmus

Für unsere Untersuchung wurde sowohl die Intensität der Färbung als auch der Anteil der signalgebenden Tumorzellen erfasst. In unserem Kollektiv war die Expression von HLA-DRA in den Tumorzellen mit einem MW der maximalen Intensität von 2,07 heterogen: 21% der Patientinnen wiesen eine niedrige HLA-DRA- Expression mit einer maximalen Intensität von < 2 auf; 69% eine maximale Intensität >2 im Gesamtkollektiv. In vorausgegangen Publikationen war die Methodik zur Erfassung von HLA-DR heterogen, ebenso die verwendeten Skalen und Cut-offs: In einer Untersuchung an squamösen Larynxkarzinomen (Heng et al., 2023) nutzten die AutorInnen eine dreigeteilte Skala mit negativer HLA-DR

Expression auf Tumorzellen bzw. < 20 % Expression vs. > 20% Expression. In einer Untersuchung an Adenokarzinomen des Ösophagus (Dunne et al., 2017) nutzten die AutorInnen eine duale Skala mit einem Cut-off von 50% Expression. Auch MSLN zeigte eine heterogene Expression: 175 Fälle (45%) wiesen einen IRS <8 auf; 172 Fälle (44%) wiesen einen IRS ≥ 8 auf.

4.2 Doppelfärbung und Cut-off

Viele immunhistochemische Studien charakterisieren die Lymphozyten Population mittels Mono-Färbung von entweder CD8, CD3 oder CD4 (s.o.). CD3 erfasst alle T-Lymphozyten irrespektive der Subpopulation. CD8 positiv sind cytotoxische T-Zellen sowie spezielle Thymozyten (Murphy and Weaver, 2016). Die alpha-Kette von CD8 wird auf plasmazytoiden dendritischen Zellen (Schuster et al., 2015), natürlichen Killerzellen (Addison et al., 2005) sowie Monozyten (Gibbins et al., 2007) exprimiert (Murphy and Weaver, 2016), (UniProt Consortium, 2024), abgerufen am 30.07.25, <https://www.uniprot.org/Uniprotkb/P01732/entry>). Einer sauberen Kategorisierung der T-Zellen kommt eine wichtige Bedeutung zu. Auch um eine Vergleichbarkeit innerhalb der bestehenden Literatur zu gewährleisten. Die Kombination aus der Immunfärbung CD3⁺/CD8⁻ charakterisiert die Gruppe der T-Helferzellen (Th-Zellen). Mehrheitlich weisen diese Th-Zellen in Abgrenzung zu den CD8⁺ T-Zellen keine unmittelbar zytotoxischen Eigenschaften auf, sondern prägen, je nach Differenzierung, z.B. die Immunantwort der angeborenen Immunzellen (Makrophagen, Granulozyten) über ihre spezifischen Zytokinmuster, differenziert als Th1, Th2 oder Th17 Zellen, oder stimulieren als folliculäre Th-Zellen in Keimzentren die Affinitätsreifung der B-Zellen. Regulatorische T-Zellen fallen auch unter die Gruppe der Th-Zellen. Diese werden klassischerweise durch die Expression von FOXP3 definiert und formen an Immunologischen Grenzflächen wie Schleimhäuten eine Immuntoleranz, welche eine überschießende Reaktion gegenüber Kommensalen z.B. im Darm verhindert. Im onkoimmunologischen Kontext ist eine starke regulatorische Achse häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert (Togashi et al., 2019). Neuere Untersuchungen konnten

auch in CD4⁺ T-Zellen cytotoxische Eigenschaften nachweisen (Cachot et al., 2021). Eine weitere Differenzierung hinsichtlich der T_h-Zell Subtypen wurde nicht vorgenommen.

In unserer Studie haben wir das TIL-Vorkommen anhand von Tertilen relativ eingeteilt. TILs wurden je Fall an 6 bzw. 12 Cores bestimmt, was sehr robuste Daten liefert. In unserer Studie sind die Cut-offs (per HPF) für iTILs bei: 0-2,3 für die untere Tertile; 2,4-6,3 für die mittlere Tertile und ab >6,4 für ober Tertile. Goode et al. wählten analog zu Zhang et al. in jeweils groß angelegten Studien zum HGSC bzw. EOC einen absoluten Score mit vorher definierten Cut-offs: negativ (0 TILs), niedrig (1–2 TILs), moderat (3–19 TILs), und hoch (≥20 TILs) (Goode et al., 2017).

4.3 TILs, MSLN, HLA-DRA - Zusammenhang mit klinischen Parametern

Für das Ovarialkarzinom ist die optimale Resektion ein gut belegter Prognosefaktor (du Bois et al., 2009). Eine starke HLA-DRA Expression korrelierte in unserem Kollektiv mit der Resektabilität, gemessen am dokumentierten Resektionsstatus. Der Anteil der HLA-DRA-H war bei den R0 resezierten Patientinnen (83,5%) höher als im Gesamtkollektiv und bei den R2 resezierten Patientinnen (62,8%) kleiner. Mechanistisch wäre hier eine stärkere Inflammation und damit eine Wachstumsbegrenzung über anatomische Kompartimente hinweg denkbar.

Patienten der MSLN-H Gruppe zeigten eine Tendenz zu vermehrtem R1-oder R2 Status in unserem Kollektiv ($\chi^2=0,017$). Es gibt Hinweise, dass Mesothelin durch Bildung von Tumorzellaggregaten eine Metastasierung begünstigt (Hilliard, 2018); (Hilliard et al., 2021)). In einem Kollektiv aus Patienten mit kolorektalem Karzinom korrelierte eine hohe MSLN-Expression mit einer höheren Metastasierungsrate (Inoue et al., 2020, Kawamata et al., 2014). In einer Untersuchung an nicht näher klassifizierten EOCs und BOTs des Ovars korrelierte die immunhistochemische Detektion von MSLN mit einem suboptimalen Resektionsstatus (Hanaoka et al., 2017).

In unserem Kollektiv war eine hohe iTIL-Zahl mit einer verbesserten Operabilität vergesellschaftet: Es zeigte sich, dass die Fälle, bei denen ein Rest >1 mm verblieb (R1 und R2), signifikant weniger iTILs ($p<0,001$) und aTILs ($p=0,001$) aufwiesen gegenüber den R0 resezierten Fällen. Die sTILs waren für den Resektionsstatus weniger relevant ($p=0,058$). Dieser Zusammenhang wurde auch im Kollektiv von Zhang und Kollegen gefunden (Zhang et al., 2003).

4.4 CD3+/CD8- TILs und OS

Die Ergebnisse unserer Arbeit bestätigen bisherige Annahmen: Eine hohe TIL-Zahl ist besonders günstig, wenn die TILs im Tumorepithel vorkommen. In unserer Studie ist es bezogen auf das OS relevant, ob die Lymphozyten im Tumorstroma (medianes OS oberste Tertile sTILs 1209 Tage, $p=0,008$) liegen oder im Tumorepithel (medianes OS oberste Tertile iTILs: 1727 Tage, $p<0,001$). Die Gruppe iTILs-mittlere Tertile entsprach im OS dem Gesamtkollektiv, wobei die Gruppe iTILs untere Tertile ein deutlich verkürztes OS hatte und die Gruppe iTILs obere Tertile ein deutlich verlängertes OS gegenüber dem Gesamtkollektiv aufwies.

In der aktuellen klinischen Routine, Diagnostik und Therapie des HGSC wird der TIL-Status nicht erhoben. Klinische Entscheidungen werden ohne Berücksichtigung der TIL-Zahlen getroffen.

Tumorinfiltrierende Lymphozyten werden beim HGSC schon lange als wichtiger Prognosefaktor diskutiert (Santoiemma and Powell, 2015, Nelson et al., 2024).

Für CD8⁺ TILs ist der Stellenwert für die Prognose bereits gut belegt:

Eine große Metaanalyse mit 1815 Fällen aus 10 eingeschlossenen Studien zeigte 2011, dass intraepitheliale CD8⁺ Lymphozyten ein wichtiger Parameter zur Stratifizierung der individuellen Prognose von HGSC-Patientinnen sind (Hwang et al., 2012). Eine Arbeit des OTTA-Konsortiums mit über 5500 eingeschlossenen Fällen, davon 3196 HGSC-Patientinnen, konnte einen hohen prognostischen Wert der CD8⁺ TILs mit einem vorteilhaften Dosis-Wirkungs-Zusammenhang nachweisen. Die positive Beeinflussung des OS war unabhängig von Resektionsstatus und angewandtem Therapieregime.

Unmittelbar therapeutische oder diagnostische Implikationen ihrer Studie gaben das Autorenteam aus dem OTTA-Konsortium nicht an (Goode et al., 2017). Demgegenüber empfahlen Coukos et al. einen Cut-off von >5 CD8⁺ TILs/200X Gesichtsfeld zur Verwendung in der klinischen Routine (Hwang et al., 2012).

Für CD4⁺TILs besteht folgende Datenlage:

Eine Metaanalyse von Publikationen zu epithelialen Ovarialkarzinomen stellte heraus, dass in 5 von 8 Publikationen CD4⁺ TILs einen prognostisch günstigen Effekt hatten, während in 3/8 Publikationen kein prognostischer Zusammenhang beobachtet worden war (Hudry et al., 2022). In einer Untersuchung an 128 HGSC war eine hohe CD4⁺ TIL-Zahl neben weiteren immunologischen Parametern mit einem verbesserten OS bzw. DFS korreliert (Pinto et al., 2018a). Eine Untersuchung an 117 EOCs konnte einen prognostisch günstigen Effekt für Fälle mit einer hohen CD8⁺ zu CD4⁺ Ratio nachweisen: Das Autorenteam schlussfolgerte, dass in der Studie die regulatorischen T-Zellen innerhalb der CD4⁺ Fraktion den prognostischen Benefit durch die CD8⁺ Zellen schmälerten; es konnte ein verbessertes Überleben für die Gruppe mit einer hohen CD8⁺ zu CD25⁺/FOXP3⁺(Treg) Ratio gezeigt werden (Sato et al., 2005). In einer Untersuchung an Melanomen konnte eine inhibitorische Wirkung auf CD8⁺ T-Zellen über die Interaktion von MHC II tragenden Tumorzellen mit CD4⁺ T-Lymphozyten und konsekutiver TNF-Sekretion nachgewiesen werden (Donia et al., 2015).

In weiteren Studien an Ovarialkarzinomen (HGSC:(Le Page et al., 2012); EOC: (Hamanishi et al., 2011, Tsiatas et al., 2009)) waren CD4⁺ TILs mit einer verbesserten Prognose vergesellschaftet.

In diese Studie an NSCLC wurde die Zusammensetzung der CD4⁺ TILs aufgeschlüsselt: Bei den 11 immunhistochemisch untersuchten Tumoren waren die intraepithelialen Th-Zellen entweder in Th2 oder Treg subdifferenziert (Frafjord et al., 2021).

In einer Untersuchung an 187 HGSC wurden via Durchflusszytometrie und IHC CD4⁺ T Zellen identifiziert. Hiervon waren 13% CD25⁺/FOXP3⁺-T-Zellen, diese regulatorischen Zellen waren in vitro nicht zu Zytokinproduktion fähig, was eine

Erschöpfung dieser Treg Subgruppe nahelegte. Für diese Subgruppe erschöpfter regulatorischer CD4⁺ TILs konnte in CD8⁺ TIL haltigen Tumoren hier eine Korrelation mit einem verbesserten Überleben nachgewiesen werden (deLeeuw et al., 2015).

In einer weiteren Studie an 39 am HGSC erkrankten Patientinnen wurden die CD4⁺ T-Zellen ebenfalls subdifferenziert. Besonders war hier die Methodik: Die Subdifferenzierung erfolgte mittels der in Stanford entwickelten CIBERSORT-Technologie (Chen et al., 2018) mithilfe derer 22 Immunzelltypen aus Multizellproben differenziert werden können. Die Häufigkeit der Zellpopulationen wurden hier nicht durchflusszytometrisch erhoben, sondern mit machine learning aus einer RNA-Datenbank aus einer Multizellprobe je Fall errechnet. Eine nicht veröffentlichte LM22-Datenbank, welche 547 den 22 Immunzelltypen exklusiv zuzuordnende Gene beinhaltet, diente hier als Grundlage. Follikuläre T-Zellen und regulatorische CD4⁺ Zellen waren mit einem verbesserten OS (> 10 Jahre) assoziiert, während naive CD4⁺ T-Zellen mit einem kürzeren OS (< 2 Jahre) vergesellschaftet waren (Kotnik et al., 2023).

