

Aus dem  
Department für Diagnostische Labormedizin der Universität  
Tübingen

Institut für Pathologie und Neuropathologie

Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und  
Pathologische Anatomie

**Expression von PD-L1 und Indoleamine 2,3-  
dioxygenase in high-grade serösen Ovarialkarzinomen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Neudeck, Nina Marie, geb. Fuchs

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Schittenhelm

Tag der Disputation: 21.08.2023

## **Widmung**

Für meinen Ehemann.

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis: .....	IX
1 Einleitung .....	1
1.1 Epidemiologie .....	1
1.2 Einteilung von Ovarialneoplasien.....	2
1.3 Entstehungstheorien der high-grade serösen Karzinome.....	3
1.4 Tumormicroenvironment .....	4
1.5 Molekulare Marker .....	6
1.5.1 Re-Klassifizierungsmarker .....	6
1.5.2 CD3 und CD8 .....	9
1.5.3 PD-L1 .....	10
1.5.4 IDO1 .....	12
1.6 Vorgängerstudien mit kombinierten Analysen von PD-L1 und IDO1 ..	14
1.7 Ziele dieser Arbeit .....	15
2 Material und Methoden .....	17
2.1 Studienkollektiv .....	17
2.2 Tissue Microarrays.....	17
2.3 Re-Klassifizierung .....	19
2.4 Immunhistochemie.....	20
2.4.1 Allgemein.....	20
2.4.2 Auswertung der Immunhistochemie .....	24
2.5 Statistische Auswertung.....	27
3 Ergebnisse .....	30
3.1 Immunhistochemische Re-Klassifizierung .....	30
3.2 Kollektiv zur Biomarkeranalyse.....	36
3.3 PD-L1 und tumorinfiltrierende Lymphozyten in high-grade serösen Ovarialneoplasien.....	37
3.3.1 Einfluss der CD3-positiven TIL-Population auf das kumulative Überleben.....	37
3.3.2 Einfluss der CD8-positiven TIL-Population auf das kumulative Überleben.....	41
3.3.3 PD-L1-Expression in high-grade serösen Ovarialneoplasien.....	44
3.3.3.1 CPS mit DAKO-Agilent Antikörper .....	44



3.3.3.2	TPS mit Antikörperklon 28.8 .....	47
3.3.4	Korrelation PD-L1-Expression mit CD3-positiven intratumoralen/intraepithelialen TIL .....	50
3.3.5	Korrelation PD-L1-Expression mit CD8-positiven intratumoralen/intraepithelialen TIL .....	53
3.4	IDO1-Expression in high-grade serösen Ovarialneoplasien .....	58
3.4.1	IDO1-Expression auf TIL und Korrelation mit Alter, FIGO-Stadium und R-Status .....	59
3.4.2	IDO1-Expression auf Tumorzellen und Korrelation mit Alter, FIGO- Stadium und R-Status .....	61
3.4.3	Einfluss von IDO1 auf das Überleben .....	62
3.4.4	Korrelation IDO1-Expression mit CD3- und CD8-positiven TIL- Subgruppen .....	67
3.4.4.1	Korrelation der IDO1-Expression auf TIL und CD3- bzw. CD8- positiver TIL .....	68
3.4.4.2	Korrelation der IDO1-Expression auf Tumorzellen und CD3- bzw. CD8-positiver TIL .....	70
3.4.5	Korrelation von IDO1- und PD-L1-Expression anhand des CPS- Wertes .....	72
3.4.6	Korrelation von IDO1- und PD-L1-Expression anhand des TPS- Wertes .....	77
4	Diskussion .....	78
4.1	Re-Klassifikation .....	78
4.2	Tumor infiltrierende Lymphozyten (CD3, CD8) .....	78
4.3	PD-L1 .....	79
4.4	IDO1 .....	84
4.5	Vergleich der Marker .....	87
5	Zusammenfassung .....	90
6	Literaturverzeichnis .....	92
7	Anhang .....	99
8	Erklärung zum Eigenanteil .....	101
9	Danksagung .....	102

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper und zugehörige Informationen .....	22
Tabelle 2: Markerprofil und Auswertungsschemata der Immunhistochemie.....	28
Tabelle 3: Gegenüberstellung Originaldiagnose und Re-Klassifizierter Histotyp. .....	30
Tabelle 4: Markerexpression nach Histotyp. ....	35
Tabelle 5: Re-Klassifizierung primär als mischdifferenziert diagnostizierter Ovarialkarzinome. ....	35
Tabelle 6: Ranges CD3+ TIL nach Minimal-, Maximal- und Mittelwert. ....	38
Tabelle 7: Ranges CD8+ TIL nach Minimal-, Maximal- und Mittelwert. ....	41
Tabelle 8: PD-L1-Expression anhand CPS und klinische Parameter (Alter, FIGO Status, Resektionsstatus, OS und DFS). ....	45
Tabelle 9: PD-L1-Expressionsstatus mittels TPS-Mittelwert: Verteilungsanalyse bezüglich Alter, FIGO-Status, Resektionsstatus. ....	49
Tabelle 10: Epitheliale CD3-positive TIL (Mittelwert) mit zugehöriger Standardabweichung und Wertebereich anhand von CPS Maximalwerten.....	50
Tabelle 11: Epitheliale CD8-positive TIL (Mittelwert) mit zugehöriger Standardabweichung und Wertebereich anhand von CPS-Maximalwerten. p <0,001. ....	53
Tabelle 12: IDO1-Expressionsstatus auf TIL anhand des Maximalwertes pro Fall: Verteilungsanalyse bezüglich Alter, FIGO-Status, Resektionsstatus.....	60
Tabelle 13: IDO1-Expressionsstatus auf Tumorzellen anhand des Maximalwertes pro Fall: Verteilungsanalyse bezüglich Alter, FIGO-Status, Resektionsstatus. ....	61
Tabelle 14: CD3+ und CD8+ TIL (pro HPF, Standardabweichung und Wertespanne) nach IDO1-Expressionsgruppen auf TIL. ....	67
Tabelle 15: CD3+ und CD8+ TIL (pro HPF, Standardabweichung und Wertespanne) nach IDO1-Expressionsgruppen auf Tumorzellen.....	67
Tabelle 16: Maximale IDO1-Expression auf TIL in Kombination mit der Tertilenanalyse der CD3+ epithelialen TIL und der Einfluss auf das OS (in Tagen). ....	69

Tabelle 17: Maximale IDO1-Expression auf TIL in Kombination mit der Tertilenanalyse der CD8+ epithelialen TIL und der Einfluss auf das OS (in Tagen). .....	70
Tabelle 18: Maximale IDO1-Expression auf Tumorzellen – mittleres Gesamtüberleben in Tagen anhand der verschiedenen Tertilen für den CD3 Mittelwert. ....	71
Tabelle 19: Maximale IDO1-Expression auf Tumorzellen – mittleres Gesamtüberleben in Tagen anhand der verschiedenen Tertilen für den CD8 Mittelwert. ....	71
Tabelle 20: IDO1-Expression auf Tumorzellen (Maximalwerte), in Kombination mit PD-L1-Expression gemäß CPS-Maximalwert $\leq 5$ (n.a. = nicht anwendbar, mittleres OS wurde nicht erreicht). ....	72
Tabelle 21: IDO1-Expression auf TIL (Maximalwerte), in Kombination mit PD-L1-Expression gemäß CPS-Maximalwert $\leq 5$ , sowie 5- und 10-Jahres-Überleben. (n.a. = nicht anwendbar, mittleres OS wurde nicht erreicht).....	73
Tabelle 22: IDO1-Expression auf <b>TIL</b> (Maximalwerte), in Kombination mit PD-L1-Expression gemäß TPS-Maximalwert $\leq 5\%$ . ....	77
Tabelle 23: IDO1-Expression auf <b>Tumorzellen</b> (Maximalwerte), in Kombination mit PD-L1-Expression gemäß TPS-Maximalwert $\leq 5\%$ . ....	77

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema zu Entstehungstheorien der high-grade serösen Ovarialneoplasien. Kurman, R.J., L. Hedrick Ellenson, and B.M. Ronnet, <i>Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract</i> . 6th ed. 2011: Springer Science & Business Media, LLC 2011..	4
Abbildung 2: Zellen des Tumormicroenvironments und ihre Wirkungsweise. Anderson, N.M. and M.C. Simon, <i>The tumor microenvironment</i> . <i>Curr Biol</i> , 2020. 30(16): p. R921-R925.	5
Abbildung 3: PD-1/PD-L1 Achse im Tumormicroenvironment. Lotfinejad P., et al., <i>PD-1/PD-L1 axis importance and tumor microenvironment immune cells</i> . <i>Life Sci</i> , 2020. 259: p. 118297.	11
Abbildung 4: Einfluss von IDO1 auf T-Zellen. Brochez, L., I. Chevolet, and V. Kruse, <i>The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy</i> . <i>Eur J Cancer</i> , 2017. 76: p. 167-182.	13
Abbildung 5: Entstehung eines TMA mit anschließender immunhistochemischer Färbung. <a href="http://www.abnova.com/products/Antibody-for-Tissue-Microarray-M0000.html">http://www.abnova.com/products/Antibody-for-Tissue-Microarray-M0000.html</a> (zuletzt aufgerufen 03.02.2023).	18
Abbildung 6: Re-Klassifizierungsalgorithmus modifiziert nach Köbel et al. Eigene Darstellung.	19
Abbildung 7: Schema OptiView DAB IHC Detection Kit. Datenblatt Ventana Medical Systems Inc. 2011.	20
Abbildung 8: Auswertungsschema p53. Eigene Darstellung.	24
Abbildung 9: Allred Score. Chand, P., et al., Evaluation of Immunohistochemical Profile of Breast Cancer for Prognostics and Therapeutic Use. <i>Niger J Surg</i> , 2018. 24(2): p. 100-106.	25
Abbildung 10: Immunhistochemie von HGSC; WT1 positiv (Score=2), p53 mutiert (komplett nukleäre Färbung, Score=3),	31
Abbildung 11: Ergebnis Re-Klassifizierung primärer HGSC-Diagnosen.	32
Abbildung 12: Immunhistochemie EC: WT1 negativ (Score=0), PR positiv (Score=6), p53 Wildtyp (Score=2). Eigene Darstellung.	33
Abbildung 13: Typische immunhistochemische Profile von LGSC, EC und MC. Zusammenschnitt aus Kurman RJ et al. 2014, Seite 35.	33

Abbildung 14: Immunhistochemische Färbungen CD3-Expression. Eigene Darstellung. ....	37
Abbildung 15: Gesamtüberlebenskurven (overall survival) bezogen auf die CD3-Expression. $p < 0,001$ .....	39
Abbildung 16: Gesamtüberlebenskurven CD3-Expression ausgewertet nach <b>a.</b> Maximalwerte TIL Gesamt (stromal + epithelial), <b>b.</b> Durchschnittswerte TIL Gesamt (stromal + epithelial), <b>c.</b> Maximalwerte stromale Expression, <b>d.</b> Mittelwerte stromale Expression. ....	40
Abbildung 17: Immunhistochemische Färbungen CD8-Expression. Eigene Darstellung. ....	41
Abbildung 18: Gesamtüberlebenskurven (overall survival) bezogen auf die CD8-Expression. $p < 0,001$ .....	42
Abbildung 19: Gesamtüberlebenskurven CD8-Expression ausgewertet nach <b>a.</b> Maximalwerte TIL gesamt (stromal + epithelial), <b>b.</b> Durchschnittswerte TIL gesamt (stromal + epithelial), <b>c.</b> Maximalwerte stromaler Expression, <b>d.</b> Mittelwerte stromaler Expression. ....	43
Abbildung 20: PD-L1-Expression (DAKO 22C3) in HGSC.Eigene Darstellung.	44
Abbildung 21: Gesamtüberlebenskurven (overall survival) bezogen auf die PD-L1-Expression anhand des CPS-Maximalwertes. $p < 0,001$ .....	46
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung für PD-L1 (Abcam 28.8). Eigene Darstellung. ....	47
Abbildung 23: Gesamtüberlebenskurven (overall survival) bezogen auf PD-L1-Expression nach TPS-Maximalwert $\leq 5\%$ . $p=0,129$ .....	48
Abbildung 24: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS) und CD3-positive TIL nach Tertilen top vs. mid & low. $p < 0,001$ .....	51
Abbildung 25: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (TPS) und CD3-positive TIL nach Tertilen top vs. mid & low. $p < 0,001$ .....	51
Abbildung 26: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS) und CD3-positive TIL bei Patientinnen mit stattgehabter R0-Resektion. $p=0,009$ . ....	52
Abbildung 27: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS-Maximalwert) und CD3- positive TIL bei Patientinnen mit stattgehabter R1/R2 Resektion. $p=0,312$ . ....	53