Eine Untersuchung der Arbeitsgruppe Pereault und Ohashi führte 2023 an HGSC-Patientinnen fallweise eine Analyse der im Serum nachgewiesenen Autoantikörper, der durch die Tumorzellen exprimierten (Neo)antigene und der tatsächlichen TCR-Affinität der aus dem jeweiligen Tumor isolierten TILs durch. Weder die Expression, noch das Vorhandensein von Antikörpern korrelierte mit der Zahl affiner TILs. Auch wurden Autoantikörper gegen Neoepitope gefunden, jedoch fand man keine hierfür affinen TILs. Die Mehrheit der hier gefundenen affinen TILs waren gegenüber Autoantigenen affin (Millar et al., 2023).

4.5 HLA-DRA und OS

MHC II Moleküle sind in vielen Tumorentitäten exprimiert (vgl. Tabelle 1). Aus der Familie der MHC-Komplexe ist HLA-DRA das am stärksten konservierte Protein. Auf Proteinebene wird die HLA-II-Expression auf Tumorzellen als Korrelat einer Inflammation gehandelt (Axelrod et al., 2019, Johnson et al., 2016, Seliger et al., 2017). Ob im Regelfall bei einer HLA-II Expression auf Tumorzellen eine Bindung

mit TCR und dem Korezeptor CD4 entsteht, ist unklar. Eine Untersuchung an Melanomen konnte zeigen, dass eine direkte Stimulation von CD4⁺ T-Zellen durch HLA-II positive Tumorzellen vorkommt, in diesem Fall handelte es sich um regulatorische T-Zellen (Oliveira et al., 2022). Korrespondierend führte eine Blockade von MHC II in 6 Melanomzelllinien in-vitro zu einer signifikanten Reduktion der CD4⁺T-Zell Aktivierung (Donia et al., 2015). Eine weitere Studie an Melanomen zeigte, dass in Zellkultur zytotoxische CD4⁺ T-Zellen gegenüber konstitutiv MHC II exprimierenden Tumorzellen reaktiv waren, auch in Abwesenheit von IFN γ . Wohingegen bei nicht konstitutiv MHC II exprimierenden aber zur Expression fähigen Melanomzellen, IFN γ notwendig war (Draghi et al., 2023). Eine Expression von HLA-DRA korreliert jedoch nicht zwingend mit der Expression des funktionalen HLA-DR: In einer Genexpressionsanalyse an 11 Ovarialkarzinom-Zelllinien und 3 HGSC-Proben konnte eine Überexpression der HLA-DR Alpha Kette bei einer inadäquaten Expression der HLA-DR Beta Kette gezeigt werden (Rangel et al., 2004).

Für Ovarialkarzinome wurde die Rolle einer HLA-DR Expression bislang nur an kleinen HGSC-Kollektiven (Callahan et al., 2008) bzw. Zelllinien (Turner et al., 2017, Rangel et al., 2004) untersucht. Callahan et al. konnten ein verlängertes OS bei HLA-DMB Expression im Tumor von 184 HGSC-Patientinnen beobachten; hier war zudem eine positive Assoziation zwischen einer CD8⁺ TIL-Infiltration und der HLA-DMB Expression beobachtet worden (Callahan et al., 2008).

In unserem Kollektiv korrelierte eine hohe Expression von HLA-DRA mit einem verlängerten OS und DFS ($p=0,001$ bzw. $p=0,004$). Interessant ist, dass in unserem Kollektiv nicht die Zahl der HLA-DRA exprimierenden Tumorzellen, sondern die Intensität der Färbung auch in kleineren Tumorarealen führend für die Prognose war. Dies spricht für den klonalen Charakter der Erkrankung. Patientinnen mit negativer HLA-DRA-Expression ($n = 35$, 10%) lebten im Median 12,9 Monate kürzer als Patientinnen mit starker HLA-DRA Expression ($n = 141$, 40%). Ein Rezidiv trat im Median für die letztgenannte Gruppe 3,8 Monate später auf.

Untersucht man den Einfluss von HLA-DRA auf das OS gruppiert nach R-Status stellt man fest, dass HLA-DRA kein vom R-Status unabhängiger Parameter ist: In der R0-Gruppe verliert HLA-DRA ($p=0,112$) an Signifikanz – in der R1+R2-Gruppe zeigt eine HLA-DRA Expression eine günstige Tendenz ($p=0,049$). Somit scheint ein wichtiger Wirkmechanismus von HLA-DRA beim HGSC die Begrenzung des infiltrativen Wachses sowie die zunehmende Lymphozyten-Zahl zu sein.

Ubiquitär exprimierte HLA-Liganden, welche zusätzlich eine stabile antitumor-Immunität induzieren können, werden aktuell zur Verwendung in Peptid-basierten Impfstoffen gesucht. So wurde beispielsweise Mesothelin in einer Untersuchung an Ovarialkarzinomen häufig im HLA-DR Ligandom der Tumorzellen identifiziert (Tegeler et al., 2022, Schuster et al., 2017). Tegeler et al. konnten für die Subgruppe der Patientinnen, welche Mesothelin in ihrem Immunpeptidom als Ligand von HLA-DRB trugen, ein verbessertes Gesamtüberleben nachweisen (Tegeler et al., 2022). In der gleichen Studiengruppe konnte für die immunhistochemisch Mesothelin hochpositive Kohorte ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben gezeigt werden (Schuster et al., 2017).

4.6 Mesothelin und OS

In Untersuchungen an Adenokarzinomen der Lunge (Thomas et al., 2015, Kachala et al., 2014), Kolorektalen Karzinomen (Shiraishi et al., 2020, Malla et al., 2023), Adenokarzinomen des Pankreas (Nahm et al., 2019), Ovar (Yildiz et al., 2019) war eine hohe MSLN-Expression mit einer negativen Prognose korreliert. In einer retrospektiven Analyse an TNBC war die immunhistochemische Detektion von Mesothelin nicht mit der Prognose korreliert (Bayoglu et al., 2015).

Mesothelin wurde in einer Untersuchung an Ovarialkarzinomen häufig im HLA-DR-Ligandom der Tumorzellen identifiziert (Tegeler et al., 2022, Schuster et al., 2017). In der gleichen Studiengruppe konnte für die Mesothelin hochpositive Kohorte ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben gezeigt werden. Tegeler

et al. konnten für die Subgruppe der Patientinnen, welche MSLN in ihrem Immunpeptidom als Ligand von HLA-DRB trugen, ein verbessertes Überleben nachweisen (Tegeler et al., 2022).

Trotz seiner eher negativen Auswirkung auf die Prognose in Malignomen hat sich MSLN bislang nicht als prognostischer Marker in der klinischen Routine etabliert. Ein für den Alltag relevanter, prognostisch signifikanter Cut-off für MSLN wurde bislang nicht validiert.

In unserer Arbeit wurde Mesothelin an einem großen, klinisch und histopathologisch sehr umfangreich stratifizierten Kollektiv mit langem klinischem Follow-up untersucht. In unserem Kollektiv war eine hohe MSLN-Expression (IRS>8) mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet. Dennoch ist MSLN isoliert nicht signifikant relevant für das OS: In der MSLN-H Gruppe, betrug das OS im Median 927 Tage vs. 1180 Tage bei Patienten der MSLN-L Gruppe ($p=0,113$). Das entspricht mit einer Differenz von 253 Tagen, einem verlängerten Überleben von 8,3 Monaten. In der Subgruppenanalyse zeigten sich für eine bestimmte Gruppe jedoch eine günstige Beeinflussung der Prognose:

Besonders die Gruppe MSLN-L mit hohen TIL-Zahlen (iTILs obere Tertile; $n=59$) wies mit 2219 Tagen ein herausragend hohes Medianes OS auf gegenüber der Einzelanalyse des TIL-Status (iTILs obere Tertile: OS 1727 Tage).

In unserem Kollektiv konnten keine synergistischen Effekte von HLA-DRA und MSLN nachgewiesen werden. Es fand sich kein Überlebensvorteil in der HLA-DRA-H / MSLN-H Gruppe. Zu betonen ist an dieser Stelle, dass in den vorausgegangenen Studien von Tegeler et al. sowie Schuster et al. MSLN im HLA-DR-Ligandom betrachtet und nicht wie in unserer Studie mit IHC auf Expressionsebene nachgewiesen worden war. Es besteht kein zwingender Zusammenhang zwischen der MSLN-Expression und der Präsentation auf einem MHC II Molekül. Möglicherweise trägt eine MSLN-Expression zur Immunevasion bei, was einerseits die tendenziell niedrigere Lymphozytenzahl und das vermehrte Vorkommen einer R1+R2 Resektion sowie andererseits das verkürzte OS und DFS erklären könnte.

Tothill und Kollegen beschrieben bereits 2008 für das HGSC via RNA-Expressions-Analyse vier Molekulare Subtypen mit prognostischer Relevanz: C1 (Stromazell-Signatur dominierte HGSC) und C5 (mesenchymal differenzierte HGSC) waren mit einer schlechten Prognose assoziiert, weniger TILs und C5 mit einer verminderten Expression von MHC I und II Genen, während C2 (Immunzell-Signatur reiche HGSC) und C4 (Stromazell-Signatur-arme HGSC) prognostisch günstiger waren (Tothill et al., 2008). Eine Arbeit des OTTA-Konsortiums fand korrespondierend an einer weltweiten großen Kohorte einen prognostischen Benefit für epithelzellreiche HGSC mit molekularem C4 Subtyp, welcher hier als differenzierter Typ bezeichnet wurde (Nelson et al., 2024).

In unserer Arbeit wurde der Allred-Score für die Kategorisierung von Mesothelin an Tissue Microarrays angewandt. Bei dieser Methodik besteht generell die Gefahr der Sampling-Unschärfe, sodass in epithelzellreichen Tumoren möglicherweise mehr MSLN-Positivität nachgewiesen wurde. Dies könnte dazu beigetragen haben, den negativen Effekt von MSLN statistisch abzuschwächen. Für weitere Studien sollte die Intensität der Expression in einzelnen Tumorzellen und die Tumorerheterogenität bei der Auswertung immunhistochemischer Färbungen erfasst werden.

4.7 TILs - HLA-DRA-, und MSLN-Status

In unserer Arbeit stellen wir eine HLA-DRA Expression in den Zusammenhang mit der CD4⁺ TIL-Zahl. Unsere Daten stützen die Hypothese, dass eine HLA-DRA Expression Korrelat einer inflammatorischen zellulären Immunreaktion ist. In unserer Untersuchung gab es einen statistischen Zusammenhang zwischen der Expression von HLA-DRA in den Tumorzellen und der Zahl an CD3⁺/CD8⁻ iTILs ($p < 0,001$).

Die Subgruppe HLA-DRA-H und iTILs obere Tertile wies darüber hinaus ein günstigeres OS auf (2076 Tage). Dieser Zusammenhang wurde in der Literatur schon für Ovarialkarzinome (Callahan et al., 2018) und andere solide Malignome wie Melanom (Johnson et al., 2016), kolorektales Karzinom (Walsh et al., 2009) oder Pankreaskarzinom (Gaida et al., 2012) beschrieben. Die statistische

Korrelation von stromalen TILs mit der HLA-DRA Expression war weniger signifikant.

Zwischen dem Expressionsstaus von MSLN und den TIL-Zahlen hingegen, besteht die Tendenz zu verminderten TIL-Zahlen bei steigendem IRS (6,9 iTILs/HPF (MSLN-L) vs. 5,4 iTILs/ HPF (MSLN-H); $p=0,666$). In einer Untersuchung an CRCs wurden bei hoher MSLN-Expression vermehrt regulatorische T-Zellen im Tumorgewebe nachzuweisen (Malla et al., 2023).

Es gab keinen Zusammenhang zwischen der HLA-DRA und der MSLN-Expression in unserem Kollektiv.

4.8 TILs, HLA-DRA- und MSLN-Status – Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie

In unserem Kollektiv korreliert die CD4⁺ TIL-Zahl mit dem Erfolg einer Chemotherapie (gemessen an Gesamtüberleben sowie rezidivfreiem Überleben):

Das mediane OS bei Erhalt einer adjuvanten CTX betrug 1161 Tage im Gesamtkollektiv. Das Mediane OS in der CTX-Gruppe mit iTILs im oberen Tertil betrug 2585 Tage gegenüber 921 Tagen, dem medianen OS der CTX-Gruppe mit iTILs im unteren Tertil. Das mediane OS in der no_CTX-Gruppe betrug 636 Tage.

Mit abnehmender Lymphozytenzahl wird der Überlebensvorteil durch eine adjuvante CTX geringer. Die Kaplan Meier Kurven für CTX vs. no_CTX, geschichtet nach den Tertilen der iTILs, unterscheiden sich mit abnehmender TIL Zahl weniger signifikant: $p=0,024$ für iTILs untere Tertile, $p<0,001$ für iTILs obere Tertile bzw. $p=0,018$ für iTILs mittlere Tertile.

In einer Untersuchung an einem Vorläuferkollektiv unserer Studienkohorte war das Vorkommen sowohl von CD8⁺ als auch CD3⁺ TILs mit einem verbesserten Ansprechen gegenüber einer platinbasierten Chemotherapie korreliert (Bösmüller et al., 2011). Klassische cytotoxische Substanzen führen zu einer hohen Freisetzung von (Neo-)Antigenen sowie zu einem immunogenen Zelltod (Lau et al., 2020). Eine Untersuchung an NSCLC zeigte, dass Patientinnen, bei

denen bereits vor Chemotherapie-Beginn eine CD4-Immunantwort gegenüber einem ubiquitär exprimierten Epitop vorlag, deutlich stärker von einer Chemotherapie profitierten (Godet et al., 2012).

Interessant ist, dass in unserem Kollektiv die HLA-DRA-H Fälle ebenfalls besonders stark von einer Chemotherapie profitieren. Zu erklären wäre dies durch eine verbesserte Rezeption und möglicherweise auch Präsentation von Antigenen, welche durch Zellzerfall freierwerden, in einem immunologisch kontrollierten Tumor.

4.9 Limitationen

In unserem Kollektiv wurde in einer interdisziplinären Tumorkonferenz für alle Patientinnen festgelegt, ob eine adjuvante Chemotherapie indiziert war. Dies wurde gemäß der jeweiligen Leitlinienversion und des Performance Status nach WHO/ ECOG (ECOG-PS) entschieden. Generell festzuhalten ist, dass Patientinnen, welchen keine Chemotherapie empfohlen wird, tendenziell schwerer vorerkrankt sind und einen niedrigeren ECOG-PS aufweisen. ECOG-PS und Vorerkrankungen wurden im klinischen Datensatz nicht hinterlegt und wurden bei unserer Auswertung nicht berücksichtigt.

Limitiert ist der klinische Datensatz durch die Nicht-Erfassung einer Anti-VEGF-Therapie mit Bevacizumab. Zudem liegen keine molekularen Daten hinsichtlich BRCA 1/ 2 sowie Defekten in der homologen Rekombination (HRD-ness) vor.

Die Analyse der immunhistochemischen Färbungen erfolgte semiquantitativ und wurde für diese Studie von Pathologinnen mit gynäkopathologischer Zusatzausbildung durchgeführt. Demgegenüber gestellt ist zu bemerken, dass heutzutage die semiquantitative Auswertung der Färbungen zunehmend von automatisierter Bilderkennungssoftware abgelöst wird. So wurde 2024 von einer südkoreanischen Forschungsgruppe eine Pan-Tumor Bildanalyse Software vorgestellt (Brattoli et al., 2024).

Die Immunhistochemie ist eine etablierte Methode, die ermöglicht, die Expression bestimmter Proteine bei gleichzeitig erhaltener histomorphologischer Beurteilbarkeit zu evaluieren. Zudem findet diese Methode heute nach wie vor

breite Anwendung in der klinischen Routinediagnostik. Besonders hervorzuheben ist diesbezüglich, dass sich mittels Immunhistochemie neue Biomarker so schnell in die klinische Praxis und Diagnostik übertragen lassen. Dennoch ist die Analyse der Immunhistochemie mittels bestimmter Auswertealgorithmen, die oft nur Mono- oder Doppelfärbungen zulässt, zeitaufwändig und für die Untersuchung von ganzen Pathways oder Clustern weniger geeignet, verglichen mit z.B. DNA- oder RNA- Sequenzierung.

4.10 Ausblick

In dieser Arbeit konnte nebenbefundlich gezeigt werden, dass bei niedrigen CD4⁺ iTIL-Zahlen eine Chemotherapie kaum eine Verlängerung des OS bewirkt. Hierzu sind jedoch noch weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen und strengen Ein- und Ausschlusskriterien sowie die Findung von Konsensus-fähigen Cut-offs notwendig. Perspektivisch betrachtet wäre eine Datenlage wünschenswert, die es erlaubt, die TIL-Zahl als prognostischen Marker in die Leitlinien mitaufzunehmen.

Für unser Kollektiv liegen noch keine Daten zur Therapie mit einem Checkpointinhibitor vor. Für zukünftige Projekte wäre interessant, ob der TIL-Status bzw. HLA-DRA-Status mit einer PARP-Inhibitor Therapie korreliert. Für unser Patientinnen-Kollektiv flossen weder PARP-Inhibitoren noch Checkpointinhibitoren in die Therapieregime ein.

In unserem Kollektiv waren TIL- und HLA-DRA- reiche Tumoren mit einem verbesserten Resektionsstatus assoziiert, und MSLN zeigte eine Assoziation mit einer suboptimalen Resektion. Möglicherweise ist hier auch die erschwerte intraoperative Detektion der Tumorabsiedlungen ursächlich. Eine Betrachtung der makroskopischen Merkmale in Korrelation mit den untersuchten molekularen Markern könnte hier weitere Erkenntnisse über die Auswirkungen der Expression auf die Tumorbilogie liefern.

In den letzten Jahren wird MSLN als Target für Immuntherapien erforscht, da es sich durch seine spärliche physiologische Expression im menschlichen Körper (auf den Mesothelien der Körperhöhlen) (Chang et al., 1992) und der hohen

Expression in vielen Tumorentitäten auszeichnet (Hassan et al., 2004, Hassan et al., 2016, Hassan et al., 2020).

In unserer Arbeit wurden TMAs mit Proben von Primärtumor und Metastasen erstellt (Multisite). Eine Unterscheidung der Proteinexpression je nach Lokalisation je Patientin erfolgte nicht. In einem weiteren Schritt wäre interessant, ob es Fälle gibt, bei denen eine Heterogenität des Immunprofils je nach Tumorlokalisation besteht. Möglicherweise lassen sich so neue Ansätze zur Therapie finden oder Rückschlüsse hinsichtlich Tumorgenese, Metastasierungspotenzial und Dynamik des TME ziehen.

In potenziellen Folgeprojekten könnte die Auswertung mittels Bildanalyse mit künstlicher Intelligenz erfolgen. Diese ist auch auf FFPE-Material anwendbar, welches in der retrospektiven Untersuchung von Archivmaterial häufig ausschließlich vorliegt.

Kürzlich publizierte das OTTA-Konsortium eine Untersuchung zu CCNE1 an einem großen HGSC-Kollektiv. Dieses physiologischerweise den Zellzyklus regulierende Protein (Caldon and Musgrove, 2010) korrelierte hier bei Überexpression mit einer schlechten Prognose. Diskutiert wurde auch, ob eine CCNE1 Amplifikation mit einem schlechten Ansprechen gegenüber PARP-Inhibitoren korreliert, und ob CCNE1 als prädiktiver Biomarker für Tumoren, welche keine homologe Rekombinationsdefizienz (HRD) aufweisen, verwendet werden kann (Kang et al., 2023). Für weitere Untersuchungen wäre interessant, inwiefern CCNE1 möglicherweise zur Immunevasion beiträgt, und ob sich CCNE1 amplifizierte Tumoren durch wenige TILs und fehlende HLA-DRA Expression auszeichnen.

In neueren Publikationen wird der CD4⁺ TIL-Status im Hinblick auf eine diagnostische Wertigkeit zur besseren Vorhersage des Ansprechens auf Immuntherapien untersucht (Borst et al., 2018, Speiser et al., 2023).

Eine Expression von MHC II wird ebenfalls in aktuellen Publikationen als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf anti-PD-1 Immuntherapien in verschiedenen Tumorerkrankungen gehandelt (Johnson et al., 2016, Heng et al., 2023, Amrane et al., 2024).

Aktuelle Studien zeigten, dass es in malignem Gewebe zur Bildung von sekundär lymphatischem Gewebe kommen kann. Die histologische Zusammensetzung dieser Aggregate weist die Bildung eines Keimzentrums sowie hochendotheliale Venulen ähnlich einem Lymphfollikel auf und es wird postuliert, dass es hier im Tumor zu einer Affinitätsreifung von B-Zellen kommt. Das Vorhandensein von tertiären lymphoiden Strukturen (TLS) wird in den Zusammenhang mit dem Erfolg einer Immuncheckpoint-Inhibitor Therapie gestellt (Schumacher and Thommen) (Sautès-Fridman et al., 2019). In Tumorgewebe von HGSC-Patientinnen konnten TLS nachgewiesen werden, wenn auch in geringem Ausmaß (Lu et al., 2023) bei 16% der Patientinnen (Kasikova et al., 2024). Hier war ein Vorkommen von TLS mit CD8⁺ TILs, jedoch nicht mit dem Ansprechen auf eine Immuncheckpoint-Inhibitor Therapie vergesellschaftet (Kasikova et al., 2024). Lu et al. fanden ein vermehrtes Vorkommen von TLS im C2 Immunreaktiven HGSC-Subtyp; hier konnte auch eine Assoziation mit einem verbesserten Progressionsfreien Intervall gezeigt werden (Lu et al., 2023). In der Arbeit von Lu et al. wurde überdies die Methode der Immunhistochemie aufgewertet, da hier gezeigt werden konnte, dass eine starke CD20 Färbung mit einem Nachweis von TLS mittels Genexpressionsanalyse korrelierte. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere auch CD4⁺ T-Zellen in TLS vorkommen (Cabrita et al., 2020), jedoch wurden in diesem Kontext wenig follikuläre Th Zellen beim HGSC gefunden (Ukita et al., 2022). In einer Untersuchung an NSCLC innerhalb der TLS wies der häufigste Subtyp Th2 Eigenschaften und Treg Eigenschaften auf (Frafjord et al., 2021). Das Vorliegen von TLS innerhalb von Tumorgewebe war mit einem verbesserten PFS korreliert (Lu et al., 2023). An unserem hochwertigen Kollektiv mit multisite Material könnte der Frage nachgegangen werden, ob die TLS heterogen verteilt sind und ob es eine Korrelation mit HLA-DRA sowie TIL-reichen Tumoren gibt.

5 Zusammenfassung

Die Heterogenität der malignen epithelialen Ovarialtumoren zeigt sich sowohl im klinischen Verlauf, mikroskopisch-morphologischen und makroskopischen Aspekt als auch der Tumorgenese. Mit einem genaueren Tumorgeneseverständnis der einzelnen Entitäten epithelialer Ovarialkarzinome (Shih et al., 2021), der Etablierung eines immunhistochemischen Diagnose-Algorithmus (Köbel et al., 2016), der Definition molekularer Subtypen (Tothill et al., 2008), welche das HGSC weiter unterteilen, und der Einführung der PARP-Inhibitoren in die Therapieleitlinien wurden in den letzten Jahren Meilensteine im Verständnis des Ovarialkarzinoms erreicht. Die Mortalität bleibt hoch. Prognostische und prädiktive Marker sind aus therapeutischer Sicht dringend nötig, um die therapieassoziierte Morbidität und Mortalität gegen die chemotherapeutisch „erkaufte“ Lebenszeit abwägen zu können.

Die Immunhistochemie ist eine überall verfügbare Methode, die histopathologisch zuverlässig verortbare molekularpathologische Informationen auf Proteinexpressionsebene generiert und das bei hoher Kosteneffizienz. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind kommerziell erhältlich. Diese Arbeit möchte an einem klinisch und pathologisch nach aktuellem Goldstandard stratifizierten Kollektiv einen klinisch bedeutsamen Beitrag zur Charakterisierung der Entität highgrade seröses Karzinom des Ovars, der Tube oder des Peritoneums leisten:

- Mesothelin exprimierende Tumoren wiesen in unserer Untersuchung tendenziell ein fortgeschrittenes Tumorstadium, weniger TILs und eine ungünstige Prognose auf.
- In unserem Kollektiv war HLA-DRA heterogen auf Tumorzellen exprimiert. Eine starke HLA-DRA-Expression war mit einer günstigen Prognose vergesellschaftet. Dies scheint auch mit einer verbesserten Resektabilität dieser Tumoren assoziiert zu sein (R0-Status). Die HLA-DRA Expression korrelierte nahezu dosislinear mit einer hohen CD4⁺ iTIL-Zahl. Die Subgruppe HLA-DRA-H und hohen CD4⁺ iTIL-Zahl erwies sich als besonders günstig.

- CD4⁺ TILs waren, wenn sie im Tumorepithel nachgewiesen wurden, ein unabhängig günstiger Prognosefaktor. Dieser Zusammenhang wurde auch in anderen Kollektiven gefunden. Im Stroma gelegene TILs waren mit einer optimalen Resektion vergesellschaftet, jedoch nicht unabhängig vom R-Status günstig für die Prognose. In unserem Kollektiv gab es einen starken Zusammenhang zwischen einer hohen sTIL- und iTIL-Zahl und dem Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie. CD4⁺ iTILs haben einen über die verbesserte Operabilität hinausgehenden prognostischen Benefit.

Die zugrundeliegenden Mechanismen müssen weiter untersucht werden und können Ausgangspunkte für neue therapeutische Ansätze sein.