Abbildung 28: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS) und CD8-Expression in TIL. $p < 0,001$ . .....	54
Abbildung 29: Gesamtüberlebenskurven Korrelation PD-L1 (TPS) und CD8-Expression in TIL. $p < 0,001$ . .....	55
Abbildung 30: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS) und CD8-positive TIL bei Patientinnen mit stattgehabter R0-Resektion. $p = 0,006$ . .....	56
Abbildung 31: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS-Maximalwert) und CD8-positive TIL bei Patientinnen mit stattgehabter R1/R2 Resektion. $p = 0,062$ . .....	57
Abbildung 32: IDO1-Expression in HGSC. Eigene Darstellung. ....	58
Abbildung 33: Gesamtüberlebenskurven (OS) bezogen auf die IDO1-Expression auf TIL. $p = 0,007$ . .....	62
Abbildung 34: Gesamtüberlebenskurve (OS) für IDO1-Expression auf TIL anhand des Auswertescores/nach Kategorien (Mittelwert). $p = 0,057$ . ....	63
Abbildung 35: Gesamtüberlebenskurven (OS) bezogen auf die IDO1-Expression (Maximalwert) auf Tumorzellen. $p < 0,001$ . ....	64
Abbildung 36: Gesamtüberlebenskurve (OS) für IDO1-Expression auf Tumorzellen anhand des Auswertescores (Mittelwert); $p = 0,015$ . ....	65
Abbildung 37: Mittleres Gesamtüberleben nach max. IDO1-Expression auf TIL (negativ=0% vs. positiv >1%) bei (a) vollständiger Resektion (R0, $p = 0,030$ ) vs. (b) mikroskopisch oder makroskopisch unvollständiger Resektion (R1/2, $p = 0,079$ ). ....	66
Abbildung 38: Mittleres Gesamtüberleben nach IDO1-Expression auf TILs (Maximalwerte) aufgeschlüsselt nach Prozentgruppen (0%, 1-10%, >10%, >25%) bei (a) vollständiger Resektion (R0, $p = 0,076$ ) vs. (b) mikroskopisch oder makroskopisch unvollständiger Resektion (R1/R2, $p = 0,079$ ). ....	66
Abbildung 39: Gesamtüberleben in HGSC mit CD3+ epithelialen TIL Mittelwerte im (a) oberen ( $p = 0,271$ ) und (b) mittleren ( $p = 0,095$ ) Tertil zusammen mit IDO1-Expression auf TIL (Maximalwerte). ....	68
Abbildung 40: Gesamtüberleben (OS) in HGSC mit CD8+ epithelialen TIL (Mittelwert) im (a) oberen ( $p = 0,150$ ), (b) mittleren ( $p = 0,133$ ) und (c) unterem ( $p = 0,797$ ) Tertil zusammen mit IDO1- Expression auf TIL (Maximalwerte). ....	70

Abbildung 41: Korrelation der IDO1-Expression auf TIL in aufsteigender Reihenfolge (Prozent, schrittweise) in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression CPS-Maximalwert >5. $p=0,002$ . ....	74
Abbildung 42: Korrelation der IDO1-Expression auf TIL in aufsteigender Reihenfolge (Prozent, schrittweise) in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression CPS-Maximalwert <5. $p=0,254$ . ....	74
Abbildung 43: IDO1-Expression von <b>(a)</b> 1-10% ( $p=0,020$ ) und <b>(b)</b> > 10% ( $p=0,026$ ) in Korrelation mit PD-L1-Expression (CPS-Maximalwerte $\neq$ 5). ....	75
Abbildung 44: Box-Plot-Diagramm der IDO1-Expression auf <b>(a)</b> TIL (Maximalwert) und <b>(b)</b> Tumorzellen zusammen mit der PD-L1-Expression unter Verwendung von CPS $\neq$ 5 (explorative Datenanalyse). ....	76

## Abkürzungsverzeichnis:

APC	Antigenpräsentierende Zellen
BOT	Engl.: borderline ovarian cancer (Borderline-Tumor)
CCC	Engl.: clear-cell carcinoma (klarzelliges Karzinom)
CD	Engl.: Cluster of differentiation
CPS	Engl.: Combined Positivity Score
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Substratlösung
DCs	Dendritische Zellen
DFS	Engl.: disease free survival (krankheitsfreies Überleben)
EC	Engl.: endometrioid carcinoma (endometrioides Karzinom)
FIGO	Franz.: Fédération International de Gynécologie et d'Obstétrique
HGSC	Engl.: high-grade serous carcinoma (high-grade seröses Karzinom)
IHC	Immunhistochemie
HPF	Engl.: high-power field (Haupt Gesichtsfeld)
IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1
IL	Interleukin
LGSC	Engl.: low-grade serous carcinoma (low-grade seröses Karzinom)
MC	Engl.: mucinous carcinoma (muzinöses Karzinom)
MDSCs	myeloischen Suppressorzellen
MHC	Engl.: Histocompatibility Complex
NK	natürliche Killer-Zellen
NGS	Engl.: Next generation sequencing
OS	Engl.: overall survival (Gesamtüberleben)
PARPi	Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) Inhibitoren
PAX8	Engl.: Paired-Box-Protein 8
PBMCs	peripheren mononukleären Blutzellen
PFS	Engl.: progression-free survival (progressionsfreies Überleben)
PR	Progesteronrezeptor
TAMs	Tumorassoziierte Makrophagen
TCR	T-Zell-Rezeptor



TIL	Tumor infiltrierende/r Lymphozyt/en
TMA	Engl.: Tissue-Micro-Array
TP53	Tumorsurppresorgen p53
TPS	Engl.: Tumor Proportion Score
Trp	Tryptophan
WT1	Wilms-Tumor-Protein

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Karzinome des Ovars sind die gynäkologische Erkrankung mit der höchsten Mortalität und Morbidität.

Pro Jahr erkranken weltweit etwa 314 000 Frauen an einem malignen Ovarialtumor. 207 000 Frauen sterben pro Jahr an einem Ovarialkarzinom. Mit einer Inzidenz von 3,4% steht das Ovarialkarzinom an 8. Stelle aller Krebsneuerkrankungsfälle bei Frauen, nach Mamma-, kolorektalem, Lungen-, Zervix-, Schilddrüsen-, Magen- und Karzinom des Corpus uteri [1]. Das Ovarialkarzinom zählt zwar zu einer selteneren Tumorentität, ist aber mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 41% prognostisch sehr ungünstig [2].

70% der Ovarialkarzinome werden erst in den fortgeschrittenen Stadien FIGO IIB–IV diagnostiziert [3]. Grund dafür ist vor allem, dass Patientinnen mit Ovarialkarzinom keine spezifische Symptomatik aufweisen. Die Symptome reichen von diffusen abdominalen Beschwerden, neu aufgetretenem Meteorismus, Veränderungen der Stuhlgewohnheiten, unklarer Gewichtsabnahme bis zu massiver Bauchumfangszunahme. Da diese Beschwerden sehr unspezifisch sind und es keine Screening-Methode gibt, ist eine frühzeitige Diagnose deutlich erschwert und führt zu einer hohen Rate an in fortgeschrittenen Stadien diagnostizierten Karzinomen.

Die Tumormetastasierung bei Ovarialkarzinomen beginnt sehr früh, auch bereits bei kleinen Primärtumoren, vor allem vom high-grade serösen histologischen Typ [4]. In diesen Stadien ist eine komplette Resektion der Karzinome häufig nur schwer möglich, da es durch die fortgeschrittene Metastasierung zu einer ausgedehnten Peritonealkarzinose mit Befall des Omentums, des Darms, des Mesenteriums und einem Mitbefall des Diaphragmas gekommen sein kann [5].

Nach derzeitigen Leitlinien besteht die Therapiestrategie bei Ovarialkarzinomen aus einer Operation mit dem Versuch der kompletten en-bloc Resektion der Tumorherde sowie einer adjuvanten Chemotherapie mit Paclitaxel und platinhaltigen Reagenzien [6].

Als Risikofaktoren für die Entstehung von Ovarialkarzinomen werden frühe Menarche und späte Menopause gezählt. Eine hohe Parität und die Einnahme von Kontrazeptiva gelten als protektive Faktoren [7].

## **1.2 Einteilung von Ovarialneoplasien**

Nach gegenwärtiger WHO Einteilung wird die Gruppe der Ovarialneoplasien nach der Herkunft ihrer Ursprungszelle in folgende Gruppen untergliedert:

- I. Epitheliale Neoplasien
- II. Keimzelltumoren
- III. Keimstrang- und Keimsstrangstromatumoren
- IV. Metastatische Sekundärtumoren

Die Gruppe der epithelialen Neoplasien wird in die 5 häufigsten histologischen Typen unterteilt: high-grade serös (HGSC), klarzellig (CCC), endometrioid (EC), low-grade serös (LGSC) und muzinös (MC). Diese unterscheiden sich anhand ihrer Vorläuferläsionen, Ausbreitungsmuster und Überleben, sowie ihrer Assoziation mit hereditären Tumorsyndromen und molekularen Pathogenese [8]. Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der häufigsten Entität, den HGSC.

Des Weiteren lassen sich die Neoplasien der Ovarien auch bezüglich ihrer Entstehungswege und ihrer Malignität unterscheiden [7]. So werden als Typ I Tumoren alle low-grade serösen, endometrioiden, klarzelligen und muzinösen Tumoren zusammengefasst. Es wird angenommen, dass sie stufenweise aus gutartigen Vorgängerläsionen entstehen. Diese entarten schrittweise über Borderline Tumoren zu Karzinomen, bei denen zwar bereits Zellatypien vorliegen aber das umgebende Gewebe nicht infiltriert wird [9].

Als Typ II Tumoren werden high-grade seröse Ovarialkarzinome und die Karzinosarkome bezeichnet. Sie zeichnen sich durch eine hohe Malignität und eine schnelle Progredienz mit der Tendenz zur frühen Invasion des umgebenden Gewebes aus. Von diesen Tumoren wird angenommen, dass sie „de novo“ sprich ohne gutartige Vorläuferläsionen entstehen. Dabei weisen über 75% der Fälle eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 (TP53) auf [7].

Molekulare Analysen bei HGSC ergaben eine weitere Einteilung in vier molekulare Untergruppen: C1=mesenchymal, C2=immunreaktiv, C4=differenziert und C5=proliferativ [10]. Diese Einteilung und deren Pathogenese sind Bestandteil aktueller Forschungsansätze.

Das Tumorstaging der Tumoren des Ovars sowie der Tube und des primären peritonealen Karzinoms wird anhand der TNM und der FIGO Klassifikation vorgenommen. Die ausführliche Zusammenstellung dieser Einteilungen findet sich in der Anlage 1.

### **1.3 Entstehungstheorien der high-grade serösen Karzinome**

High-grade seröse Karzinome können an verschiedenen Orten des weiblichen Genitaltrakts entstehen, wie beispielsweise an Ovarien, Tuben, Peritoneum oder Endometrium. Daher gibt es verschiedene Theorien zu deren Entstehung.

Entstehung der Tumoren aus:

- a. Ovarialmesothel, dieses bildet sogenannte Inklusionszysten, welche wiederum die Zelltypen hervorbringt [11]
- b. Zellen, die residual aus der Entwicklung des sekundären Müller'schen Epithels hervorgehen [11]
- c. Tubengewebe, welches über den Fimbrien-besetzten Teil der Tube Zellen in das Ovar streut [12]

Aktuelle Studien sprechen dafür, dass die letzte Hypothese sehr wahrscheinlich für die Entstehung von high-grade serösen Ovarialkarzinomen verantwortlich ist und versuchen diesen Ansatz zu bestätigen [13, 14].

Es wird angenommen, dass durch eine stetige Traumatisierung des Ovarialepithels aufgrund des hormonell geregelten Eisprungs eine Umgebung geschaffen wird, in der Zellwachstum stimuliert wird und somit auch maligne Veränderungen getriggert werden [15].

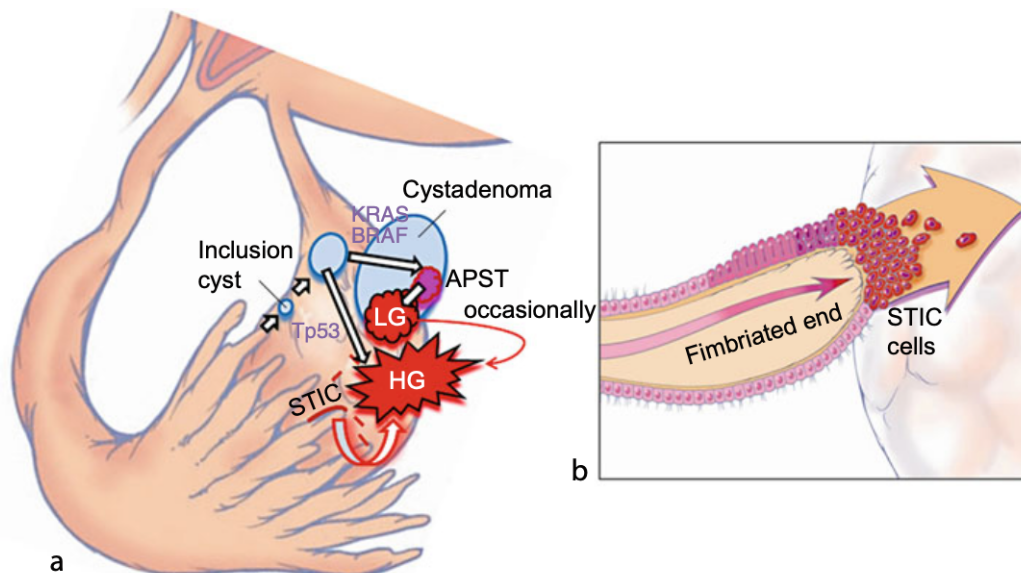


Abbildung 1: Schema zu Entstehungstheorien der high-grade serösen Ovarialneoplasien (APST: atypisch proliferierender seröser Tumor, STIC: serös tubare intraepitheliale Neoplasie, LG: low-grade, HG: high-grade). Blaustein S. 683.

#### 1.4 Tumormicroenvironment

Als Tumormicroenvironment oder Tumormikroumgebung bezeichnet man das die malignen Zellen eines Tumors unmittelbar umgebende Umfeld. Dabei handelt es sich vor allem um Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Adipozyten, Endothelzellen aber auch um Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise die tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL). Diverse vorangegangene Studien konnten zeigen, dass diese Zellen auch Einfluss auf die Karzinogenese haben [16-18].

Immunzellen wie TIL, Plasmazellen und Makrophagen sind wichtige Bestandteile dieses Tumormicroenvironments. Sie können dabei sehr unterschiedliche Effekte auf das Tumorwachstum haben, da sie dieses sowohl unterdrücken als auch fördern können (Abb. 2).

Immunzellen lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: Zellen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems. Die adaptive Immunität wird durch die Exposition gegenüber bestimmten Antigenen aktiviert und verwendet ein immunologisches Gedächtnis, um die Bedrohung zu „bewerten“ und die Immunantwort zu verbessern. T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killer (NK)-Zellen gehören zur adaptiven Immunantwort.

Die angeborene Immunität ist ein unspezifischer Abwehrmechanismus. Dieser kommt innerhalb von Stunden nach dem Eindringen eines fremden Antigens in den Körper ins Spiel. Zellen, die eine angeborene Immunantwort ausführen, umfassen Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen (DCs) [19].