6 Literaturverzeichnis

- ADDISON, E. G., NORTH, J., BAKHSH, I., MARDEN, C., HAQ, S., AL-SARRAJ, S., MALAYERI, R., WICKREMASINGHE, R. G., DAVIES, J. K. & LOWDELL, M. W. 2005. Ligation of CD8 α on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology*, 116, 354-361.
- AHMED, A. & TAIT, S. W. G. 2020. Targeting immunogenic cell death in cancer. *Mol Oncol*, 14, 2994-3006.
- AMRANE, K., LE MEUR, C., BESSE, B., HEMON, P., LE NOAC'H, P., PRADIER, O., BERTHOU, C., ABGRAL, R. & UGUEN, A. 2024. HLA-DR expression in melanoma: from misleading therapeutic target to potential immunotherapy biomarker. *Frontiers in Immunology*, 14.
- ANDERSEN, S. N., ROGNUM, T. O., LUND, E., MELING, G. I. & HAUGE, S. 1993. Strong HLA-DR expression in large bowel carcinomas is associated with good prognosis. *Br J Cancer*, 68, 80-85.
- ANDERSON, M. S., VENANZI, E. S., KLEIN, L., CHEN, Z., BERZINS, S. P., TURLEY, S. J., VON BOEHMER, H., BRONSON, R., DIERICH, A., BENOIST, C. & MATHIS, D. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 298, 1395-1401.
- ARMAN KARAKAYA, Y., ATIGAN, A., GÜLER Ö, T., DEMIRAY, A. G. & BIR, F. 2021. The relation of CD3, CD4, CD8 and PD-1 expression with tumor type and prognosis in epithelial ovarian cancers. *Gineköl Pol*, 92, 344-351.
- AXELROD, M. L., COOK, R. S., JOHNSON, D. B. & BALKO, J. M. 2019. Biological Consequences of MHC-II Expression by Tumor Cells in Cancer. *Clin Cancer Res*, 25, 2392-2402.
- BACHMANN, C. 2023. New Achievements from Molecular Biology and Treatment Options for Refractory/Relapsed Ovarian Cancer—A Systematic Review. *Cancers*, 15, 5356.
- BAYOGLU, I. V., KUCUKZEYBEK, B. B., KUCUKZEYBEK, Y., VAROL, U., YILDIZ, I., ALACACIOGLU, A., AKYOL, M., DEMIR, L., DIRICAN, A., YILDIZ, Y., SALMAN, T. & TARHAN, M. O. 2015. Prognostic value of mesothelin expression in patients with triple negative and HER2-positive breast cancers. *Biomed Pharmacother*, 70, 190-195.
- BERA, T. K. & PASTAN, I. 2000. Mesothelin is not required for normal mouse development or reproduction. *Mol Cell Biol*, 20, 2902-2906.
- BEREK, J. S., KEHOE, S. T., KUMAR, L. & FRIEDLANDER, M. 2018. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 143, 59-78.
- BORST, J., AHRENDT, T., BAŁAŁA, N., MELIEF, C. J. M. & KASTENMÜLLER, W. 2018. CD4(+) T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 18, 635-647.
- BÖSMÜLLER, H., HAITCHI-PETNEHAZY, S., WEBERSINKE, G., MARSCHON, R., ROITHMEIER, F., STUMMVOLL, W., FEHM, T., KLIER-RICHTER, M., BONZHEIM, I., STAEBLER, A. & FEND, F. 2011. Intratumoral lymphocyte density in serous ovarian carcinoma is superior to ERCC1 expression for predicting response to platinum-based therapy. *Virchows Arch*, 459, 183-191.
- BRATTOLI, B., MOSTAFAVI, M., LEE, T., JUNG, W., RYU, J., PARK, S., PARK, J., PEREIRA, S., SHIN, S., CHOI, S., KIM, H., YOO, D., ALI, S. M., PAENG, K., OCK, C.-Y., CHO, S. I. & KIM, S. 2024. A universal immunohistochemistry analyzer for generalizing AI-driven assessment of immunohistochemistry across immunostains and cancer types. *npj Precision Oncology*, 8, 277.
- BROCKER, E. B., SUTER, L. & SORG, C. 1984. HLA-DR antigen expression in primary melanomas of the skin. *J Invest Dermatol*, 82, 244-247.

- BUSTIN, S. A., LI, S. R., PHILLIPS, S. & DORUDI, S. 2001. Expression of HLA class II in colorectal cancer: evidence for enhanced immunogenicity of microsatellite-instability-positive tumours. *Tumour Biol*, 22, 294-298.
- BUYS, S. S., PARTRIDGE, E., BLACK, A., JOHNSON, C. C., LAMERATO, L., ISAACS, C., REDING, D. J., GREENLEE, R. T., YOKOCHI, L. A., KESSEL, B., CRAWFORD, E. D., CHURCH, T. R., ANDRIOLE, G. L., WEISSFELD, J. L., FOUAD, M. N., CHIA, D., O'BRIEN, B., RAGARD, L. R., CLAPP, J. D., RATHMELL, J. M., RILEY, T. L., HARTGE, P., PINSKY, P. F., ZHU, C. S., IZMIRLIAN, G., KRAMER, B. S., MILLER, A. B., XU, J. L., PROROK, P. C., GOHAGAN, J. K. & BERG, C. D. 2011. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *Jama*, 305, 2295-2303.
- CABRITA, R., LAUSS, M., SANNA, A., DONIA, M., SKAARUP LARSEN, M., MITRA, S., JOHANSSON, I., PHUNG, B., HARBST, K., VALLON-CHRISTERSSON, J., VAN SCHOIACK, A., LÖVGREN, K., WARREN, S., JIRSTRÖM, K., OLSSON, H., PIETRAS, K., INGVAR, C., ISAKSSON, K., SCHADENDORF, D., SCHMIDT, H., BASTHOLT, L., CARNEIRO, A., WARGO, J. A., SVANE, I. M. & JÖNSSON, G. 2020. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*, 577, 561-565.
- CACHOT, A., BILOUS, M., LIU, Y. C., LI, X., SAILLARD, M., CENERENTI, M., ROCKINGER, G. A., WYSS, T., GUILLAUME, P., SCHMIDT, J., GENOLET, R., ERCOLANO, G., PROTTI, M. P., REITH, W., IOANNIDOU, K., DE LEVAL, L., TRAPANI, J. A., COUKOS, G., HARARI, A., SPEISER, D. E., MATHIS, A., GFELLER, D., ALTUG, H., ROMERO, P. & JANDUS, C. 2021. Tumor-specific cytolytic CD4 T cells mediate immunity against human cancer. *Sci Adv*, 7.
- CALDON, C. E. & MUSGROVE, E. A. 2010. Distinct and redundant functions of cyclin E1 and cyclin E2 in development and cancer. *Cell Division*, 5.
- CALLAHAN, B. M., TONG, W. L. & BLANCK, G. 2018. T cell receptor-beta J usage, in combination with particular HLA class II alleles, correlates with better cancer survival rates. *Immunol Res*, 66, 219-223.
- CALLAHAN, M. J., NAGYMANYOKI, Z., BONOME, T., JOHNSON, M. E., LITKOUHI, B., SULLIVAN, E. H., HIRSCH, M. S., MATULONIS, U. A., LIU, J., BIRRER, M. J., BERKOWITZ, R. S. & MOK, S. C. 2008. Increased HLA-DMB expression in the tumor epithelium is associated with increased CTL infiltration and improved prognosis in advanced-stage serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 7667-7673.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. 2011. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474, 609-615.
- CHANG, C. H., FONTES, J. D., PETERLIN, M. & FLAVELL, R. A. 1994. Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 1367-1374.
- CHANG, K., PASTAN, I. & WILLINGHAM, M. C. 1992. Isolation and characterization of a monoclonal antibody, K1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium. *Int J Cancer*, 50, 373-381.
- CHANG, M. C., CHEN, C. A., CHEN, P. J., CHIANG, Y. C., CHEN, Y. L., MAO, T. L., LIN, H. W., LIN CHIANG, W. H. & CHENG, W. F. 2012. Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways. *Biochem J*, 442, 293-302.
- CHANG, M. C., CHEN, C. A., HSIEH, C. Y., LEE, C. N., SU, Y. N., HU, Y. H. & CHENG, W. F. 2009. Mesothelin inhibits paclitaxel-induced apoptosis through the PI3K pathway. *Biochem J*, 424, 449-458.
- CHEN, B., KHODADOUST, M. S., LIU, C. L., NEWMAN, A. M. & ALIZADEH, A. A. 2018. Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT. *Methods Mol Biol*, 1711, 243-259.

- COELHO, R., RICARDO, S., AMARAL, A. L., HUANG, Y.-L., NUNES, M., NEVES, J. P., MENDES, N., LÓPEZ, M. N., BARTOSCH, C., FERREIRA, V., PORTUGAL, R., LOPES, J. M., ALMEIDA, R., HEINZELMANN-SCHWARZ, V., JACOB, F. & DAVID, L. 2020. Regulation of invasion and peritoneal dissemination of ovarian cancer by mesothelin manipulation. *Oncogenesis*, 9.
- CONSORTIUM, T. U. 2024. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53, D609-D617.
- COPE, L., WU, R. C., SHIH IE, M. & WANG, T. L. 2013. High level of chromosomal aberration in ovarian cancer genome correlates with poor clinical outcome. *Gynecol Oncol*, 128, 500-505.
- CURIEL, T. J., COUKOS, G., ZOU, L., ALVAREZ, X., CHENG, P., MOTTRAM, P., EVDEMON-HOGAN, M., CONEJO-GARCIA, J. R., ZHANG, L., BUROW, M., ZHU, Y., WEI, S., KRYCZEK, I., DANIEL, B., GORDON, A., MYERS, L., LACKNER, A., DISIS, M. L., KNUTSON, K. L., CHEN, L. & ZOU, W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10, 942-949.
- DAI, S., CRAWFORD, F., MARRACK, P. & KAPPLER, J. W. 2008. The structure of HLA-DR52c: Comparison to other HLA-DRB3 alleles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 11893-11897.
- DE BRUIN, E. C., VAN DE VELDE, C. J. H., VAN KRIEKEN, J. H. J. M., MARIJNEN, C. A. M. & MEDEMA, J. P. 2008. Epithelial Human Leukocyte Antigen-DR Expression Predicts Reduced Recurrence Rates and Prolonged Survival in Rectal Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 14, 1073-1079.
- DEFFRENNES, V., VEDRENNE, J., STOLZENBERG, M. C., PISKURICH, J., BARBIERI, G., TING, J. P., CHARRON, D. & ALCAÏDE-LORIDAN, C. 2001. Constitutive expression of MHC class II genes in melanoma cell lines results from the transcription of class II transactivator abnormally initiated from its B cell-specific promoter. *J Immunol*, 167, 98-106.
- DELEEUW, R. J., KROEGER, D. R., KOST, S. E., CHANG, P.-P., WEBB, J. R. & NELSON, B. H. 2015. CD25 Identifies a Subset of CD4+FoxP3+ TIL That Are Exhausted Yet Prognostically Favorable in Human Ovarian Cancer. *Cancer Immunology Research*, 3, 245-253.
- DENKERT, C., LOIBL, S., NOSKE, A., ROLLER, M., MÜLLER, B. M., KOMOR, M., BUDCZIES, J., DARB-ESFAHANI, S., KRONENWETT, R., HANUSCH, C., VON TÖRNE, C., WEICHERT, W., ENGELS, K., SOLBACH, C., SCHRADER, I., DIETEL, M. & VON MINCKWITZ, G. 2010. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28, 105-113.
- DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF 2024. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 6.0, 2024, AWMF-Registernummer: 032-035OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>; Zugriff am [13.02.2025].
- DONIA, M., ANDERSEN, R., KJELDSSEN, J. W., FAGONE, P., MUNIR, S., NICOLETTI, F., ANDERSEN, M. H., THOR STRATEN, P. & SVANE, I. M. 2015. Aberrant Expression of MHC Class II in Melanoma Attracts Inflammatory Tumor-Specific CD4+ T- Cells, Which Dampen CD8+ T-cell Antitumor Reactivity. *Cancer Res*, 75, 3747-3759.
- DRAGHI, A., PRESTI, M., JENSEN, A. W. P., CHAMBERLAIN, C. A., ALBIERI, B., RASMUSSEN, A.-C. K., ANDERSEN, M. H., CROWTHER, M. D., SVANE, I. M. & DONIA, M. 2023. Uncoupling CD4+ TIL-Mediated Tumor Killing from JAK-Signaling in Melanoma. *Clinical Cancer Research*, 29, 3937-3947.
- DU BOIS, A., REUSS, A., PUJADE-LAURAIN, E., HARTE, P., RAY-COQUARD, I. & PFISTERER, J. 2009. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3

- multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115, 1234-1244.
- DUNNE, M. R., MICHELSSEN, A. J., O'SULLIVAN, K. E., CATHCART, M. C., FEIGHERY, R., DOYLE, B., WATSON, J. A., O'FARRELL, N. J., RAVI, N., KAY, E., REYNOLDS, J. V., RYAN, E. J. & O'SULLIVAN, J. 2017. HLA-DR expression in tumor epithelium is an independent prognostic indicator in esophageal adenocarcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother*, 66, 841-850.
- FORERO, A., LI, Y., CHEN, D., GRIZZLE, W. E., UPDIKE, K. L., MERZ, N. D., DOWNS-KELLY, E., BURWELL, T. C., VAKLAVAS, C., BUCHSBAUM, D. J., MYERS, R. M., LOBUGLIO, A. F. & VARLEY, K. E. 2016. Expression of the MHC Class II Pathway in Triple-Negative Breast Cancer Tumor Cells Is Associated with a Good Prognosis and Infiltrating Lymphocytes. *Cancer Immunol Res*, 4, 390-399.
- FRAFJORD, A., BUER, L., HAMMARSTRÖM, C., AAMODT, H., WOLDBÆK, P. R., BRUSTUGUN, O. T., HELLAND, Å., ØYNEBRÅTEN, I. & CORTHAY, A. 2021. The Immune Landscape of Human Primary Lung Tumors Is Th2 Skewed. *Front Immunol*, 12.
- FRIDMAN, W. H., PAGÈS, F., SAUTÈS-FRIDMAN, C. & GALON, J. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 12, 298-306.
- GAIDA, M. M., WELSCH, T., HERPEL, E., TSCHAHARGANEH, D. F., FISCHER, L., SCHIRMACHER, P., HANSCH, G. M. & BERGMANN, F. 2012. MHC class II expression in pancreatic tumors: a link to intratumoral inflammation. *Virchows Arch*, 460, 47-60.
- GAMZATOVA, Z., VILLABONA, L., VAN DER ZANDEN, H., HAASNOOT, G. W., ANDERSSON, E., KIESSLING, R., SELIGER, B., KANTER, L., DALIANIS, T., BERGFELDT, K. & MASUCCI, G. V. 2007. Analysis of HLA class I-II haplotype frequency and segregation in a cohort of patients with advanced stage ovarian cancer. *Tissue Antigens*, 70, 205-213.
- GARRIDO, F., ALGARRA, I. & GARCÍA-LORA, A. M. 2010. The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions. *Cancer Immunol Immunother*, 59, 1601-1606.
- GIBBINGS, D. J., MARCET-PALACIOS, M., SEKAR, Y., NG, M. C. Y. & BEFUS, A. D. 2007. CD8α is expressed by human monocytes and enhances FcγR-dependent responses. *BMC Immunology*, 8.
- GODET, Y., FABRE, E., DOSSET, M., LAMURAGLIA, M., LEVIONNOIS, E., RAVEL, P., BENHAMOUDA, N., CAZES, A., LE PIMPEC-BARTHES, F., GAUGLER, B., LANGLADE-DEMOYEN, P., PIVOT, X., SAAS, P., MAILLÈRE, B., TARTOUR, E., BORG, C. & ADOTÉVI, O. 2012. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. *Clin Cancer Res*, 18, 2943-2953.
- GOODE, E. L., BLOCK, M. S., KALLI, K. R., VIERKANT, R. A., CHEN, W., FOGARTY, Z. C., GENTRY-MAHARAJ, A., TOLOCZKO, A., HEIN, A., BOULIGNY, A. L., JENSEN, A., OSORIO, A., HARTKOPF, A., RYAN, A., CHUDECKA-GLAZ, A., MAGLIOCCO, A. M., HARTMANN, A., JUNG, A. Y., GAO, B., HERNANDEZ, B. Y., FRIDLEY, B. L., MCCAULEY, B. M., KENNEDY, C. J., WANG, C., KARPINSKYJ, C., DE SOUSA, C. B., TIEZZI, D. G., WACHTER, D. L., HERPEL, E., TARAN, F. A., MODUGNO, F., NELSON, G., LUBINSKI, J., MENKISZAK, J., ALSOP, J., LESTER, J., GARCIA-DONAS, J., NATION, J., HUNG, J., PALACIOS, J., ROTHSTEIN, J. H., KELLEY, J. L., DE ANDRADE, J. M., ROBLES-DIAZ, L., INTERMAGGIO, M. P., WIDSCHWENDTER, M., BECKMANN, M. W., RUEBNER, M., JIMENEZ-LINAN, M., SINGH, N., OSZUREK, O., HARNETT, P. R., RAMBAU, P. F., SINN, P., WAGNER, P., GHATAGE, P., SHARMA, R., EDWARDS, R. P., NESS, R. B., ORSULIC, S., BRUCKER, S. Y., JOHNNATTY, S. E., LONGACRE, T. A., URSULA, E., MCGUIRE, V., SIEH, W., NATANZON, Y., LI, Z., WHITTEMORE, A. S., ANNA, A., STAEBLER, A., KARLAN, B. Y., GILKS, B., BOWTELL, D. D.,

- HOGDALL, E., CANDIDO DOS REIS, F. J., STEED, H., CAMPBELL, I. G., GRONWALD, J., BENITEZ, J., KOZIAK, J. M., CHANG-CLAUDE, J., MOYSICH, K. B., KELEMEN, L. E., COOK, L. S., GOODMAN, M. T., GARCIA, M. J., FASCHING, P. A., KOMMOSS, S., DEEN, S., KJAER, S. K., MENON, U., BRENTON, J. D., PHAROAH, P. D. P., CHENEVIX-TRENCH, G., HUNTSMAN, D. G., WINHAM, S. J., KOBEL, M. & RAMUS, S. J. 2017. Dose-Response Association of CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Survival Time in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *JAMA Oncol*, 3, e173290.
- HAMANISHI, J., MANDAI, M., ABIKO, K., MATSUMURA, N., BABA, T., YOSHIOKA, Y., KOSAKA, K. & KONISHI, I. 2011. The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors. *Clin Immunol*, 141, 338-347.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, ROBERT A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 646-674.
- HANAOKA, T., HASEGAWA, K., KATO, T., SATO, S., KUROSAKI, A., MIYARA, A., NAGAO, S., SEKI, H., YASUDA, M. & FUJIWARA, K. 2017. Correlation Between Tumor Mesothelin Expression and Serum Mesothelin in Patients with Epithelial Ovarian Carcinoma: A Potential Noninvasive Biomarker for Mesothelin-targeted Therapy. *Mol Diagn Ther*, 21, 187-198.
- HASSAN, R., BERA, T. & PASTAN, I. 2004. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 10, 3937-3942.
- HASSAN, R., BLUMENSCHN, G. R., JR., MOORE, K. N., SANTIN, A. D., KINDLER, H. L., NEMUNAITIS, J. J., SEWARD, S. M., THOMAS, A., KIM, S. K., RAJAGOPALAN, P., WALTER, A. O., LAURENT, D., CHILDS, B. H., SARAPA, N., ELBI, C. & BENDELL, J. C. 2020. First-in-Human, Multicenter, Phase I Dose-Escalation and Expansion Study of Anti-Mesothelin Antibody-Drug Conjugate Anetumab Ravtansine in Advanced or Metastatic Solid Tumors. *J Clin Oncol*, Jco1902085.
- HASSAN, R., THOMAS, A., ALEWINE, C., LE, D. T., JAFFEE, E. M. & PASTAN, I. 2016. Mesothelin Immunotherapy for Cancer: Ready for Prime Time? *J Clin Oncol*, 34, 4171-4179.
- HAVASI, A., CAINAP, S. S., HAVASI, A. T. & CAINAP, C. 2023. Ovarian Cancer-Insights into Platinum Resistance and Overcoming It. *Medicina*, 59 (3).
- HENDRY, S., SALGADO, R., GEVAERT, T., RUSSELL, P. A., JOHN, T., THAPA, B., CHRISTIE, M., VAN DE VIJVER, K., ESTRADA, M. V., GONZALEZ-ERICSSON, P. I., SANDERS, M., SOLOMON, B., SOLINAS, C., VAN DEN EYNDEN, G. G. G. M., ALLORY, Y., PREUSSER, M., HAINFELLNER, J., PRUNERI, G., VINGIANI, A., DEMARIA, S., SYMMANS, F., NUCIFORO, P., COMERMA, L., THOMPSON, E. A., LAKHANI, S., KIM, S.-R., SCHNITT, S., COLPAERT, C., SOTIRIOU, C., SCHERER, S. J., IGNATIADIS, M., BADVE, S., PIERCE, R. H., VIALE, G., SIRTAIN, N., PENAULT-LLORCA, F., SUGIE, T., FINEBERG, S., PAIK, S., SRINIVASAN, A., RICHARDSON, A., WANG, Y., CHMIELIK, E., BROCK, J., JOHNSON, D. B., BALKO, J., WIENERT, S., BOSSUYT, V., MICHIELS, S., TERNES, N., BURCHARDI, N., LUEN, S. J., SAVAS, P., KLAUSCHEN, F., WATSON, P. H., NELSON, B. H., CRISCITIELLO, C., O'TOOLE, S., LARSIMONT, D., DE WIND, R., CURIGLIANO, G., ANDRÉ, F., LACROIX-TRIKI, M., VAN DE VIJVER, M., ROJO, F., FLORIS, G., BEDRI, S., SPARANO, J., RIMM, D., NIELSEN, T., KOS, Z., HEWITT, S., SINGH, B., FARSHID, G., LOIBL, S., ALLISON, K. H., TUNG, N., ADAMS, S., WILLARD-GALLO, K., HORLINGS, H. M., GANDHI, L., MOREIRA, A., HIRSCH, F., DIECI, M. V., URBANOWICZ, M., BRCIC, I., KORSKI, K., GAIRE, F., KOEPPEN, H., LO, A., GILTANNE, J., REBELATTO, M. C., STEELE, K. E., ZHA, J., EMANCIPATOR, K., JUCO, J. W., DENKERT, C., REIS-FILHO, J., LOI, S. & FOX, S. B. 2017. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous

- Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Advances in Anatomic Pathology*, 24.
- HENG, Y., ZHU, X., WU, Q., LIN, H., DING, X., TAO, L. & LU, L. 2023. High Expression of Tumor HLA-DR Predicts Better Prognosis and Response to Anti-PD-1 Therapy in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Translational Oncology*, 33, 101678.
- HILLIARD, T. S. 2018. The Impact of Mesothelin in the Ovarian Cancer Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*, 10.
- HILLIARD, T. S., KOWALSKI, B., IWAMOTO, K., AGADI, E. A., LIU, Y., YANG, J., ASEM, M., KLYMENKO, Y., JOHNSON, J., SHI, Z., MARFOWAA, G., YEMC, M. G., PETRASKO, P. & STACK, M. S. 2021. Host Mesothelin Expression Increases Ovarian Cancer Metastasis in the Peritoneal Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 22.
- HUANG, C. Y., CHENG, W. F., LEE, C. N., SU, Y. N., CHIEN, S. C., TZENG, Y. L., HSIEH, C. Y. & CHEN, C. A. 2006. Serum mesothelin in epithelial ovarian carcinoma: a new screening marker and prognostic factor. *Anticancer Res*, 26, 4721-4728.
- HUDRY, D., LE GUELLEC, S., MEIGNAN, S., BÉCOURT, S., PASQUESOONE, C., EL HAJJ, H., MARTÍNEZ-GÓMEZ, C., LEBLANC, É., NARDUCCI, F. & LADOIRE, S. 2022. Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Epithelial Ovarian Cancer: Heterogeneity, Prognostic Impact, and Relationship with Immune Checkpoints. *Cancers (Basel)*, 14.
- HWANG, W. T., ADAMS, S. F., TAHIROVIC, E., HAGEMANN, I. S. & COUKOS, G. 2012. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*, 124, 192-198.
- INOUE, S., TSUNODA, T., RIKU, M., ITO, H., INOKO, A., MURAKAMI, H., EBI, M., OGASAWARA, N., PASTAN, I., KASUGAI, K., KASAI, K., IKEDA, H. & INAGUMA, S. 2020. Diffuse mesothelin expression leads to worse prognosis through enhanced cellular proliferation in colorectal cancer. *Oncol Lett*, 19, 1741-1750.
- JOHNSON, D. B., ESTRADA, M. V., SALGADO, R., SANCHEZ, V., DOXIE, D. B., OPALENIK, S. R., VILGELM, A. E., FELD, E., JOHNSON, A. S., GREENPLATE, A. R., SANDERS, M. E., LOVLY, C. M., FREDERICK, D. T., KELLEY, M. C., RICHMOND, A., IRISH, J. M., SHYR, Y., SULLIVAN, R. J., PUZANOV, I., SOSMAN, J. A. & BALKO, J. M. 2016. Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Nat Commun*, 7, 10582.
- KACHALA, S. S., BOGRAD, A. J., VILLENA-VARGAS, J., SUZUKI, K., SERVAIS, E. L., KADOTA, K., CHOU, J., SIMA, C. S., VERTES, E., RUSCH, V. W., TRAVIS, W. D., SADELAIN, M. & ADUSUMILLI, P. S. 2014. Mesothelin overexpression is a marker of tumor aggressiveness and is associated with reduced recurrence-free and overall survival in early-stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 20, 1020-1028.
- KANG, E. Y., WEIR, A., MEAGHER, N. S., FARRINGTON, K., NELSON, G. S., GHATAGE, P., LEE, C. H., RIGGAN, M. J., BOLITHON, A., POPOVIC, G., LEUNG, B., TANG, K., LAMBIE, N., MILLSTEIN, J., ALSOP, J., ANGLESIO, M. S., ATASEVEN, B., BARLOW, E., BECKMANN, M. W., BERGER, J., BISINOTTO, C., BÖSMÜLLER, H., BOROS, J., BRAND, A. H., BROOKS-WILSON, A., BRUCKER, S. Y., CARNEY, M. E., CASABLANCA, Y., CAZORLA-JIMÉNEZ, A., COHEN, P. A., CONRADS, T. P., COOK, L. S., COULSON, P., COURTNEY-BROOKS, M., CRAMER, D. W., CROWE, P., CUNNINGHAM, J. M., CYBULSKI, C., DARCY, K. M., EL-BAHRAWY, M. A., ELISHAEV, E., ERBER, R., FARRELL, R., FEREDAY, S., FISCHER, A., GARCÍA, M. J., GAYTHER, S. A., GENTRY-MAHARAJ, A., GILKS, C. B., GRUBE, M., HARNETT, P. R., HARRINGTON, S. P., HARTE, P., HARTMANN, A., HECHT, J. L., HEIKAUS, S., HEIN, A., HEITZ, F., HENDLEY, J., HERNANDEZ, B. Y., POLO, S. H., HEUBLEIN, S., HIRASAWA, A., HØGDALL, E., HØGDALL, C. K., HORLINGS, H. M., HUNTSMAN, D. G., HUZARSKI, T., JEWELL, A., JIMENEZ-LINAN, M., JONES, M. E., KAUFMANN, S. H., KENNEDY, C. J., KHABELE, D., KOMMOSS, F. K. F., KRUITWAGEN, R.,

- LAMBRECHTS, D., LE, N. D., LENER, M., LESTER, J., LEUNG, Y., LINDER, A., LOVERIX, L., LUBIŃSKI, J., MADAN, R., MAXWELL, G. L., MODUGNO, F., NEUHAUSEN, S. L., OLAWAIYE, A., OLBRECHT, S., ORSULIC, S., PALACIOS, J., PEARCE, C. L., PIKE, M. C., QUINN, C. M., MOHAN, G. R., RODRÍGUEZ-ANTONA, C., RUEBNER, M., RYAN, A., SALFINGER, S. G., et al. 2023. CCNE1 and survival of patients with tubo-ovarian high-grade serous carcinoma: An Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *Cancer*, 129, 697-713.
- KASIKOVA, L., RAKOVA, J., HENSLER, M., LANICKOVA, T., TOMANKOVA, J., PASULKA, J., DROZENOVA, J., MOJZISOVA, K., FIALOVA, A., VOSAHLIKOVA, S., LACO, J., RYSKA, A., DUNDR, P., KOCIAN, R., BRTNICKY, T., SKAPA, P., CAPKOVA, L., KOVAR, M., PROCHAZKA, J., PRAZNOVEC, I., KOBLIZEK, V., TASKOVA, A., TANAKA, H., LISCHKE, R., MENDEZ, F. C., VACHTENHEIM, J., HEINZELMANN-SCHWARZ, V., JACOB, F., MCNEISH, I. A., HALASKA, M. J., ROB, L., CIBULA, D., ORSULIC, S., GALLUZZI, L., SPISEK, R. & FUCIKOVA, J. 2024. Tertiary lymphoid structures and B cells determine clinically relevant T cell phenotypes in ovarian cancer. *Nature Communications*, 15, 2528.
- KAWAMATA, F., HOMMA, S., KAMACHI, H., EINAMA, T., KATO, Y., TSUDA, M., TANAKA, S., MAEDA, M., KAJINO, K., HINO, O., TAKAHASHI, N., KAMIYAMA, T., NISHIHARA, H., TAKETOMI, A. & TODO, S. 2014. C-ERC/mesothelin provokes lymphatic invasion of colorectal adenocarcinoma. *J Gastroenterol*, 49, 81-92.
- KENNEDY, R. & CELIS, E. 2008. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev*, 222, 129-144.
- KINDELBERGER, D. W., LEE, Y., MIRON, A., HIRSCH, M. S., FELTMATE, C., MEDEIROS, F., CALLAHAN, M. J., GARNER, E. O., GORDON, R. W., BIRCH, C., BERKOWITZ, R. S., MUTO, M. G. & CRUM, C. P. 2007. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol*, 31, 161-169.
- KINER, E., WILLIE, E., VIJAYKUMAR, B., CHOWDHARY, K., SCHMUTZ, H., CHANDLER, J., SCHNELL, A., THAKORE, P. I., LEGROS, G., MOSTAFAVI, S., MATHIS, D. & BENOIST, C. 2021. Gut CD4(+) T cell phenotypes are a continuum molded by microbes, not by T(H) archetypes. *Nat Immunol*, 22, 216-228.
- KOBAYASHI, H., YAMADA, Y., SADO, T., SAKATA, M., YOSHIDA, S., KAWAGUCHI, R., KANAYAMA, S., SHIGETOMI, H., HARUTA, S., TSUJI, Y., UEDA, S. & KITANAKA, T. 2008. A randomized study of screening for ovarian cancer: a multicenter study in Japan. *Int J Gynecol Cancer*, 18, 414-420.
- KÖBEL, M., RAHIMI, K., RAMBAU, P. F., NAUGLER, C., LE PAGE, C., MEUNIER, L., DE LADURANTAYE, M., LEE, S., LEUNG, S., GOODE, E. L., RAMUS, S. J., CARLSON, J. W., LI, X., EWANOWICH, C. A., KELEMEN, L. E., VANDERHYDEN, B., PROVENCHER, D., HUNTSMAN, D., LEE, C.-H., GILKS, C. B. & MES MASSON, A.-M. 2016. An Immunohistochemical Algorithm for Ovarian Carcinoma Typing. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 35, 430-441.
- KOJIMA, T., OH-EDA, M., HATTORI, K., TANIGUCHI, Y., TAMURA, M., OCHI, N. & YAMAGUCHI, N. 1995. Molecular cloning and expression of megakaryocyte potentiating factor cDNA. *J Biol Chem*, 270, 21984-21990.
- KOMMOSS, S., WINTERHOFF, B., OBERG, A. L., KONECNY, G. E., WANG, C., RISK, S. M., FAN, J.-B., MAURER, M. J., APRIL, C., SHRIDHAR, V., KOMMOSS, F., DU BOIS, A., HILPERT, F., MAHNER, S., BAUMANN, K., SCHROEDER, W., BURGESS, A., CANZLER, U., CHIEN, J., EMBLETON, A. C., PARMAR, M., KAPLAN, R., PERREN, T., HARTMANN, L. C., GOODE, E. L., DOWDY, S. C. & PFISTERER, J. 2017. Bevacizumab May Differentially Improve Ovarian Cancer Outcome in Patients with Proliferative and Mesenchymal Molecular

- Subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23, 3794-3801.
- KONECNY, G. E., WANG, C., HAMIDI, H., WINTERHOFF, B., KALLI, K. R., DERING, J., GINTHER, C., CHEN, H.-W., DOWDY, S., CLIBY, W., GOSTOUT, B., PODRATZ, K. C., KEENEY, G., WANG, H.-J., HARTMANN, L. C., SLAMON, D. J. & GOODE, E. L. 2014. Prognostic and Therapeutic Relevance of Molecular Subtypes in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 106.
- KRYCZEK, I., BANERJEE, M., CHENG, P., VATAN, L., SZELIGA, W., WEI, S., HUANG, E., FINLAYSON, E., SIMEONE, D., WELLING, T. H., CHANG, A., COUKOS, G., LIU, R. & ZOU, W. 2009. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*, 114, 1141-1149.
- KURMAN, R. J. 2019. *Blaustein's pathology of the female genital tract*, New York, NY, Springer Berlin Heidelberg.
- KURMAN, R. J., HEDRICK ELLENSON, L. & RONNETT, B. M. 2019. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*.
- KURMAN, R. J. & SHIH IE, M. 2016. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol*, 186, 733-747.
- LAU, T. S., CHAN, L. K. Y., MAN, G. C. W., WONG, C. H., LEE, J. H. S., YIM, S. F., CHEUNG, T. H., MCNEISH, I. A. & KWONG, J. 2020. Paclitaxel Induces Immunogenic Cell Death in Ovarian Cancer via TLR4/IKK2/SNARE-Dependent Exocytosis. *Cancer Immunology Research*, 8, 1099-1111.
- LE PAGE, C., MARINEAU, A., BONZA, P. K., RAHIMI, K., CYR, L., LABOUBA, I., MADORE, J., DELVOYE, N., MES-MASSON, A. M., PROVENCHER, D. M. & CAILHIER, J. F. 2012. BTN3A2 expression in epithelial ovarian cancer is associated with higher tumor infiltrating T cells and a better prognosis. *PLoS One*, 7, e38541.
- LINZ, V. C., LÖWE, A., VAN DER VEN, J., HASENBURG, A. & BATTISTA, M. J. 2022. Incidence of pelvic high-grade serous carcinoma after isolated STIC diagnosis: A systematic review of the literature. *Front Oncol*, 12, 951292.
- LØVIG, T., ANDERSEN, S. N., THORSTENSEN, L., DIEP, C. B., MELING, G. I., LOTHE, R. A. & ROGNUM, T. O. 2002. Strong HLA-DR expression in microsatellite stable carcinomas of the large bowel is associated with good prognosis. *Br J Cancer*, 87, 756-762.
- LU, H., LOU, H., WENGERT, G., PAUDEL, R., PATEL, N., DESAI, S., CRUM, B., LINTON-REID, K., CHEN, M., LI, D., IP, J., MAURI, F., PINATO, D. J., ROCKALL, A., COPLEY, S. J., GHAEM-MAGHAM, S. & ABOAGYE, E. O. 2023. Tumor and local lymphoid tissue interaction determines prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Cell Reports Medicine*, 4.
- MALLA, M., KUMAR DESHKMUKH, S., WU, S., SAMEC, T., OLEVIAN, D., NAILI, R., BASSEL, E. R., XIU, J., FARRELL, A., LENZ, H. J., LOU, E., GOEL, S., SPETZLER, D., GOLDBERG, R. M. & HAZLEHURST, L. 2023. Mesothelin expression correlates with elevated inhibitory immune activity in patients with colorectal cancer. *Res Sq*.
- MANLEY, S., MUCCI, N. R., DE MARZO, A. M. & RUBIN, M. A. 2001. Relational Database Structure to Manage High-Density Tissue Microarray Data and Images for Pathology Studies Focusing on Clinical Outcome: The Prostate Specialized Program of Research Excellence Model. *The American Journal of Pathology*, 159, 837-843.
- MARTINS, I., SYLLA, K., DESHAYES, F., LAURIOL, J., GHISLIN, S., DIEU-NOSJEAN, M.-C., VIGUIER, M., VEROLA, O., CHARRON, D., ALCAIDE-LORIDAN, C. & AL-DACCAK, R. 2009. Coexpression of major histocompatibility complex class II with chemokines and nuclear NFκB p50 in melanoma: a rationale for their association with poor prognosis. *Melanoma Research*, 19.
- MATSUSHITA, K., TAKENOUCHI, T., SHIMADA, H., TOMONAGA, T., HAYASHI, H., SHIOYA, A., KOMATSU, A., MATSUBARA, H. & OCHIAi, T. 2006. Strong HLA-DR antigen expression