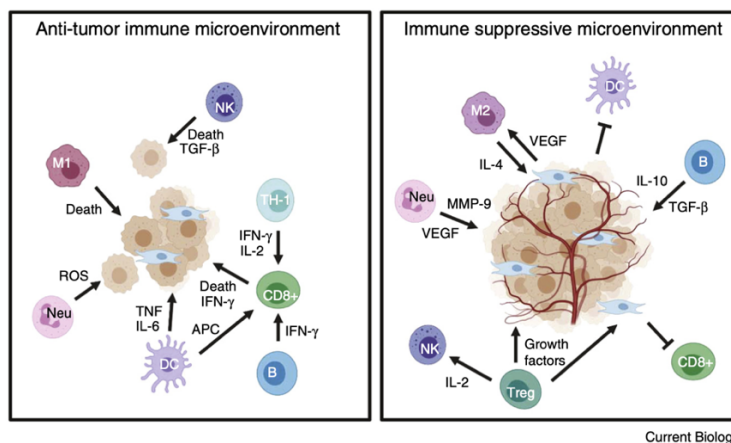


Abbildung 2: Zellen des Tumormicroenvironments und ihre Wirkungsweise. Anderson et al. 2020.

Tumoren schaffen es häufig diesen körpereigenen Immunregulationen zu entkommen, was auch als „tumor immune escape“ bezeichnet wird. Dies beschreibt, dass Tumorzellen wachsen und metastasieren können, indem sie durch verschiedene Mechanismen die Erkennung und den Angriff durch das Immunsystem verhindern. Dabei gibt es viele Mechanismen, einschließlich der Immunsuppression, die in den letzten Jahren zu einem Forschungsschwerpunkt geworden sind. Der Signalweg des Programmed Death Ligand-1/Programmed Death-1 (PD-L1/PD-1) ist ein wichtiger Bestandteil der Tumorimmunsuppression, der die Aktivierung von T-Lymphozyten hemmen und die Immuntoleranz von Tumorzellen erhöhen kann [20]. Mehr zum Wirkmechanismus von PD-1 und PD-L1 findet sich unter 1.5.3.

## **1.5 Molekulare Marker**

Zur genaueren Untersuchung von Tumoren steht die Untersuchung von bestimmten Markern auf oder in den Tumorzellen zur Verfügung. Auf diesem Weg kann zum einen eine genauere Klassifizierung der untersuchten Tumoren gewährleistet werden, zum anderen können potenzielle Therapietargets untersucht werden und dadurch weitere Therapeutika zum Therapiealgorithmus hinzugefügt werden.

Im Weiteren wird auf die einzelnen histologisch untersuchten Marker dieser Arbeit eingegangen und deren Funktion erläutert.

### **1.5.1 Re-Klassifizierungsmarker**

Zur differentialdiagnostischen Klärung des genauen Histotyps bei Karzinomen von Tube oder Ovar kann in Anlehnung an Köbel et al. ein Panel von vier immunhistochemischen Färbungen angewandt werden bestehend aus vier Antigenen: p53, WT1, Napsin A, Progesteronrezeptor [21].

#### **1.5.1.1. WT1**

WT1 (Wilms-Tumor-Protein 1) ist ein Transkriptionsfaktor, der für Zellwachstum und -differenzierung wichtig ist [22]. Er geht aus dem Tumorsuppressorgen WT1 hervor, welcher erstmals im Urogenitalsystem (Niere, Ovar und Hoden) identifiziert wurde [23].

WT1 ist im weiblichen Fortpflanzungssystem an der strukturellen und funktionellen Entwicklung der Gonaden beteiligt und wird in primordialen und primären Ovarialfollikeln überexprimiert [24]. Im normalen reifen Ovar wird WT1 im Oberflächenepithel des Ovars, in Stroma- und Granulosazellen exprimiert. In Ovarialtumoren ist WT1 charakteristisch für den serösen Subtyp des Ovarialkarzinoms und wird in aller Regel nur selten bei nicht-serösen Subtypen gefunden [25].

#### 1.5.1.2. p53

p53 ist ein Protein, das zum ersten Mal 1978 in einer Publikation von Lane und Crawford beschrieben wurde und erhielt seinen Namen durch seine damals beschriebene Molekülmasse von 53 kDa. Es ist einer der ersten beschriebenen Tumorsuppressoren [26].

Das p53 Protein hat in der Zelle eine zentrale Rolle bei der Antwort auf genotoxischen Stress (z.B. UV-Strahlung, chemische Noxen). Dabei kann es den Zellzyklus unterbrechen und damit die Proliferation einer genomisch suspekten oder entarteten Zelle verhindern. Auf diesem Weg soll die Zelle mehr Zeit gewinnen, um etwaige DNA-Schäden zu reparieren oder bei nicht zu reparierenden Fehlern des Genoms den programmierten Zelltod einzuleiten [27]. Aufgrund dieser Funktionen erhielt es den Beinamen „Wächter des Genoms“ [28].

Mit seiner Funktion nimmt p53 somit eine zentrale Rolle in der Prävention von Tumorentstehung ein. Sollte es nun zu einem Funktionsverlust von p53 kommen kann dies fatale Folgen für die Zelle haben und wird oft als universelles Ereignis bei der Entstehung von Tumorerkrankungen verstanden [29]. Mutationen im p53-Gen stellen dabei die häufigste Veränderung dar [30, 31].

In Genomuntersuchungen bei high-grade serösen Karzinomen wurde festgestellt, dass die Mutation im p53-Gen allen anderen Mutationen überwog und mit 96% in so gut wie allen untersuchten Tumoren vorkam [32]. Daher wird die Untersuchung von p53 auch mit als Hauptunterscheidungskriterium von high-grade serösen Karzinomen zu anderen Entitäten der Ovarialkarzinomen verwendet [33].



#### 1.5.1.3. Napsin A

Napsin A ist eine Asparaginproteinase, die in Typ-II-Pneumozyten, alveolären Makrophagen und renalen tubulären Epithelzellen exprimiert wird. Es gilt als zuverlässiger Marker für das primäre pulmonale Adenokarzinom [34].

Studien zeigen, dass Napsin A auch in klarzelligem Ovarialkarzinomen exprimiert wird und somit einen weiteren diagnostischen Marker zur Unterscheidung der einzelnen Subtypen des Ovarialkarzinoms bietet [35, 36].

#### 1.5.1.4. Progesteron Rezeptor

Progesteronrezeptoren (PR) befinden sich im Nucleus sowie im Zytoplasma der Zellen [37, 38].

In funktionalen Ovarien spielt Progesteron eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. So spielen hormonelle Veränderungen bei Eierstockkrebs eine Rolle und beeinflussen die Genexpression, Invasivität, das Zellwachstum und die Angiogenese [39].

Es zeigte sich, dass Ovarialtumoren mit endometrioiden Proliferationen eine höhere Expression von PR aufweisen als andere Entitäten. Zudem wird über einen Zusammenhang zwischen PR-Expression, Tumor-Stadium und Überleben berichtet. Die PR-Expression sei bei niedriggradigen Tumoren höher und eine hohe PR-Expression sei mit einem verbesserten kumulativen Überleben verbunden [40].

#### 1.5.1.5. PAX8

Das PAX8-Protein (engl.: Paired-Box-Protein 8) ist ein Produkt der PAX-Genfamilie. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Geweben und Organen während der Embryonalentwicklung und sind zudem entscheidend für die Aufrechterhaltung der normalen Funktion bestimmter Zellen nach der Geburt, wie z.B. den Thyreozyten [41, 42].

PAX8 als Marker lässt sich sowohl in normalen Zellen mit Ursprung in Müller'schen Gängen als auch bei Ovarialneoplasien identifizieren und ist charakteristisch für die epithelialen Phänotypen serös, klarzellig und endometrioid [43].

Folglich stellt die positive Expression von PAX8 ein starkes Argument für die Bestätigung der Entstehungstheorie von Ovarialkarzinomen im Fimbrienbereich der Eileiter oder in Endometrioseherden dar. Darüber hinaus ermöglicht PAX8 die Differenzierung zwischen Müller- und Nicht-Müller-Ursprung. Hilfreich ist dies z.B. bei der Identifizierung eines ins Ovar metastasierten Karzinoms, welches primär von der Bauchspeicheldrüse, dem Dickdarm oder der Brustdrüse abstammen könnte [44].

### **1.5.2 CD3 und CD8**

#### 1.5.1.6. Allgemein

CD (engl.: Cluster of Differentiation) ist ein Begriff, der eine Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen bezeichnet. Bei den CD-Molekülen handelt es sich um membrangebundene Glykoproteine, die teilweise zellspezifisch exprimiert werden und verschiedene Funktionen haben.

Die beiden hier untersuchten Marker sind Oberflächenmerkmale von T-Zellen, die bei der Erkennung bzw. bei der Stabilisierung der Bindung nach Erkennung eines Antigens durch eine T-Zellen beteiligt sind.

#### 1.5.1.7. CD3

CD3 bezeichnet einen Transmembranproteinkomplex auf T-Lymphozyten. Dieser Proteinkomplex bestehend aus verschiedenen Polypeptidketten, die zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und der sogenannten zeta-Kette den TCR-CD3-Komplex bilden. Dieser dient zur Aktivierung der T-Lymphozyten.

Die Spezifität des CD3-Antigens für T-Zellen und sein Auftreten in allen Stadien der T-Zell-Entwicklung macht es zu einem idealen T-Zell-Marker für den Nachweis von normalen T-Zellen und T-Zell-Neoplasmen (Lymphome und Leukämien). Folglich dient es auch zur immunhistologischen Markierung von T-Zellen in Gewebeschnitten. So wurde auch in dieser Arbeit die immunhistologische Färbung von CD3 zur Markierung und Evaluation von tumorinfiltrierenden T-Zellen verwendet.

In Studien, die CD3 in Ovarialkarzinomen untersuchten, wurden unter anderem CD3-positive (CD3+) TIL als signifikante, unabhängige Prädiktoren für das Gesamtüberleben gefunden [45].

#### 1.5.1.8. CD8

CD8 ist ein Protein, das in die Zellmembran von zytotoxischen T-Zellen eingelagert und für diesen Zelltyp und seine direkten Vorläufer charakteristisch ist.

Es ist ein Erkennungsmolekül, das an den MHC-I-Komplex (Major Histocompatibility Complex) bindet. CD8 spielt im Immunsystem eine wichtige Rolle, da Abwehrzellen mit seiner Hilfe körpereigene von körperfremden Peptiden unterscheiden können.

Antigene, die T-Zellen über den TCR erkennen, werden von antigenpräsentierenden Zellen (APC) angeboten. Um dann eine stabile Bindung der T-Zelle an die APC ausbilden zu können sind sog. Auxilliärproteine nötig, zu welchen CD8 gehört.

In Untersuchungen zu CD8 in Ovarialkarzinomen ergab sich bei Patientinnen mit hoher CD8-Expression ein signifikant höheres Gesamtüberleben (OS) verglichen mit Patientinnen mit niedriger CD8-Expression [46].

#### **1.5.3 PD-L1**

PD-L1 (engl.: programmed death-ligand 1, B7-H1) oder auch CD274 wurde 1999 erstmals beschrieben und ist ein Oberflächenprotein auf verschiedensten Zellen. Es ist ein glykosyliertes Typ-1-Transmembranprotein [47]. PD-L1 bindet mit hoher Affinität an den PD-1-Rezeptor. Diesen findet man auf aktivierten CD4- und CD8-T-Zellen, B-Zellen und myeloischen Zellen [48]. PD-L1 kann von Tumorzellen, tumorassoziierten Makrophagen (TAMs), myeloischen Suppressorzellen (MDSCs), dendritischen Zellen, T-Zellen und B-Zellen exprimiert werden [49].

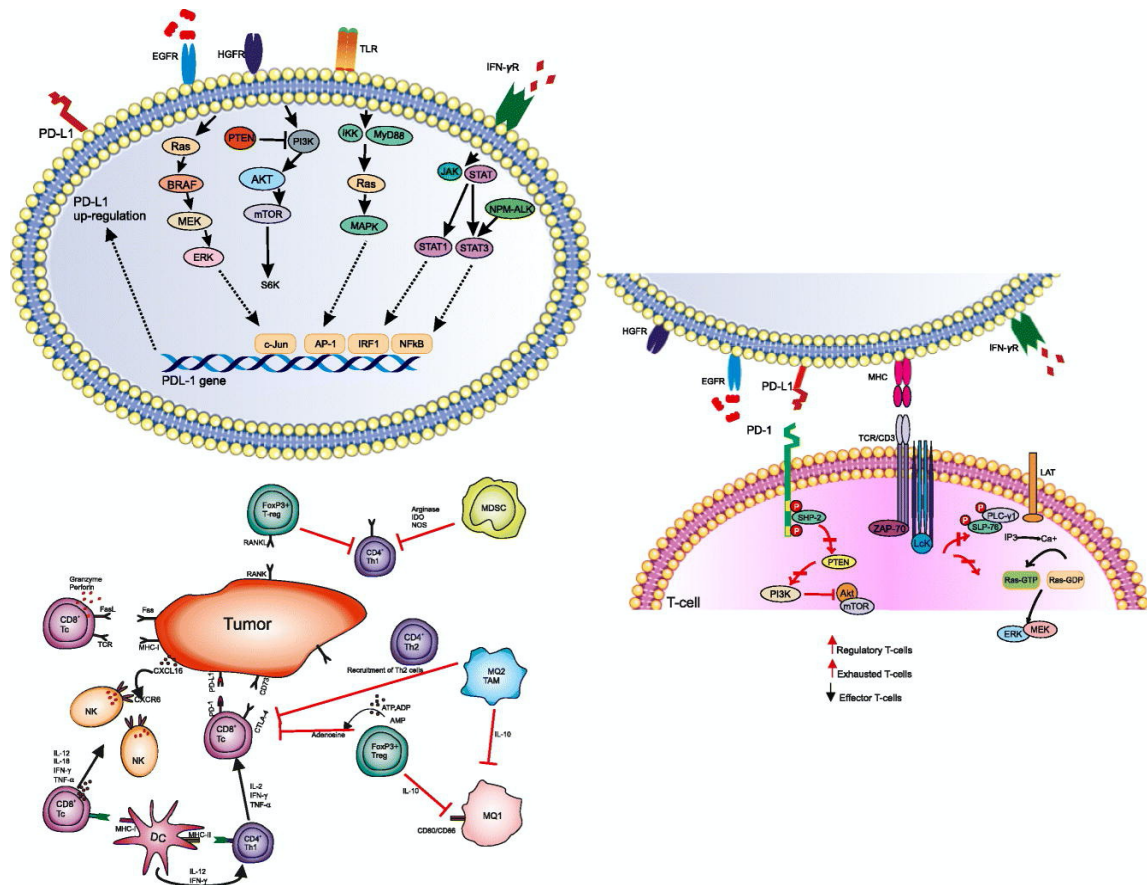


Abbildung 3: PD-1/PD-L1 Achse im Tumormicroenvironment. Lotfinejad et al. 2020.