- on cancer cells relates to better prognosis of colorectal cancer patients: Possible involvement of c-myc suppression by interferon-gamma in situ. *Cancer Sci*, 97, 57-63.
- MENON, U., GENTRY-MAHARAJ, A., BURNELL, M., RYAN, A., SINGH, N., MANCHANDA, R., KALSI, J. K., WOOLAS, R., ARORA, R., CASEY, L., DAWNAY, A., SHARMA, A., WILLIAMSON, K., APOSTOLIDOU, S., FALLOWFIELD, L., MCGUIRE, A. J., CAMPBELL, S., SKATES, S. J., JACOBS, I. J. & PARMAR, M. K. B. 2023. Tumour stage, treatment, and survival of women with high-grade serous tubo-ovarian cancer in UKCTOCS: an exploratory analysis of a randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*, 24, 1018-1028.
- MENON, U., GENTRY-MAHARAJ, A., HALLETT, R., RYAN, A., BURNELL, M., SHARMA, A., LEWIS, S., DAVIES, S., PHILPOTT, S., LOPES, A., GODFREY, K., ORAM, D., HEROD, J., WILLIAMSON, K., SEIF, M. W., SCOTT, I., MOULD, T., WOOLAS, R., MURDOCH, J., DOBBS, S., AMSO, N. N., LEESON, S., CRUICKSHANK, D., MCGUIRE, A., CAMPBELL, S., FALLOWFIELD, L., SINGH, N., DAWNAY, A., SKATES, S. J., PARMAR, M. & JACOBS, I. 2009. Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Lancet Oncol*, 10, 327-340.
- MERAZ, M. A., WHITE, J. M., SHEEHAN, K. C., BACH, E. A., RODIG, S. J., DIGHE, A. S., KAPLAN, D. H., RILEY, J. K., GREENLUND, A. C., CAMPBELL, D., CARVER-MOORE, K., DUBOIS, R. N., CLARK, R., AGUET, M. & SCHREIBER, R. D. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84, 431-42.
- MILLAR, D. G., YANG, S. Y. C., SAYAD, A., ZHAO, Q., NGUYEN, L. T., WARNER, K., SANGSTER, A. G., NAKATSUGAWA, M., MURATA, K., WANG, B. X., SHAW, P., CLARKE, B., BERNARDINI, M. Q., PUGH, T., THIBAUT, P., HIRANO, N., PERREAULT, C. & OHASHI, P. S. 2023. Identification of antigenic epitopes recognized by tumor infiltrating lymphocytes in high grade serous ovarian cancer by multi-omics profiling of the auto-antigen repertoire. *Cancer Immunol Immunother*, 72, 2375-2392.
- MUHELETHALER-MOTTET, A., DI BERARDINO, W., OTTEN, L. A. & MACH, B. 1998. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity*, 8, 157-166.
- MURPHY, K. & WEAVER, C. 2016. *Janeway's immunobiology*, New York, NY, Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC.
- NAHM, C. B., TURCHINI, J., JAMIESON, N., MOON, E., SIOSON, L., ITCHINS, M., ARENA, J., COLVIN, E., HOWELL, V. M., PAVLAKIS, N., CLARKE, S., SAMRA, J. S., GILL, A. J. & MITTAL, A. 2019. Biomarker panel predicts survival after resection in pancreatic ductal adenocarcinoma: A multi-institutional cohort study. *Eur J Surg Oncol*, 45, 218-224.
- NAKAMURA, M., BAX, H. J., SCOTTO, D., SOURI, E. A., SOLLIE, S., HARRIS, R. J., HAMMAR, N., WALLDIUS, G., WINSHIP, A., GHOSH, S., MONTES, A., SPICER, J. F., VAN HEMELRIJCK, M., JOSEPHS, D. H., LACY, K. E., TSOKA, S. & KARAGIANNIS, S. N. 2019. Immune mediator expression signatures are associated with improved outcome in ovarian carcinoma. *Oncol Immunology*, 8, e1593811.
- NELSON, B. H., HAMILTON, P., PHUNG, M. T., MILNE, K., HARRIS, B., THORNTON, S., STEVENS, D., KALARIA, S., SINGH, K., LAUMONT, C. M., MOSS, E., ALIMUJIANG, A., MEAGHER, N. S., BOLITHON, A., FEREDAY, S., KENNEDY, C. J., HENDLEY, J., ARIYARATNE, D., ALSOP, K., TRAFICANTE, N., GOODE, E. L., KARNEZIS, A., SHEN, H., RICHARDSON, J., MCKINNONDEURLOO, C., CHASE, A., GROUT, B., DOHERTY, J. A., HARRIS, H. R., CUSHING-HAUGEN, K. L., ANGLESIO, M., HEINZE, K., HUNTSMAN, D., TALHOUK, A., HANLEY, G. E., ALSOP, J., JIMENEZ-LINAN, M., PHAROAH, P. D. P., BOROS, J., BRAND, A.

- H., HARNETT, P. R., SHARMA, R., HECHT, J. L., SASAMOTO, N., TERRY, K. L., KARLAN, B., LESTER, J., CARNEY, M. E., GOODMAN, M. T., HERNANDEZ, B. Y., WILKENS, L. R., BEHRENS, S., TURZANSKI FORTNER, R., FASCHING, P. A., BISINOTTO, C., CANDIDO DOS REIS, F. J., GHATAGE, P., KÖBEL, M., ELISHAEV, E., MODUGNO, F., COOK, L., LE, N., GENTRY-MAHARAJ, A., MENON, U., GARCÍA, M. J., RODRIGUEZ-ANTONA, C., FARRINGTON, K., KELEMEN, L. E., KOMMOSS, S., STAEBLER, A., GARSE, D. W., BRENTON, J. D., PISKORZ, A. M., BOWTELL, D. D. L., DEFAZIO, A., RAMUS, S. J., PIKE, M. C. & PEARCE, C. L. 2024. Immunological and molecular features of the tumor microenvironment of long-term survivors of ovarian cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 134.
- NEUDECK, N. M. 2023. *Expression von PD-L1 und Indoleamine 2,3-dioxygenase in high-grade serösen Ovarialkarzinomen*. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- O'LEARY, N. A., WRIGHT, M. W., BRISTER, J. R., CIUFO, S., HADDAD, D., MCVEIGH, R., RAJPUT, B., ROBERTSE, B., SMITH-WHITE, B., AKO-ADJEI, D., ASTASHYN, A., BADRETDIN, A., BAO, Y., BLINKOVA, O., BROVER, V., CHETVERNIN, V., CHOI, J., COX, E., ERMOLAEVA, O., FARRELL, C. M., GOLDFARB, T., GUPTA, T., HAFT, D., HATCHER, E., HLAVINA, W., JOARDAR, V. S., KODALI, V. K., LI, W., MAGLOTT, D., MASTERSON, P., MCGARVEY, K. M., MURPHY, M. R., O'NEILL, K., PUJAR, S., RANGWALA, S. H., RAUSCH, D., RIDDICK, L. D., SCHOCH, C., SHKEDA, A., STORZ, S. S., SUN, H., THIBAUD-NISSEN, F., TOLSTOY, I., TULLY, R. E., VATSAN, A. R., WALLIN, C., WEBB, D., WU, W., LANDRUM, M. J., KIMCHI, A., TATUSOVA, T., DICUCCIO, M., KITTS, P., MURPHY, T. D. & PRUITT, K. D. 2016. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res*, 44, D733-D745.
- OH, D. Y. & FONG, L. 2021. Cytotoxic CD4(+) T cells in cancer: Expanding the immune effector toolbox. *Immunity*, 54, 2701-2711.
- OH, D. Y., KWEK, S. S., RAJU, S. S., LI, T., MCCARTHY, E., CHOW, E., ARAN, D., ILANO, A., PAI, C.-C. S., RANCAN, C., ALLAIRE, K., BURRA, A., SUN, Y., SPITZER, M. H., MANGUL, S., PORTEN, S., MENG, M. V., FRIEDLANDER, T. W., YE, C. J. & FONG, L. 2020. Intratumoral CD4⁺ T Cells Mediate Anti-tumor Cytotoxicity in Human Bladder Cancer. *Cell*, 181, 1612-1625.e13.
- OLIVEIRA, G., STROMHAUG, K., CIERI, N., IORGULESCU, J. B., KLAEGER, S., WOLFF, J. O., RACHIMI, S., CHEA, V., KRAUSE, K., FREEMAN, S. S., ZHANG, W., LI, S., BRAUN, D. A., NEUBERG, D., CARR, S. A., LIVAK, K. J., FREDERICK, D. T., FRITSCH, E. F., WIND-ROTOLO, M., HACHEN, N., SADE-FELDMAN, M., YOON, C. H., KESKIN, D. B., OTT, P. A., RODIG, S. J., BOLAND, G. M. & WU, C. J. 2022. Landscape of helper and regulatory antitumour CD4(+) T cells in melanoma. *Nature*, 605, 532-538.
- OSTMEIER, H., FUCHS, B., OTTO, F., MAWICK, R., LIPPOLD, A., KRIEG, V. & SUTER, L. 2001. Prognostic immunohistochemical markers of primary human melanomas. *Br J Dermatol*, 145, 203-209.
- PINTO, M. P., BALMACEDA, C., BRAVO, M. L., KATO, S., VILLARROEL, A., OWEN, G. I., ROA, J. C., CUELLO, M. A. & IBANEZ, C. 2018a. Patient inflammatory status and CD4+/CD8+ intraepithelial tumor lymphocyte infiltration are predictors of outcomes in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 151, 10-17.
- PINTO, M. P., BALMACEDA, C., BRAVO, M. L., KATO, S., VILLARROEL, A., OWEN, G. I., ROA, J. C., CUELLO, M. A. & IBÁÑEZ, C. 2018b. Patient inflammatory status and CD4+/CD8+ intraepithelial tumor lymphocyte infiltration are predictors of outcomes in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 151, 10-17.
- PISKURICH, J. F., LINHOFF, M. W., WANG, Y. & TING, J. P. 1999. Two distinct gamma interferon-inducible promoters of the major histocompatibility complex class II transactivator

- gene are differentially regulated by STAT1, interferon regulatory factor 1, and transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol*, 19, 431-440.
- QUANZ, M., HAGEMANN, U. B., ZITZMANN-KOLBE, S., STELTE-LUDWIG, B., GOLFIER, S., ELBI, C., MUMBERG, D., ZIEGELBAUER, K. & SCHATZ, C. A. 2018. Anetumab ravtansine inhibits tumor growth and shows additive effect in combination with targeted agents and chemotherapy in mesothelin-expressing human ovarian cancer models. *Oncotarget*, 9, 34103-34121.
- RAMMENSEE, H.-G., WEINSCHENK, T., GOUTTEFANGEAS, C. & STEVANOVI EQ, S. 2002. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunological Reviews*, 188, 164-176.
- RANGEL, L. B., AGARWAL, R., SHERMAN-BAUST, C. A., MELLO-COELHO, V., PIZER, E. S., JI, H., TAUB, D. D. & MORIN, P. J. 2004. Anomalous expression of the HLA-DR alpha and beta chains in ovarian and other cancers. *Cancer Biol Ther*, 3, 1021-1027.
- REID, B. M., PERMUTH, J. B. & SELLERS, T. A. 2017. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*, 14, 9-32.
- ROCHE Bluing Reagent Datasheet. Arizona, USA.
- ROSA, F. M. & FELLOUS, M. 1988. Regulation of HLA-DR gene by IFN-gamma. Transcriptional and post-transcriptional control. *J Immunol*, 140, 1660-1664.
- RUMP, A., MORIKAWA, Y., TANAKA, M., MINAMI, S., UMESAKI, N., TAKEUCHI, M. & MIYAJIMA, A. 2004. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem*, 279, 9190-9198.
- RUTERBUSCH, M., PRUNER, K. B., SHEHATA, L. & PEPPER, M. 2020. In Vivo CD4+ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annual Review of Immunology*, 38, 705-725.
- SANTIN, A. D., VERGOTE, I., GONZÁLEZ-MARTÍN, A., MOORE, K., OAKNIN, A., ROMERO, I., DIAB, S., COPELAND, L. J., MONK, B. J., COLEMAN, R. L., HERZOG, T. J., SIEGEL, J., KASTEN, L., SCHLICKER, A., SCHULZ, A., KÖCHERT, K., WALTER, A. O., CHILDS, B. H., ELBI, C. & BULAT, I. 2023. Safety and activity of anti-mesothelin antibody-drug conjugate anetumab ravtansine in combination with pegylated-liposomal doxorubicin in platinum-resistant ovarian cancer: multicenter, phase Ib dose escalation and expansion study. *Int J Gynecol Cancer*, 33, 562-570.
- SANTOIEEMMA, P. P. & POWELL, D. J., JR. 2015. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*, 16, 807-820.
- SAPEDE, C., GAUVRIT, A., BARBIEUX, I., PADIEU, M., CELLERIN, L., SAGAN, C., SCHERPEREEL, A., DABOUIS, G. & GREGOIRE, M. 2008. Aberrant splicing and protease involvement in mesothelin release from epithelioid mesothelioma cells. *Cancer Sci*, 99, 590-594.
- SATO, E., OLSON, S. H., AHN, J., BUNDY, B., NISHIKAWA, H., QIAN, F., JUNGBLUTH, A. A., FROSINA, D., GNJATIC, S., AMBROSONE, C., KEPNER, J., ODUNSI, T., RITTER, G., LELE, S., CHEN, Y.-T., OHTANI, H., OLD, L. J. & ODUNSI, K. 2005. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 18538-18543.
- SAUTÈS-FRIDMAN, C., PETITPREZ, F., CALDERARO, J. & FRIDMAN, W. H. 2019. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 19, 307-325.
- SCHUMACHER, T. N. & THOMMEN, D. S. Tertiary lymphoid structures in cancer. *Science*, 375, eabf9419.
- SCHUSTER, H., PEPPER, J. K., BOSMULLER, H. C., ROHLE, K., BACKERT, L., BILICH, T., NEY, B., LOFFLER, M. W., KOWALEWSKI, D. J., TRAUTWEIN, N., RABSTEYN, A., ENGLER, T., BRAUN, S., HAEN, S. P., WALZ, J. S., SCHMID-HORCH, B., BRUCKER, S. Y., WALLWIENER, D., KOHLBACHER, O., FEND, F., RAMMENSEE, H. G., STEVANOVIĆ, S., STAEBLER, A. &