Die Bindung von PD-L1 an seinen T-Zell-Rezeptor steigert die Produktion von Interleukin-10 (IL-10) in Monozyten und hemmt die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) sowie die T-Zell-Proliferation [47], was eine Einschränkung oder Sabotage der Immunreaktion zur Folge hat. (Abb. 3)

Eine Störung der PD-L1/PD-1-Interaktion durch Antikörper gegen eines der Moleküle (als PD-1-Blockade bezeichnet) kann demnach die T-Zell-Funktion wiederherstellen, was zu verstärkten Immunantworten gegen die zuvor „getarnten“ Tumoren führt [50].

In Studien zu PD-L1 in Ovarialkarzinomen wurde eine Expression sowohl in Tumorzellen als auch in intraepithelialen und stromalen TIL nachgewiesen. Es wird am häufigsten in stromalen TIL exprimiert. PD-L1-exprimierende stromale TIL wurden mit einer erhöhten Gesamtüberlebensrate in Verbindung gebracht und können als günstiger Prognosefaktor bei Ovarialkarzinom, insbesondere serösem Karzinom, dienen [51, 52].

Das krankheitsfreie Überleben sei bei Tumoren mit positiver PD-L1-Expression signifikant länger als in Tumoren ohne PD-L1-Expression [46].

Jedoch gibt es auch Arbeiten die zeigten, dass die PD-L1-Expression in peritonealen Metastasen-Proben signifikant mit ungünstigen prognostischen Faktoren wie einem hohen Proliferationsindex (Ki67) assoziiert ist [53].

Diese zum Teil grundsätzlich gegensätzlichen Aussagen zu der Prognose bei PD-L1-Expression zeigen, dass die PD-1/PD-L1 Achse weiterer Forschung bedarf, da auch die Anti-PD-L1 Therapien bislang nicht den erhofften klinischen Erfolg bringen.

#### **1.5.4 IDO1**

Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) ist ein zytosolisches Häm-enthaltendes Enzym, das am ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Tryptophan (Trp)-Metabolismus beteiligt ist [54-56].

Die Hauptwirkung von IDO1 ist der Abbau von Tryptophan zu Kynurenin und seinen nachgeschalteten Metaboliten. Tryptophan-Depletion ist ein Mechanismus der Immunregulation (Abb. 4), aber auch Tryptophan-Metabolite wie Kynurenin, Kynurensäure, 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthralinsäure können die T-Zell-Funktion aktiv unterdrücken [57]. Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure, die für lebenswichtige Zellfunktionen notwendig ist und für die sowohl neurophysiologische als auch immunologische Funktionen beschrieben wurden. Ihr Abbau durch IDO1 kann einen Tryptophanmangel verursachen. Dieser Mangel kann durch eine Akkumulation von ungeladener Tryptophan-tRNA zum „Verhungern“ der Zellen führen. Ungeladene tRNAs werden von der Stress-Reaktions-Kinase GCN2 erkannt, die dann die T-Zell-Aktivierung verhindert. T-Zellen, bei denen GCN2 genetisch gestört ist, sind in vivo nicht anfällig für eine IDO1-vermittelte Proliferationssuppression, und diese T-Zellen werden nicht durch IDO1-exprimierende dendritische Zellen angeregt [58]. Ein weiterer Effekt der IDO1-vermittelten Tryptophan-Depletion ist die Produktion von Kynurenin, das den Arylkohlenwasserstoff-Rezeptor binden kann. Zu den biologischen Wirkungen der Arylkohlenwasserstoff-

Rezeptoraktivierung gehören die Hemmung der T-Zell-Aktivierung, die Induktion der Treg-Aktivierung und IDO1-Expression in DCs [59-61].

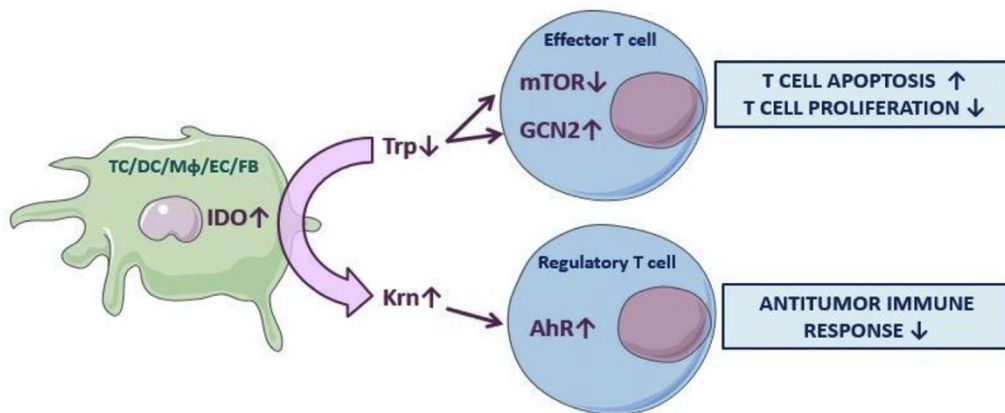


Abbildung 4: Einfluss von IDO1 auf T-Zellen. Brochez et al. 2017.

Obwohl zunächst angenommen wurde, dass IDO1 ausschließlich an der Modulation der angeborenen Immunantwort bei parasitären oder viralen Erkrankungen beteiligt ist [62-64], zeigten spätere Studien, dass IDO1 Teil eines Mechanismus der erworbenen Immuntoleranz sein kann [65]. Bei Krebserkrankungen wurde die IDO1-Expression nicht nur in Tumorzellen dokumentiert, sondern auch in Endothelzellen, Fibroblasten und Immunzellen, die die Tumormikroumgebung infiltrieren. Neben der lokalen Tumormikroumgebung wurde die IDO1-Expression in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) in Blutproben von Krebspatienten nachgewiesen. Obwohl über die IDO1-Expression in diesen verschiedenen Kompartimenten berichtet wurde, sind die genauen Mechanismen für ihre unterschiedlichen Expressionsmuster und ihre Funktionen noch lange nicht vollständig verstanden [66].

Untersuchungen zu IDO1-Expression in Ovarialkarzinomen, und hier vornehmlich dem serösen Subtyp, zeigten an kleinen Kohorten, dass eine hohe IDO1-Expression in Tumorzellen mit einer reduzierten Anzahl von CD8-positiven TIL korrelierte. Patientinnen mit IDO1-Expression hatten im Vergleich zu Patientinnen mit fehlender IDO1-Expression ein signifikant beeinträchtigt Gesam- und progressionsfreies Überleben [67-69].

In Ovarialkarzinomen konnte gezeigt werden, dass die tumorale IDO1-Expression die peritoneale Aussaat von Eierstockkrebs durch Unterdrückung der tumorinfiltrierenden T-Zellen und der Rekrutierung natürlicher Killerzellen begünstigt. Zudem fördere die IDO1-Expression eine reziproke Verstärkung immunsuppressiver Zytokine im Aszites, wodurch eine immuntolerierende Umgebung in der Bauchhöhle geschaffen werde [70].

In Zellversuchen konnte zudem gezeigt werden, dass 1-Methyl-Tryptophan (1-MT), ein IDO1-Inhibitor, die Invasion von Carboplatin-resistenten Eierstockkrebszellen durch Herunterregulierung der IDO1-Expression hemmt, was zu einer Reaktivierung der Immunzellfunktion führte [71].

### **1.6 Vorgängerstudien mit kombinierten Analysen von PD-L1 und IDO1**

In einer 2018 veröffentlichten Studie von Mills et al. [68] wurde bereits sowohl PD-L1 als auch IDO1 an einem kleinen Kollektiv an HGSC untersucht. Dabei handelte es sich um ein Kollektiv von ausschließlich afro-amerikanischen Patientinnen.

Es wurde gezeigt, dass die Mehrheit der PD-L1-positiven Fälle IDO1 koexprimierte. Die PD-L1- und IDO1-Expression war mit höheren CD8- und FOXP3-Werten verbunden. Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen PD-L1, IDO1 und dem Überleben beobachtet, wobei sich ein Trend zum verbesserten Outcome und medianem Überleben bei PD-L1 und gleichzeitiger IDO1-Positivität zeigte. Daraus wurde geschlossen, dass die Koexpression von PD-L1 und IDO1 ein mögliches Target für eine duale Immuntherapie darstellen könnte.

## 1.7 Ziele dieser Arbeit

Die 5-Jahres-Prognose nach Diagnose eines Ovarialkarzinoms ist immer noch sehr schlecht und liegt bei 41%. Daher ist es sinnvoll, weitere Therapieangriffspunkte in der Biologie der Tumorzellen zu finden. Das Tumormicroenvironment, im Speziellen die hier untersuchten Marker PD-L1, IDO1 und die TIL, könnte sich entscheidend auf die Prognose und die möglichen Therapieoptionen auswirken.

In bisherigen Studien wurden diese Marker jedoch nur an kleineren Kollektiven untersucht, die jedoch in der Mehrzahl zuvor nicht histologisch einwandfrei reklassifiziert wurden. Eine klare Diagnose des histologischen Subtyps ist essenziell für die Prognose und das Therapieregime.

Wir analysieren in dieser Arbeit Bestandteile des Tumormicroenvironments der HGSC des weiblichen Genitale an einem großen, durch sorgfältige immunhistochemische Re-Klassifikation bereinigten Kollektiv mit einem Follow-Up von fast 20 Jahren. Insbesondere analysieren wir die Biomarker-Expression von PD-L1 und IDO1 im Zusammenspiel mit Tumordinfiltrierender Lymphozyten.

Dabei wollen wir folgende Hypothesen überprüfen:

1. Überprüfung und Anwendbarkeit des Klassifizierungsalgorithmus in Anlehnung an Köbel et al.
2. Patientinnen mit einer sehr präsenten Immunantwort und reichlich TIL haben ein verbessertes OS und PFS.
3. Die Prognose unterscheidet sich nach Subtypen der TIL und deren Verteilungsmuster im Stroma und/oder intratumoral.
4. Eine hohe PD-L1-Expression geht mit einer verbesserten Prognose einher und wird vor allem in Tumoren mit vielen TIL gefunden.
5. Die Expression von PD-L1 und IDO1 haben gemeinsam Einfluss auf die Prognose.



Dabei ergeben sich zusätzlich folgende Fragen:

Gibt es außerdem einen vernünftigen, therapeutisch anwendbaren Grenzwert für die PD-L1-Expression bei HGSC, da die Anti-PD-L1-Medikamente derzeit bei diesen Tumoren nur schwach ansprechen? Können und sollen wir die PD-L1-Expression mit TIL-Werten und der daraus folgenden Charakterisierung von immunologisch „heißen“ und „kalten“ Tumoren aufgrund möglicher prognostischer Effekte kombinieren, da PD-L1 aufgrund möglicher prognostischer TIL-Effekte nur bei immunologisch „heißen“ Tumoren wirksam ist? Und schließlich, weisen unsere Ergebnisse auf möglicherweise sinnvolle Kombinationsansätze für Therapien des HGSC mit PD-L1-Inhibitoren hin, welche zu derzeitigen modifizierten Strategien mit Bevacizumab (Anti-Angiogenese) oder PARP-Inhibitoren ergänzt werden können?

Zudem interessiert uns der Vergleich zweier etablierter Scoring-Systeme für PD-L1 und die Gegenüberstellung und Anwendbarkeit der beiden PD-L1-Antikörper Dako 22C3 und AbCam 28-8.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studienkollektiv**

Das zugrundeliegende Kollektiv an Ovarialneoplasien setzt sich aus verschiedenen Teilkollektiven aus Vorgängerstudien zusammen. Diese wurden von Frau Dr. D. Pham, Frau Dr. A. Fischer und Frau Dr. B. Ney aus der Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen zusammengestellt. Dabei handelt es sich um Patientinnen, bei denen im Zeitraum 2000 bis 2009 die Diagnose Ovarialkarzinom (serös, endometrioid, muzinös, BOT, klarzellig) gestellt wurde und in einer zweiten Kohorte, in der von 2009 bis 2016 ein seröses Ovarialkarzinom diagnostiziert wurde. Alle Patientinnen hatten sich daraufhin an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen einer chirurgischen Behandlung unterzogen sowie in 307 Fällen eine adjuvante Platin-enhaltende Chemotherapie erhalten. Die Verlaufsdaten wurden von der Patientenregistrierung des Tübinger Krebszentrums erfasst und zur Verfügung gestellt.

Es handelt sich dabei um in Summe 499 Fälle. Diese wurden anhand des in 2.3. beschriebenen immunhistochemischen Algorithmus den einzelnen histologischen Subtypen zugeordnet. Das Kollektiv an immunhistochemisch klassifizierten Fällen von high-grade serösen Ovarialkarzinomen, welches Grundlage der weiteren Untersuchungen und Berechnungen war, fasste final 392 Fälle.

Die histologischen Schnitte und Tumorblöcke stammen aus dem Archiv des pathologischen Instituts der Universität Tübingen.

### **2.2 Tissue Microarrays**

Zur Untersuchung des Tumorgewebes wurden sogenannte Tissue Microarrays (TMAs) erstellt. Mithilfe dieser lassen sich auf einem Objektträger zahlreiche unterschiedliche Tumorgebe mehrerer Patientinnen gleichzeitig beurteilen.

Zur Erstellung der Tissue Microarrays wurde zunächst aus den mit Formalin fixierten und anschließend in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeblöcken je ein 2,5 µm dünner Schnitt angefertigt. Dieser wurde mit Hämatoxylin und Eosin

gefärbt. Anschließend wurden auf diesen HE-gefärbten Objektträgern die Tumortragenden Areale eingezeichnet. Aus diesen ausgewählten Tumorarealen wurden anschließend am entsprechenden Paraffinblock 0,6 mm durchmessende Stanzen entnommen. Die Stanzzylinder wurden dann mit einem semiautomatischen Tissue Microarray Instrument (Beecher Instruments Sun Prairie, WI, USA) in einen leeren Paraffinblock mit vorgefertigten Stanzlöchern übertragen (Abb. 5). Damit ist es möglich bis zu 360 Gewebeprobe­nen zu beurteilen.

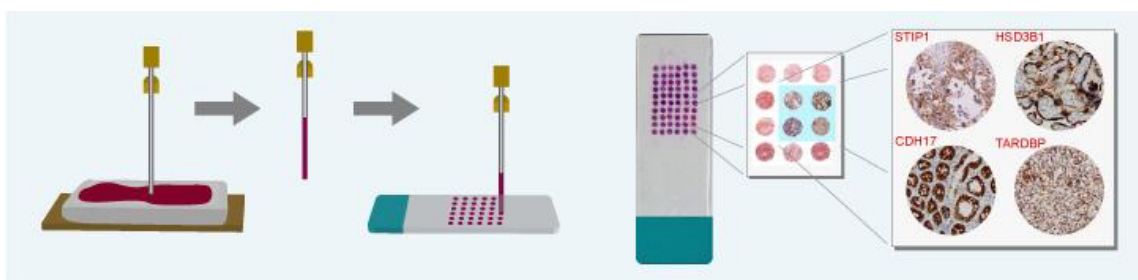


Abbildung 5: Entstehung eines TMA mit anschließender immunhistochemischer Färbung. ([www.abnova.com](http://www.abnova.com))

Jeder Fall wird mit entweder 6 oder 12 Stanzen repräsentiert. Bei Fällen mit 6 Stanzen und bilateraler Tumorausprägung stammen je 3 Stanzen aus dem rechten und drei aus dem linken Ovar. Handelt es sich um einen unilateralen Tumor, so stammen alle 6 Stanzen aus separaten Stellen des Tumors des betroffenen Ovars.

Bei Fällen, die mit 12 Stanzen repräsentiert sind, stammen 6 der Stanzen aus dem Zentrum und 6 aus der Peripherie des Tumors. Als Kontrollgewebe wurden anstatt Tumorgewebe normales Tuben- oder Ovarialgewebe auf die oben beschriebene Art und Weise gewonnen und als interne Kontrolle mit in den TMA-Paraffinblock eingefügt. Für den Fall, dass keine oder nur qualitativ unzureichende Stanzen aus dem Patiententumorblock gewonnen werden konnten, wurde an der vorgesehenen Stelle im TMA-Block Nierengewebe als Platzhalter eingebracht. Anschließend wurden die TMAs bei 56°C für 20 Minuten angeschmolzen, sodass sich Paraffinblock und eingeführte Stanzen verbinden. Zum Abkühlen wurden die Blöcke dann bei 4°C gelagert. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Danach wurden aus den TMA-Blöcken 2,5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf

beschichtete Objektträger (Tomo-Objektträger) aufgezogen, um so für die weitere Bearbeitung und Färbereien zur Verfügung zu stehen.

### 2.3 Re-Klassifizierung

Da sich die diagnostische Einteilung der Ovarialkarzinome seit Beginn der Kohortenzusammenstellung stetig veränderte und es bis 2016 neben morphologischen Kriterien kein einheitliches immunhistochemisches Klassifizierungs-Modell der Ovarialkarzinome gab, wurden 2017 und 2018 alle Fälle der Kohorte in Anlehnung an den immunhistochemischen Klassifizierungsalgorithmus von Köbel et al. [21] re-evaluiert und ggf. neu klassifiziert. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen für WT1, P53, PAX8, Napsin A und Progesteronrezeptor angefertigt und ausgewertet. Die Zuteilung der jeweiligen Diagnose erfolgte dann mittels des folgenden Algorithmus.

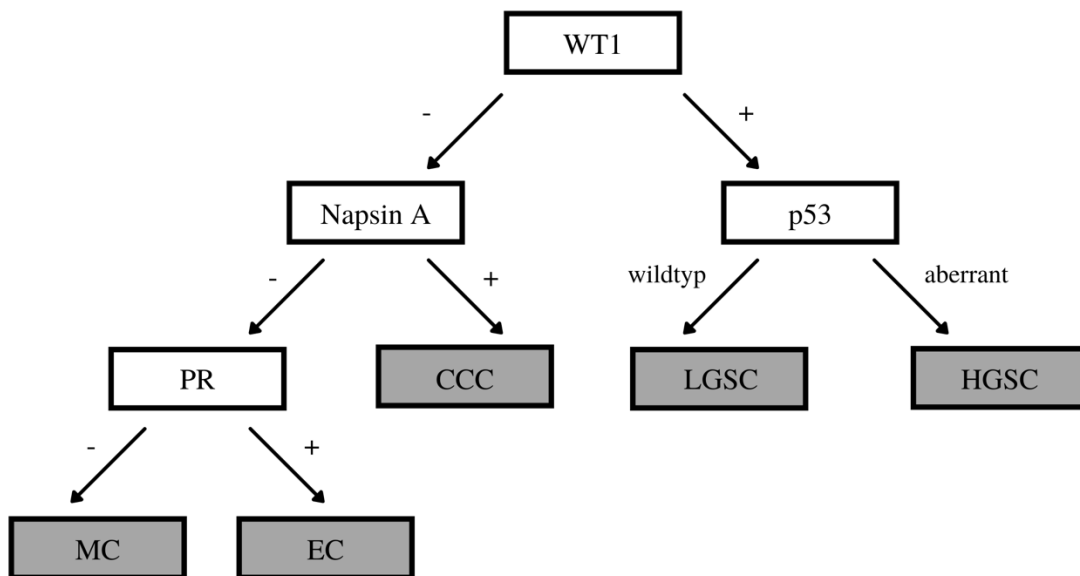


Abbildung 6: Re-Klassifizierungsalgorithmus modifiziert nach Köbel et al. Eigene Darstellung.

Bei der Auswertung der immunhistologischen Daten wurden die in Tabelle 2 gelisteten Auswertungsschemata zu den jeweiligen Markern angewendet.

## 2.4 Immunhistochemie

### 2.4.1 Allgemein

Immunhistochemischen Färbungen liegt das Prinzip der Antikörper-Antigen-Reaktion zu Grunde. Es binden spezifische Antikörper an die darzustellenden Proteine des Gewebes. Die immunhistochemischen Färbungen dieser Arbeit wurden dabei mit dem OptiView DAB ICH Detection Kit in Multimer Technik hergestellt. (Abb. 7)

Dabei bindet im ersten der spezifische Antikörper an das zu untersuchende Antigen. Dieser wird dann durch einen Cocktail an spezifischen polyklonalen Sekundärantikörpern (HQ-Linker) lokalisiert. Durch einen mit HRP-(=engl.: Horse Radish Peroxidase) Enzymen markierten Tertiärantikörper (HRP Multimer) werden die Sekundärantikörper anschließend gebunden. Der daraus entstandene Komplex wird mit einem Wasserstoffperoxidsubstrat und einer 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Substratlösung (DAB) visualisiert, was zu einer braunen Ablagerung führt, die unter dem Lichtmikroskop leicht zu erkennen ist.

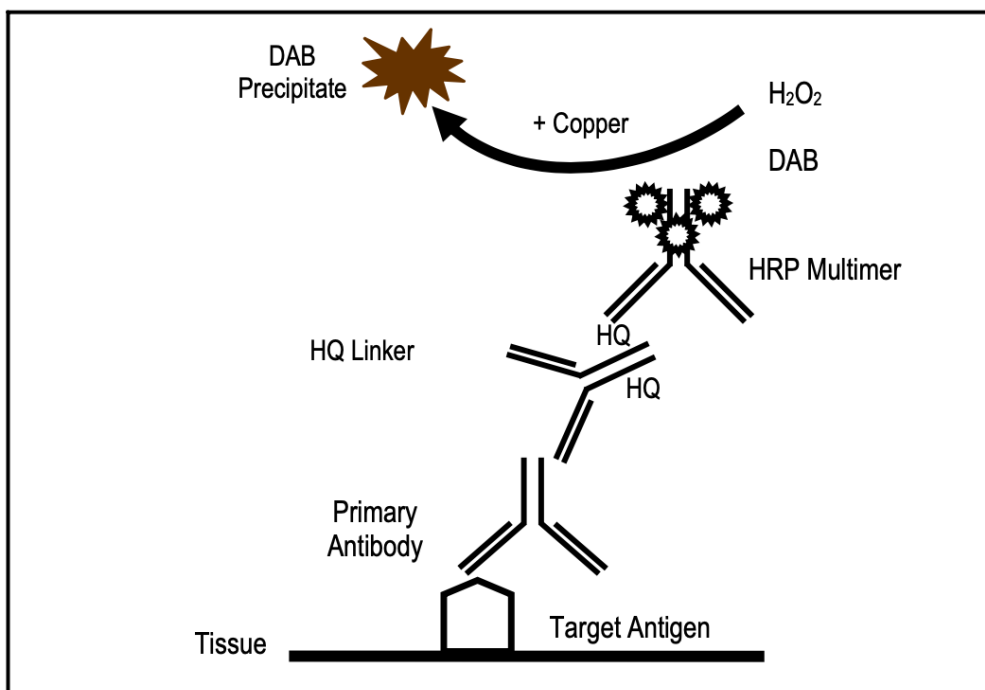


Abbildung 7: Schema OptiView DAB ICH Detection Kit. Datenblatt Ventana Medical Systems Inc. 2011.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit Hilfe der vollautomatischen Immunfärbesysteme Ventana Benchmark XT und Ventana Benchmark Ultra hergestellt, welche Ventana Reagenzien verwenden (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA).

Für den Färbeprozess wurden die Paraffinschnitte zunächst mithilfe eines Waschmittels auf Wasserbasis (EZ Prep) entparaffiniert. Bevor die Antikörper aufgetragen wurden, wurden die Schnitte mit einem Tris-basierten Puffer mit leicht basischen pH zur Antigendemaskierung und hitze-induzierter Epitop-Gewinnung vorbehandelt. Nachdem der entsprechende Antikörper appliziert wurde, betrug die Inkubationszeit 32 min bei 37°C Grad. Darauf folgte die Behandlung mit dem OptiView Detection Kit, welches die Behandlung mit Sekundär- und Tertiärantikörper sowie Diaminobenzidin und Meerrettich Peroxidase (HRP) beinhaltet. Danach wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und „Blueing“ Reagenz gegengefärbt, gewaschen und mittels aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%) und Xylol dehydratisiert. Mit Cytoseal wurden die Schnitte abschließend eingedeckt.

Die Auflistung aller angewandten Antikörper und die jeweiligen Protokolle finden sich in Tabelle 1.

Tabella 1: Verwendete Antikörper und zugehörige Informationen (rtu: ready to use).

Marker (Klon)	Antikörper	Hersteller	Instrument	Verdünnung	Verdünnungsreagenz	Puffer, pH	Detection Kit	Färbung	Kontrollgewebe
<b>WT1</b> (6F-H2)	Monoclonal Mouse Anti-Human Wilms' Tumor 1 (WT1) Protein antibody	Dako/Agilent	Benchmark XT, Ventana	1:250	Antibody Diluent, Zytomed Systems	CC1 (Tris-basierter Puffer, Roche)	optiView DAB Detection Kit, Roche	nukleär	Ovar, Mesotheliom
<b>P 53</b> (DO-7)	Monoclonal Mouse antibody	Novocastra	Benchmark XT, Ventana	1:400	Antibody Diluent, Zytomed Systems	CC1 (Tris-basierter Puffer, Roche)	optiView DAB Detection Kit, Roche	nukleär	Mamma- karzinom
<b>PAX 8</b> (MRQ-50)	Mouse Monoclonal Antibody	Roche	Benchmark Ultra, Ventana	rtu	Antibody Diluent, Zytomed Systems	Ultra CC1 (Tris-basierter Puffer)	optiView DAB Detection Kit, Roche	nukleär	Ovar, Schild- drüsen- karzinom
<b>PR</b> (1 E2)	Rabbit monoclonal primary antibody	Ventana	Benchmark Ultra, Ventana	rtu	Antibody Diluent, Zytomed Systems	Ultra CC1 (Tris-basierter Puffer)	optiView DAB Detection Kit, Roche	nukleär	Leber On- Slide Kontrolle
<b>Napsin A</b> (KCG1.1)	Monoclonal rabbit anti-Napsin A antibody	Zytomed	Benchmark XT, Ventana	1:200	Antibody Diluent, Zytomed Systems	CC1 (Tris-basierter Puffer, Roche)	optiView DAB Detection Kit, Roche	zytoplas- matisch	Pulmo- nales Adeno- karzinom

<b>IDO1</b>	Monoclonal rabbit Anti-Indoleamine 2,3-dioxygenase antibody, ab211017	Abcam	Benchmark XT, Ventana	1:2000	Antibody Diluent, Zytomed Systems	CC1 (Tris-basierter Puffer, Roche)	optiView DAB Detection Kit, Roche	zytoplas matisch	Adeno-karzinom Tuba uterina
<b>CD 3 (SP7)</b>	IgG rabbit antibody	DCS Innovative Diagnostik Systeme	Benchmark XT, Ventana	1:200	Antibody Diluent, Zytomed Systems	CC1 (Tris-basierter Puffer, Roche)	optiView DAB Detection Kit, Roche	membra nös	Tonsille
<b>CD 8 (C8/144B)</b>	Monoclonal Mouse Anti-Human CD8 Antibody, M7103	Dako/Agilent	Benchmark XT, Ventana	1:300	Antibody Diluent, Zytomed Systems	CC1 (Tris-basierter Puffer, Roche)	optiView DAB Detection Kit, Roche	membra nös	Tonsille, Milz
<b>PD-L1 (22C3)</b>	Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1 antibody, M3653	Dako/Agilent	Benchmark XT, Ventana	1:50	Antibody Diluent, Zytomed Systems	CC1 (Tris-basierter Puffer, Roche)	optiView DAB Detection Kit, Roche	membra nös	Tonsille
<b>PD-L1 (28.8)</b>	monoclonal rabbit Anti-PD-L1 antibody, ab205921	Abcam	Benchmark XT, Ventana	1:250 (TMA) 1:100 (Ganz-schnitte)	Antibody Diluent, Zytomed Systems	CC1 (Tris-basierter Puffer, Roche)	optiView DAB Detection Kit, Roche	membra nös	Tonsille



### 2.4.2 Auswertung der Immunhistochemie

Die zur Re-Klassifizierung der Kohorte verwendeten Antikörperfärbungen wurden wie folgt ausgewertet.