- WAGNER, P. 2017. The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 9942-9951.
- SCHUSTER, P., THOMANN, S., WERNER, M., VOLLMER, J. & SCHMIDT, B. 2015. A subset of human plasmacytoid dendritic cells expresses CD8 α upon exposure to herpes simplex virus type 1. *Frontiers in Microbiology*, Volume 6 - 2015.
- SELIGER, B., KLOOR, M. & FERRONE, S. 2017. HLA class II antigen-processing pathway in tumors: Molecular defects and clinical relevance. *Oncoimmunology*, 6, 1171447-1171447.
- SHIH, I. M., WANG, Y. & WANG, T. L. 2021. The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape. *Am J Pathol*, 191, 26-39.
- SHIRAIISHI, T., SHINTO, E., NEARCHOU, I. P., TSUDA, H., KAJIWARA, Y., EINAMA, T., CAIE, P. D., KISHI, Y. & UENO, H. 2020. Prognostic significance of mesothelin expression in colorectal cancer disclosed by area-specific four-point tissue microarrays. *Virchows Arch*.
- SIEGEL, R. L., GIAQUINTO, A. N. & JEMAL, A. 2024. Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74, 12-49.
- SIKORSKA, B., DANILEWICZ, M. & WAGROWSKA-DANILEWICZ, M. 1999. HLA-DR expression is a significant prognostic factor in laryngeal cancer. A morphometric study. *Apmis*, 107, 383-388.
- SPEISER, D. E., CHIJIOKE, O., SCHAEUBLE, K. & MÜNZ, C. 2023. CD4+ T cells in cancer. *Nature Cancer*.
- TEGELER, C. M., SCHEID, J., RAMMENSEE, H. G., SALIH, H. R., WALZ, J. S., HEITMANN, J. S. & NELDE, A. 2022. HLA-DR Presentation of the Tumor Antigen MSLN Associates with Clinical Outcome of Ovarian Cancer Patients. *Cancers (Basel)*, 14.
- THOMAS, A., CHEN, Y., STEINBERG, S. M., LUO, J., PACK, S., RAFFELD, M., ABDULLAEV, Z., ALEWINE, C., RAJAN, A., GIACCONE, G., PASTAN, I., MIETTINEN, M. & HASSAN, R. 2015. High mesothelin expression in advanced lung adenocarcinoma is associated with KRAS mutations and a poor prognosis. *Oncotarget*, 6, 11694-11703.
- TING, J. P. & TROWSDALE, J. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell*, 109 Suppl, 21-33.
- TING, J. P. Y., LOVERING, R. C., ALNEMRI, E. S., BERTIN, J., BOSS, J. M., DAVIS, B. K., FLAVELL, R. A., GIRARDIN, S. E., GODZIK, A., HARTON, J. A., HOFFMAN, H. M., HUGOT, J.-P., INOHARA, N., MACKENZIE, A., MALTAIS, L. J., NUNEZ, G., OGURA, Y., OTTEN, L. A., PHILPOTT, D., REED, J. C., REITH, W., SCHREIBER, S., STEIMLE, V. & WARD, P. A. 2008. The NLR Gene Family: A Standard Nomenclature. *Immunity*, 28, 285-287.
- TOGASHI, Y., SHITARA, K. & NISHIKAWA, H. 2019. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16, 356-371.
- TOTHILL, R. W., TINKER, A. V., GEORGE, J., BROWN, R., FOX, S. B., LADE, S., JOHNSON, D. S., TRIVETT, M. K., ETEMADMOGHADAM, D., LOCANDRO, B., TRAFICANTE, N., FEREDAY, S., HUNG, J. A., CHIEW, Y. E., HAVIV, I., AUSTRALIAN OVARIAN CANCER STUDY, G., GERTIG, D., DEFAZIO, A. & BOWTELL, D. D. 2008. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res*, 14, 5198-5208.
- TSIATAS, M. L., GYFTAKI, R., LIACOS, C., POLITI, E., RODOLAKIS, A., DIMOPOULOS, M. A. & BAMIAS, A. 2009. Study of T lymphocytes infiltrating peritoneal metastases in advanced ovarian cancer: associations with vascular endothelial growth factor levels and prognosis in patients receiving platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer*, 19, 1329-1334.

- TURNER, T. B., MEZA-PEREZ, S., LONDONO, A., KATRE, A., PEABODY, J. E., SMITH, H. J., FORERO, A., NORIAN, L. A., STRAUGHN, J. M., JR., BUCHSBAUM, D. J., RANDALL, T. D. & AREND, R. C. 2017. Epigenetic modifiers upregulate MHC II and impede ovarian cancer tumor growth. *Oncotarget*, 8, 44159-44170.
- UKITA, M., HAMANISHI, J., YOSHITOMI, H., YAMANOI, K., TAKAMATSU, S., UEDA, A., SUZUKI, H., HOSOE, Y., FURUTAKE, Y., TAKI, M., ABIKO, K., YAMAGUCHI, K., NAKAI, H., BABA, T., MATSUMURA, N., YOSHIZAWA, A., UENO, H. & MANDAI, M. 2022. CXCL13-producing CD4+ T cells accumulate in the early phase of tertiary lymphoid structures in ovarian cancer. *JCI Insight*, 7.
- VAN BEEK, J. J. P., RESCIGNO, M. & LUGLI, E. 2021. A fresh look at the T helper subset dogma. *Nat Immunol*, 22, 104-105.
- VAN NAGELL, J. R., JR., MILLER, R. W., DESIMONE, C. P., UELAND, F. R., PODZIELINSKI, I., GOODRICH, S. T., ELDER, J. W., HUANG, B., KRYSCIO, R. J. & PAVLIK, E. J. 2011. Long-term survival of women with epithelial ovarian cancer detected by ultrasonographic screening. *Obstet Gynecol*, 118, 1212-1221.
- VICTOR A. MCKUSICK, C. A. B. 1986. MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX, CLASS II, DR ALPHA; HLA-DRA *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD, MIM Number: 142860, URL: <https://omim.org/entry/142860> abgerufen am 21.10.25.*
- WALDBURGER, J.-M., SUTER, T., FONTANA, A., ACHA-ORBEA, H. & REITH, W. 2001. Selective Abrogation of Major Histocompatibility Complex Class II Expression on Extrahematopoietic Cells in Mice Lacking Promoter IV of the Class II Transactivator Gene. *Journal of Experimental Medicine*, 194, 393-406.
- WALSH, M. D., DENT, O. F., YOUNG, J. P., WRIGHT, C. M., BARKER, M. A., LEGGETT, B. A., BOKEY, L., CHAPUIS, P. H., JASS, J. R. & MACDONALD, G. A. 2009. HLA-DR expression is associated with better prognosis in sporadic Australian clinicopathological Stage C colorectal cancers. *International Journal of Cancer*, 125, 1231-1237.
- WEBER, D. A., EVAVOLD, B. D. & JENSEN, P. E. 1996. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science*, 274, 618-620.
- WETHINGTON, S. L., PARK, K. J., SOSLOW, R. A., KAUFF, N. D., BROWN, C. L., DAO, F., OTEGBEYE, E., SONODA, Y., ABU-RUSTUM, N. R., BARAKAT, R. R., LEVINE, D. A. & GARDNER, G. J. 2013. Clinical outcome of isolated serous tubal intraepithelial carcinomas (STIC). *Int J Gynecol Cancer*, 23, 1603-1611.
- WIENDL H., S. J. E. A. 2022. Myositissyndrom, S2k-Leitlinie. *Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*.
- WU, Z., ZHENG, Y., SHENG, J., HAN, Y., YANG, Y., PAN, H. & YAO, J. 2022. CD3(+)CD4(-)CD8(-) (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front Immunol*, 13, 816005.
- YILDIZ, Y., KABADAYI, G., YIGIT, S., KUCUKZEYBEK, Y., ALACACIOGLU, A., VAROL, U., TASKAYNATAN, H., SALMAN, T., OFLAZOGLU, U., AKYOL, M. & TARHAN, M. O. 2019. High expression of mesothelin in advanced serous ovarian cancer is associated with poor prognosis. *J buon*, 24, 1549-1554.
- ZHANG, L., CONEJO-GARCIA, J. R., KATSAROS, D., GIMOTTY, P. A., MASSOBRIO, M., REGNANI, G., MAKRIGIANNAKIS, A., GRAY, H., SCHLIENGER, K., LIEBMAN, M. N., RUBIN, S. C. & COUKOS, G. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, 348, 203-13.
- ZITVOGEL, L., KEPP, O. & KROEMER, G. 2011. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol*, 8, 151-160.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Annette Staebler durchgeführt.

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

Der untersuchte klinische Datensatz entstammt der RedCap Datenbank aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen, welcher durch Herrn Dr. med. Marcel Grube (AG Prof. Kommos) zur Verfügung gestellt wurde.

Die Erstellung der TMAs wurde von Frau Christine Beschorner und von Frau Dr. med. Britta Ney durchgeführt. Die technische Umsetzung der TMA-Planung und Erstellung erfolgte für alle TMAs durch Frau Christine Beschorner. Die TMAs wurden von Frau Karen Greif sowie Christine Beschorner geschnitten.

Das Ausheben der für die Studie in Frage kommenden Gewebeblöcke sowie die Archivarbeit wurde im Rahmen von vorausgehenden Studien der gleichen Arbeitsgruppe von Frau Dr. Anna Katharina Fischer, Frau Dr. Britta Ney, Frau Dr. Deborah Pham und Frau Dr. Nina Neudeck, Frau Karen Greif und Frau Christine Beschorner geleistet.

Für die TMA-Serien 52.1 – 52.5; 53.1 - 53.2; 54 erfolgte die Archivrecherche und Kollektivzusammenstellung durch Frau Dr. Britta Ney, Frau Dr. Anna Fischer, Herrn PD Dr. Hans Bösmüller und Frau Prof. Dr. Annette Staebler.

Für die TMA-Serie 62.1 - 62.6 + 78 erfolgte die Archiv-recherche und Kollektivzusammenstellung durch Frau Dr. Jana Pasternak, Frau Dr. Anna Katharina Fischer, Frau Dr. Britta Ney. Die pathologischen Befunde wurden vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt.

Der Histotyp wurde mithilfe eines immunhistochemischen Algorithmus modifiziert nach Köbel et. al (Köbel et al., 2016) durch Frau Dr. med. Nina Neudeck, Frau Dr. Anna Katharina Fischer sowie Frau Prof. Dr. med. Annette Staebler gemäß der WHO-Klassifikation von 2020 erneut klassifiziert und gegebenenfalls

korrigiert. Siehe hierzu Dissertation von Frau Dr. med. Nina Neudeck (Neudeck, 2023).

Die immunhistochemische Färbungen für MSLN wurden von Frau Karen Greif ausgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen für HLA-DRA und die CD3/CD8 TIL-Doppelfärbung wurden von Frau Dr. med. Anna Katharina Fischer und Frau Karen Greif unter meiner Mithilfe etabliert. Die weitere Prozessierung der gefärbten Schnitte wurde von Frau Karen Greif, Frau Christine Beschorner sowie in Einzelfällen von mir selbst durchgeführt.

Die immunhistochemischen Färbungen der TMAs für diese Arbeit wurden von mir ausgewertet und danach unabhängig von Frau Prof. Dr. med. Annette Staebler (für MSLN) bzw. Frau Dr. med. Anna Katharina Fischer (Für HLA-DRA) überprüft und gegebenenfalls korrigiert und dann von mir digitalisiert. Die CD3/CD8 TIL-Doppelfärbung wurde von Frau Dr. med. Anna Katharina Fischer ausgewertet und von mir dokumentiert und digitalisiert.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den 20.07.2026

Hannah Haefner

Danksagung

Mein Dank gilt dem Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen für die Bereitstellung der großartigen Infrastruktur.

Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Annette Staebler und meiner Betreuerin Frau Dr. Anna Fischer wurde ich stets geleitet, unterstützt und durfte an einem klinisch relevanten, großen Kollektiv forschen.

Ohne den technischen und methodischen Sachverstand von Frau Karen Greif und Frau Christine Beschorner wären viele Schritte so nicht möglich gewesen bzw. nicht so reibungslos abgelaufen.

Zu guter Letzt gilt auch, dass ich allen Freunden sowie meiner Familie zu großem Dank verpflichtet bin. Danke an alle, die meine Forschung ermöglicht haben!