WT1, PAX8 und Napsin A wurden nach semiquantitativen Scores, die die Intensität und den prozentualen Anteil gefärbter Tumorzellen berücksichtigen, ausgewertet. WT1 und PAX8 zeigen eine nukleäre Färbung, Napsin A zeigt eine feingranuläre zytoplasmatische Expression. Die genaue Auflistung und Auswertungsschemata der einzelnen Antikörper lassen sich aus Tabelle 2 entnehmen.

Die Färbung gegen p53 wurde nach folgendem Schema ausgewertet: keine Färbung = Score 0, zytoplasmatische Färbung = Score 1, mosaik-artige nukleäre Färbung = Score 2 (Wildtyp-spezifisches Färbemuster) und komplette nukleäre Färbung = Score 3 (siehe auch Abb. 8).

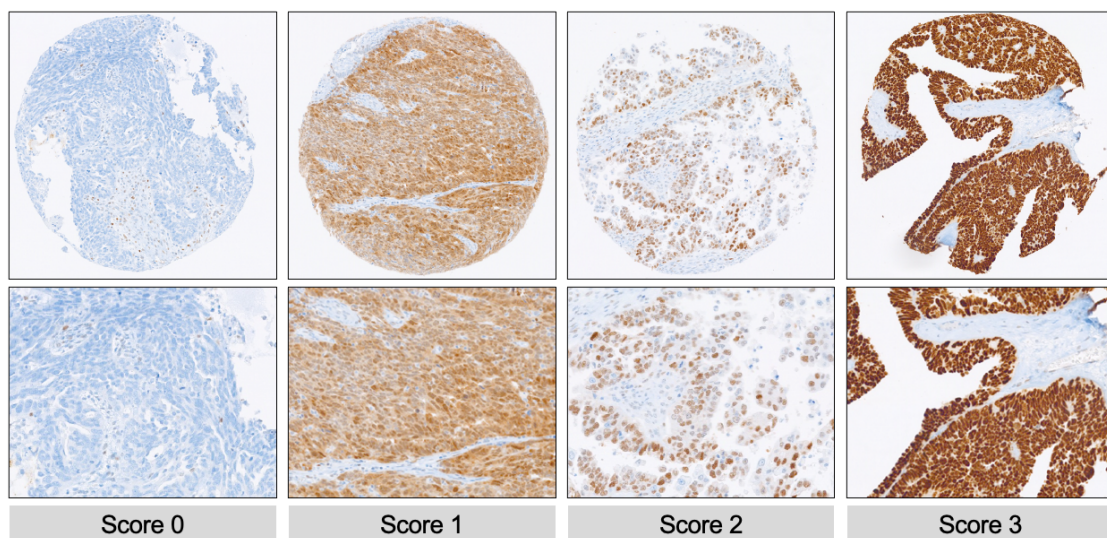


Abbildung 8: Auswertungsschema p53. Eigene Darstellung.

Zur Auswertung des Progesteronrezeptorstatus wurde der Allred Score angewendet (Abb.9). Bei diesem wird sowohl die Intensität als auch die Quantität der gefärbten Zellen beurteilt und ein Score gebildet. Dabei variieren die Intensitäten zwischen keiner Färbung = Score 0, schwache Färbung = Score 1, mäßige Färbung = Score 2 und starke Färbung = Score 3. Zur Quantitätsbeurteilung wird der Prozentsatz positiver Zellen erhoben, dabei wird unterschieden zwischen keinen Zellen = Score 0, <10% positiver Zellen = Score 1, 10-50% positive Zellen = Score 2, 51-80% positive Zellen = Score 3 und >80% positive Zellen = Score 4. Die beiden erhobenen Scores werden addiert und die Summe ergibt das Ergebnis des jeweiligen Allred Scores. Es sind Werte von 0 und 2 bis 8 möglich.

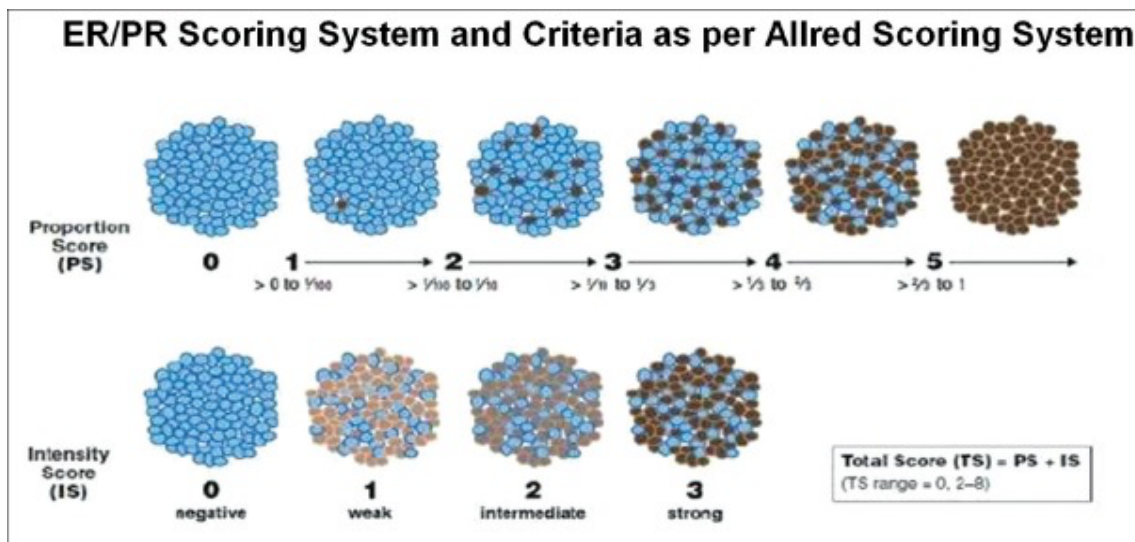


Abbildung 9: Allred Score. Chand et al. 2018.

Die histologischen Marker CD3 und CD8 wurden numerisch ausgewertet. Es wurde die absolute Zahl an gefärbten Zellen pro Hauptgesichtsfeld (high-power field, HPF) erhoben. Hierbei wurden in der 20x-Vergrößerung alle CD3 bzw. CD8 positiven Lymphozyten eines Stanz-Cores gezählt und aufgrund der Core-Größe durch 1,5 geteilt, um die Angabe pro HPF zu ermitteln. Es wurde unterschieden, ob die Lymphozyten epithelial oder stromal lokalisiert waren.

Bei den Färbungen der PD-L1 Antikörper wurde jeweils dem Klon entsprechend, der zugehörige Score ermittelt. Der Klon 22C3 von DAKO-Agilent wurde anhand des Combined Positive Score (CPS) ausgewertet. Dieser berechnet sich aus der Anzahl der PD-L1-positiven Tumor- und Immunzellen (Lymphozyten und Makrophagen) geteilt durch die Gesamtzahl der vorhandenen Tumorzellen, multipliziert mit 100. Dieser Score ist numerisch.

$$CPS = \frac{\text{PD - L1 - positive Zellen (Tumorzellen, Makrophagen, Lymphozyten)}}{\text{Gesamtzahl vitaler Tumorzellen}} \times 100$$

Es wurden dabei für jeden am TMA ausgewerteten Fall der in den verfügbaren Cores jeweils minimale (CPS min.) und maximale (CPS max.) Wert sowie der Mittelwert (mean value, CPS mittel) der CPS-Werte aller Cores erhoben.

$$CPS \text{ mittel} = \frac{\text{Summe aller erhobenen CPS Scores}}{\text{Anzahl der ausgewerteten Cores}}$$

Der Klon 28.8 wurde anhand des Tumor Proportion Score (TPS) ausgewertet. Dieser berechnet sich aus dem Anteil der PD-L1-positiven Tumorzellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der vorhandenen Tumorzellen, multipliziert mit 100. Somit erfolgt die Angabe des Scores in Prozent.

$$TPS (\%) = \frac{\text{PD - L1 - positive Tumorzellen}}{\text{Gesamtzahl vitaler Tumorzellen}} \times 100$$

Dabei wurde ebenfalls für jeden am TMA ausgewerteten Fall der in den verfügbaren Cores jeweils minimale (TPS min.) und maximale (TPS max.) Wert sowie der Mittelwert (mean value, TPS mittel) der TPS-Werte aller Cores erhoben.

$$TPS \text{ mittel} = \frac{\text{Summe aller erhobenen TPS Scores}}{\text{Anzahl der ausgewerteten Cores}}$$

Die Auswertung der IHC-Färbungen von IDO1 erfolgte nach einem semiquantitativen Score. So wurde die relative Anzahl der zytoplasmatisch

gefärbten Tumorzellen und TIL folgendermaßen gewertet: keine gefärbten Tumorzellen oder TIL (0%) = Score 0, 1-5% = Score 1, 5-10% = Score 2, 11-25% = Score 3, 26-50% = Score 4, >50% = Score 5.

Es wurde ebenfalls für jeden am TMA ausgewerteten Fall der in den verfügbaren Cores jeweils minimale und maximale Wert sowie der Mittelwert (mean value, mittel) aller Cores erhoben.

$$IDO1 \text{ mittel} = \frac{\text{Summe aller erhobenen IDO1 Scores}}{\text{Anzahl der ausgewerteten Cores}}$$

Bei den Fällen der einzelnen Patientinnen wurden bis zu 12 Stenzen auf dem TMA ausgewertet. Damit der Fall gewertet wurde, sollten wenigstens eine Stanze als auswertbar eingestuft werden können und mindestens 50 Tumorzellen innerhalb eines Cores zur Auszählung vorhanden sein.

Die Auswertung der Gewebe wurde von zwei Untersucherinnen durchgeführt (N.N. & A.F./A.S.), wobei je eine der genannten beiden Fachärztin für Pathologie ist.

Die exakte Liste aller Auswertungen und deren Systematik findet sich in Tabelle 2.

## **2.5 Statistische Auswertung**

Für die statistische Analyse der erhobenen immunhistochemischen Daten wurden die Fälle, anhand von Tertilen der Ergebnisse, in Untergruppen geteilt und diese in Bezug zu diversen klinischen Parametern und dem Histotyp gesetzt. Die Ermittlung von Korrelationen erfolgte mittels  $\chi^2$ - und Fisher's Exact-Test. Überlebenskurven wurden anhand der Kaplan-Meier-Methode erhoben und mittels log-rank Test verglichen. Für alle Tests konnte die statistische Signifikanz von  $p < 0,05$  definiert werden oder die statistische Signifikanz wurde mit entsprechendem Wert angegeben. Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der SPSS-Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) angefertigt. Durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen wurde diese Studie bewilligt als Teil des Projektes C14 aus dem SFB 685 (Aktenzeichen 645/2012BO2).

Tabella 2: Markerprofil und Auswertungsschemata der Immunhistochemie.

Marker	Färbung nukleär	Färbung zytoplasmatisch	Färbung membranös	Auswertungssystem	Intensität
<b>WT1</b>	ja	-	-	Score: 0 – 3	0 = keine Färbung, 1 = schwach, 2 = mäßig, 3 = stark
<b>P53</b>	ja	z.T.	-	Score: 0 -3	0 = keine Färbung 1 = zytoplasmatisch, 2= mosaik-artig = Wildtyp, 3 = komplett nukleär
<b>PAX8</b>	ja	-	-	Score 0-3	0 = keine Färbung, 1 = schwach, 2 = mäßig, 3 = stark
<b>PR</b>	ja	-	-	Allred Score (siehe Abschnitt 2.4.2)	
<b>Napsin A</b>	-	ja	-	Score 0-2	0 = keine Färbung, 1 = schwach, 2 = deutliche Färbung = Positivität
<b>CD 3</b>	-	-	ja	numerisch, Anzahl gefärbter Zellen pro HPF	
<b>CD 8</b>	-	-	ja	numerisch, Anzahl gefärbter Zellen pro HPF	

<b>IDO1</b>	-	ja	z.T.	Score: 0% = 0, 1-5% = 1, 5-10% = 2, 11-25% = 3, 26-50% = 4, >50% = 5	
<b>PD-L1(22C3)</b>	-	-	ja	TPS (siehe Abschnitt 2.4.2)	Jede
<b>PD-L1 (28.8)</b>	-	-	ja	CPS (siehe Abschnitt 2.4.2)	Jede

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunhistochemische Re-Klassifizierung

In der zunächst durchgeführten Re-Klassifizierung des Kollektivs von Ovarialkarzinomen in Anlehnung an den Algorithmus von Köbel et al. (siehe Abbildung 6) ergaben sich folgende die Zusammensetzung der Tumorentitäten:

Es wurden insgesamt 501 Proben von Ovarialkarzinomen untersucht, davon war in einem Fall kein verwertbares Material vorhanden und in einem weiteren Fall waren keine Informationen zur Originaldiagnose verfügbar.

So wurden von den 499 untersuchten Ovarialkarzinomen 412 als high-grade seröse Ovarialkarzinome (HGSC), 13 als low-grade seröse Ovarialkarzinome (LGSC), 41 als endometrioiden Ovarialkarzinome (EC), 11 als klarzellige Ovarialkarzinome (CCC), 5 als muzinöse Ovarialkarzinome (MC), 2 als seröse Borderline Tumoren des Ovars (BOT), 1 als mischdifferenziertes Ovarialkarzinom mit endometrioiden und high-grade serösen Komponenten und 2 Fälle als Metastasen anderer Primärtumoren re-klassifiziert.

In 12 Fällen waren die Tumoren anhand ihres immunhistologischen Profils mittels Algorithmus nicht eindeutig zuzuordnen. In diesen Fällen ist in einer weiterführenden Studie eine genaue Entitätseinteilung mittels Next Generation Sequencing (NGS) geplant.

Tabelle 3: Gegenüberstellung Originaldiagnose und Re-Klassifizierter Histotyp.

	Re-Klassifizierter Histotyp						Originaldiagnose gesamt	Übereinstimmung (%)
	HGSC	EC	CCC	MC	LGSC	Other		
<b>Originaldiagnose</b>								
<b>HGSC</b>	<b>388</b>	23	8	1	10	12	442	87,8
<b>EC</b>	8	<b>13</b>	0	0	0	3	24	54,2
<b>CCC</b>	1	0	<b>3</b>	0	0	0	4	75
<b>MC</b>	0	0	0	<b>4</b>	0	1	5	80
<b>LGSC</b>	4	2	0	0	<b>3</b>	0	9	33,3
<b>Other</b>	11	3	0	0	0	<b>1</b>	15	
<b>Re-Klassifizierter Histotyp gesamt</b>	412	41	11	5	13	17	<b>499</b>	



Im Folgenden werden die ursprünglichen Diagnosen den finalen Enddiagnosen nach Re-Klassifizierung gegenübergestellt.

In der Re-Klassifizierung konnte anhand des immunhistochemischen Algorithmus in 412 Fällen (87,8%) die Diagnose HGSC gestellt werden. Diese Diagnose wurde gestellt, wenn die immunhistologischen Färbungen (Abb. 10) folgende Kriterien erfüllten:

Die WT1-Färbung weist eine schwache (Score=1), mäßige (Score=2) oder starke nukleäre Färbung (Score=3) auf. Die p53-Färbung weist keine nukleäre (Score=0), eine valide zytoplasmatische (Score=1) oder eine komplette kräftige nukleäre Färbung (Score=3) auf. Zudem weist die PAX 8-Färbung eine schwache (Score=1), mäßige (Score=2) oder starke nukleäre (Score=3) Färbung auf. Napsin A und PR weisen keine Färbung auf (Score=0) und sind somit negativ.

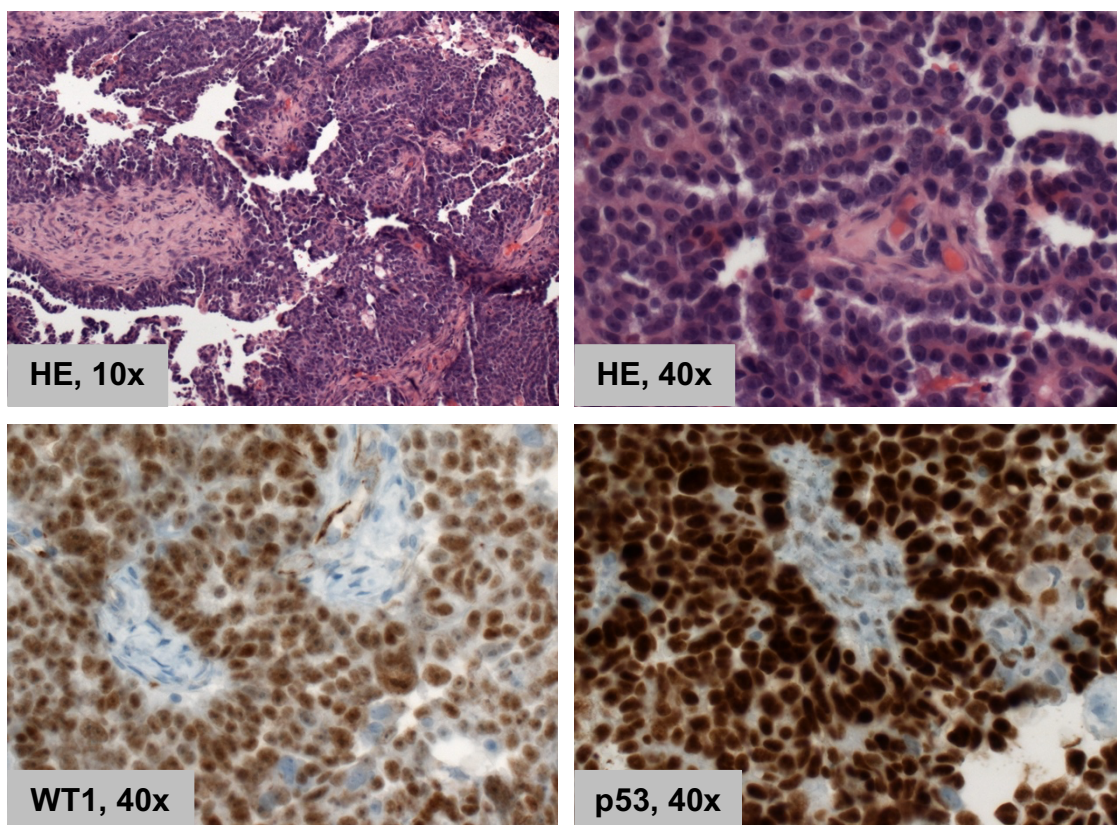


Abbildung 10: Immunhistochemie von HGSC; WT1 positiv (Score=2), p53 mutiert (komplett nukleäre Färbung, Score=3),



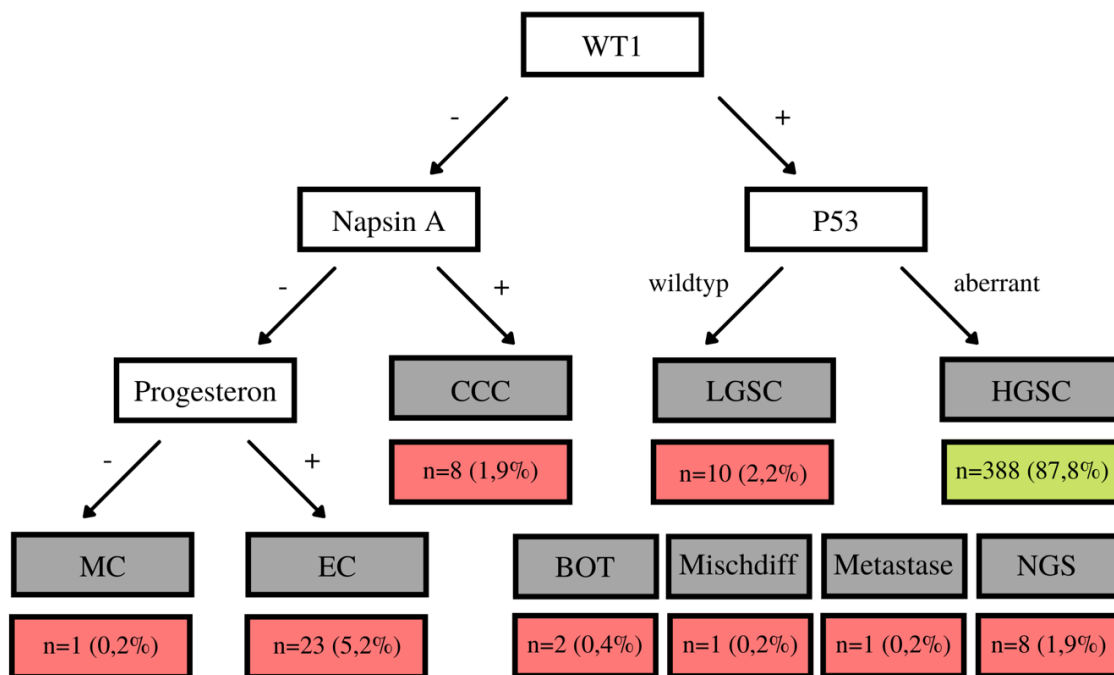


Abbildung 11: Ergebnis Re-Klassifizierung primärer HGSC-Diagnosen.

Von den primär als HGSC klassifizierten Fällen (n=442) konnten 388 (87,8%) als solche bestätigt werden. (Abb. 11)

In 13 Fällen (54,2%) konnte die Diagnose eines EC bestätigt werden. Diese Diagnose wurde gestellt, wenn die immunhistologischen Färbungen (Abb. 12) folgende Kriterien erfüllten:

Die WT1-Färbung weist keine nukleäre Färbung (Score=0) auf. Die Napsin A-Färbung weist keine (Score=0) oder lediglich eine schwache zytoplasmatische Färbung (Score=1) auf die als unspezifisch interpretiert wird. PR weist eine nukleäre Färbung mit einem Allred Score zwischen 2 und 8 auf und gilt somit als positiv.

Zudem weist die p53-Färbung eine mosaik-artige nukleäre (Wildtyp) Färbung (Score=2) auf. Die PAX 8-Färbung zeigt eine schwache (Score=1), mäßige (Score=2) oder starke nukleäre (Score=3) Färbung.

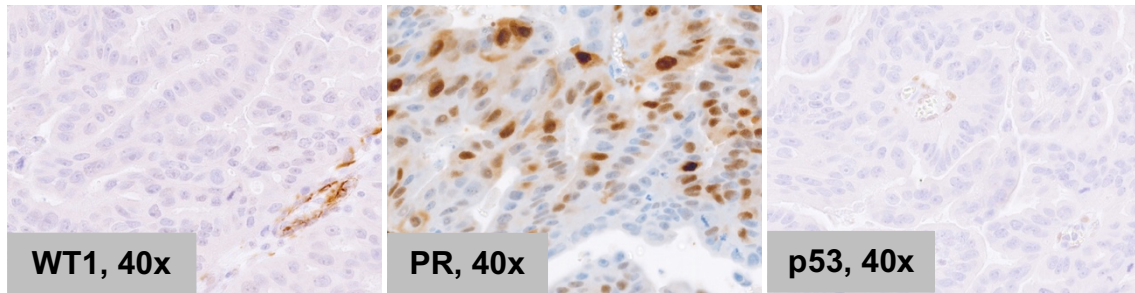


Abbildung 12: Immunhistochemie EC: WT1 negativ (Score=0), PR positiv (Score=6), p53 Wildtyp (Score=2). Eigene Darstellung.

Von den primär als EC klassifizierten Fällen (n=24) wurden anhand des Algorithmus 8 Fälle als HGSC (33,3%) und 1 Fall (4,2%) als Metastase eines anderen Primarius re-klassifiziert. In 2 Fällen (8,3%) soll NGS zur endgültigen Diagnosefindung durchgeführt werden.

Die Re-Klassifizierung der anderen Tumorentitäten erfolgte analog der folgenden Abbildung. (Abb. 13)

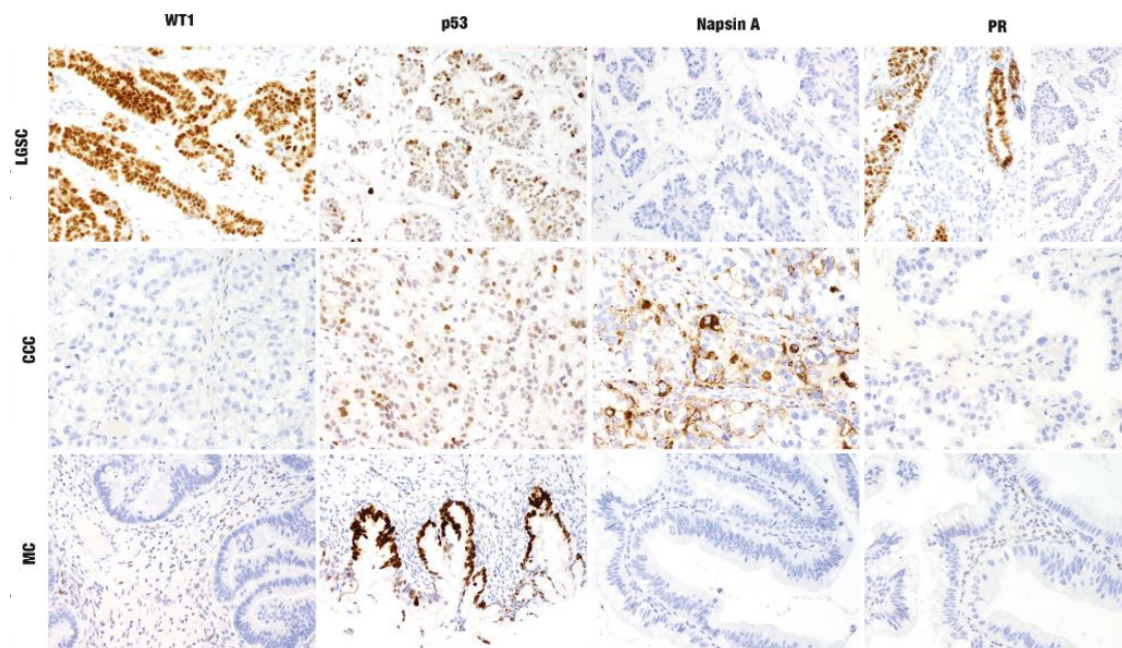


Abbildung 13: Typische immunhistochemische Profile von LGSC, EC und MC; **Erste Reihe:** LGSC mit deutlicher WT1 und wildtypische p53 Expression. Napsin A negativ. PR-Expression in den meisten Fällen. **Zweite Reihe:** CCC mit negativer WT1 Expression. p53 wildtypischer Expression. Napsin A Positivität in fast allen Fällen und in der Regel fehlender PR-Expression. **Dritte Reihe:** MC mit negativer WT1 Expression, aberranter p53 Expression und meist fehlender Napsin A und PR-Expression. Zusammenschnitt aus Kurman RJ et al. 2014, Seite 35.

So wurde die Diagnose eines low-grade serösen Karzinoms (LGSC) bestätigt, wenn sich eine schwache (Score=1), mäßige (Score=2) oder starke nukleäre WT1-Färbung (Score=3) zeigte. Dabei sollte die p53-Färbung eine mosaik-artige nukleäre Färbung (Score=2, Wildtyp-spezifisch) aufweisen. Die PAX 8-Färbung sollte eine schwache (Score=1), mäßige (Score=2) oder starke nukleäre (Score=3) Färbung zeigen. Napsin A und PR sollte negativ bleiben (Score=0).

Die Diagnose klarzelliges Ovarialkarzinom (CCC) wurde gestellt, wenn sich keine WT1 Färbung (Score=0) zeigte und die Napsin A-Färbung hingegen eine mindestens moderate zytoplasmatische Färbung (Score=2) aufwies. PR zeigte keine nukleäre Färbung auf (Score=0) und war somit negativ. Zudem wies die p53-Färbung eine mosaik-artige nukleäre (Wildtyp) Färbung (Score=2) auf. Die PAX 8-Färbung zeigte eine schwache (Score=1), mäßige (Score=2) oder starke nukleäre (Score=3) Färbung.

Ein Fall wurde als muzinöses Ovarialkarzinom (MC) klassifiziert, wenn sich keine nukleäre WT1-Färbung (Score = 0), keine zytoplasmatische Napsin A-Färbung (Score=0) und keine nukleäre PR-Färbung (Allred Score=0) zeigte. Dabei wies die p53-Färbung eine mosaik-artige nukleäre (Wildtyp-spezifische) Färbung (Score=2) und die PAX 8 Färbung eine schwache (Score=1), mäßige (Score=2) oder starke (Score=3) Färbung auf.

In der Gruppe der primär als LGSC klassifizierten Karzinome (n=9) konnten lediglich 3 Fälle (33,3%) bestätigt werden. 4 Fälle (44,4%) wurden als HGSC und 2 Fälle (22,2%) als EC re-klassifiziert.

Die Fälle mit der Ursprungsdiagnose CCC (n=4) hingegen konnten in 75% als solche bestätigt werden lediglich ein Fall (25%) wurde als HGSC re-klassifiziert. In der Gruppe der primär als MC klassifizierten Tumoren konnten diese Diagnosen bestätigt werden. In einem Fall jedoch konnte keine klare Diagnose ausgemacht werden und es soll eine NGS-Analyse folgen. In der aktuellen WHO Klassifikation [8] ist kein einheitliches Grading für MC etabliert. Daher wurde bei der Re-Klassifizierung keine Unterscheidung hinsichtlich des Tumor- Grades vorgenommen.

Eine Auflistung der Markerprofile und den so klassifizierten Histotypen inklusive Fallzahlen finden sich in Tabelle 4.

*Tabelle 4: Markerexpression nach Histotyp.*

<b>Marker</b>	<b>HGSC</b> n=413	<b>EC</b> n=41	<b>CCC</b> n=11	<b>MC</b> n=5	<b>LGSC</b> n=13
<b>WT1, positiv</b>	99,0% (n=409)	9,8% (n=4)	0% (n=0)	0% (n=0)	100% (n=13)
<b>p53, aberrant</b>	94,2% (n=389)	39,0% (n=16)	36,4% (n=4)	20,0% (n=1)	7,7% (n=1)
<b>PAX8, positiv</b>	97,1% (n=401)	68,3% (n=28)	90,9% (n=10)	40,0%(n=2)	92,3% (n=12)
<b>PR, positiv</b>	76,5% (n=316)	65,9% (n=27)	0% (n=0)	0% (n=0)	53,8% (n=7)
<b>Napsin A, positiv</b>	1,0% (n=4)	2,4% (n=1)	90,9% (n=10)	0% (n=0)	0% (n=0)

In den Originaldiagnosen der Fälle zeigten sich 14 Fälle als mischdifferenziert. Diese gliederten sich in folgende Komponenten auf: zwei Fälle mit serösen und endometrioiden Anteilen, zwei Fälle mit serösen und klarzelligen Anteilen, zwei Fälle mit serösen und undifferenzierten Anteilen, zwei Fälle mit serösen und transitionalzelligen Anteilen, ein Fall mit klarzelligen und undifferenzierten Anteilen, ein Fall mit muzinösen und serösen Anteilen, zwei Fälle mit klarzelligen und endometrioiden Anteilen und ein Fall mit endometrioiden und muzinösen Anteilen. In einem Fall wurde ursprünglich sowohl eine gering differenzierte, endometrioide als auch eine anaplastische Karzinom-komponente beschrieben.

Die Ergebnisse der Re-Klassifizierung der primär als mischdifferenziert diagnostizierten Ovarialkarzinome finden sich in Tabelle 5.

*Tabelle 5: Re-Klassifizierung primär als mischdifferenziert diagnostizierter Ovarialkarzinome.*

<b>Ursprungsdiagnose</b>	<b>Re-Klass</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
<b>mischdifferenziert</b>		n=14	
	HGSC	n=9	64,4%
	EC G3	n=1	7,1%
	EC G2	n=2	14,3%
	EC G1	n=1	7,1%
	NGS	n=1	7,1%

### **3.2 Kollektiv zur Biomarkeranalyse**

Die finalen Auswertungen der Biomarker (PD-L1, IDO1) sowie der Lymphozytenmarker (CD3, CD8) erfolgte anschließend an Fällen, die immunhistologisch als HGSC klassifiziert bzw. re-klassifiziert wurden.

Die mittlere Follow-Up-Zeit dieses Kollektivs betrug 52,62 Monate (min. 0,13 Monate, max. 236,78 Monate; SD: 49,9; 95%-KI des Mittelwerts: 47,66 - 57,57).

Die eingeschlossenen Patientinnen wurden auf neoadjuvante und adjuvante Therapie sowie, falls verfügbar, auf den BRCA-Status untersucht.

Von 412 (re-)klassifizierten HGSC erhielten 20 (4,9%) eine neoadjuvante Chemotherapie und wurden anschließend von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Schließlich bestand die Kohorte mit Follow-Up aus maximal 387 HGSC-Patientinnen.

Von diesen Patientinnen erhielten 307 eine adjuvante Chemotherapie (79,3%) (n=50 unbekannt, n=30 keine Chemotherapie).

Die meisten Patientinnen, die Daten für Analysen lieferten (63,8%), waren postmenopausal (n=140 <60 Jahre; n=247 >60 Jahre).

### 3.3 PD-L1 und tumorinfiltrierende Lymphozyten in high-grade serösen Ovarialneoplasien

#### 3.3.1 Einfluss der CD3-positiven TIL-Population auf das kumulative Überleben

Zunächst untersuchten wir die CD3-Expression im Kollektiv. Hierzu wurde die absolute Anzahl der CD3 positiven Lymphozyten pro HPF ermittelt. (Abb. 14)

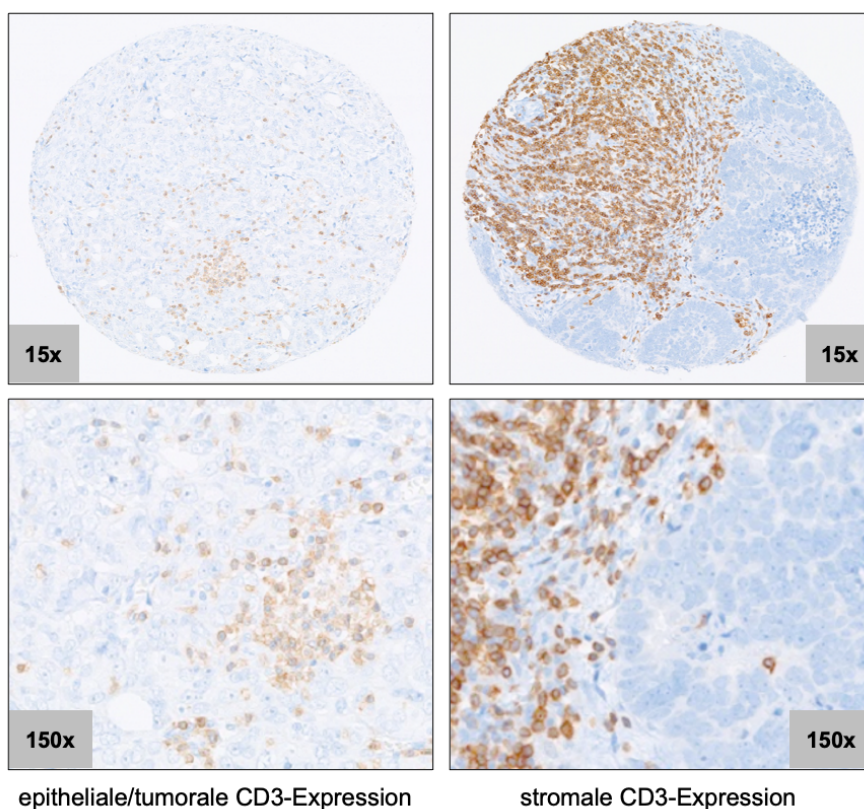


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbungen CD3-Expression. Eigene Darstellung.

CD3-positive Lymphozyten wurden in intratumorale/epitheliale und stromale unterteilt. Außerdem wurde eine integrierte Gesamtzahl pro Fall berechnet. Die CD3-positiven TIL-Werte reichten insgesamt von 0 bis 344/HPF pro Fall.

Die weiteren Wertespannen der jeweiligen Untergruppen sind in folgender Tabelle (Tab. 6) gelistet.

Tabelle 6: Ranges CD3+ TIL nach Minimal-, Maximal- und Mittelwert.

TIL CD3+	Min	Max	Mittel
<i>CD3 epithelial</i>	0-80/HPF	0-133/HPF	0-117/HPF
<i>CD3 stromal</i>	0-2/HPF	0-333/HPF	0-89/HPF
<i>CD3 total (stromal + epithelial)</i>	0-80/HPF	0-344/HPF	0-158/HPF

Für die weiteren Berechnungen des mittleren Gesamtüberlebens und der Verteilung der Lymphozytenquantität pro Fall wurde das Kollektiv in Tertile unterteilt.

Die Mittelwerte der epithelialen CD3-positiven Lymphozyten ergaben eine obere Tertile (top tertile) mit n=118 Fällen und einer Range an CD3 positiven Lymphozyten von 14 bis 117/HPF, eine mittlere Tertile (middle tertile) mit n=135 Fälle und einer Range von 6 bis 13 CD3-positiven Lymphozyten pro HPF und ein unteres Tertil (bottom tertile) mit n=126 Fälle und einer Range von 0 bis 5/HPF (Fälle total n=379).

Für die Mittelwerte der epithelialen/intratumorale TIL-Untersuchung (CD3 Epi Average) konnten wir die relevantesten Unterschiede feststellen (Abb. 15). Es zeigten sich signifikante Unterschiede beim medianen Überleben zwischen den unterschiedlichen Tertilen nach CD3-positivem Lymphozytenaufkommen ( $p < 0,001$ ). Die Fälle der oberen CD3-Tertile wies ein deutlich besseres medianes Gesamtüberleben (1569 Tage), gegenüber der mittleren (967 Tage) und der unteren Tertile (926 Tage) auf.

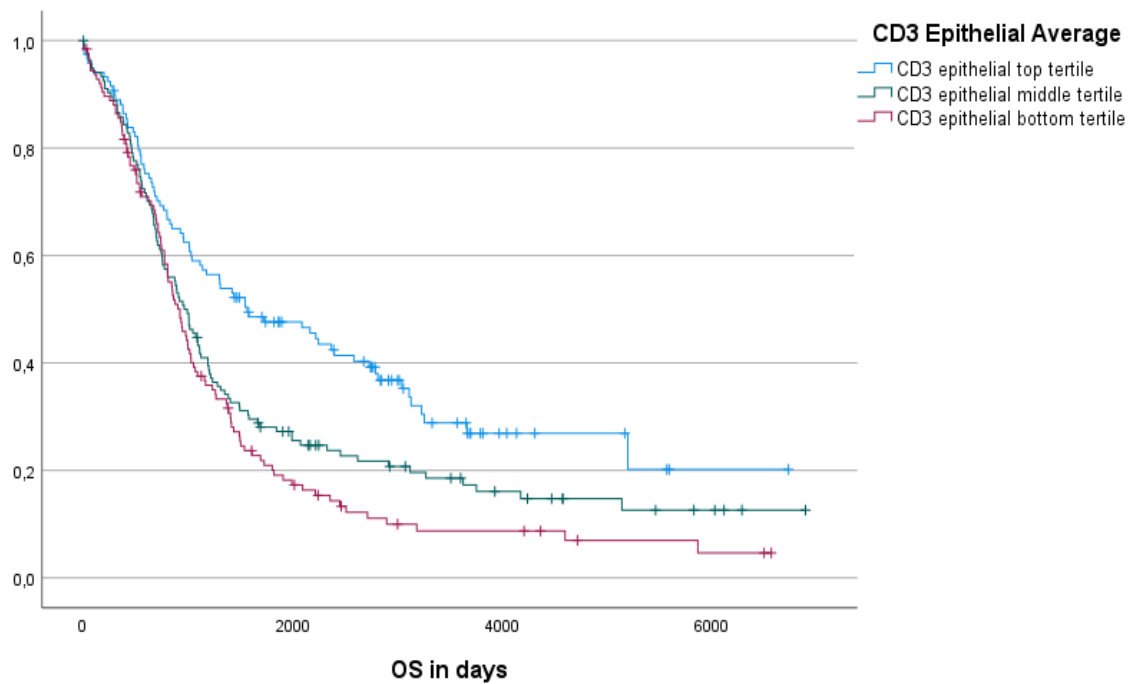


Abbildung 15: Gesamtüberlebenskurven (overall survival) bezogen auf die CD3-Expression.  $p < 0,001$ .



Bezogen auf die stromale Verteilung der CD3-positiven Lymphozyten oder die Gesamtzahl der CD3-positiven Lymphozyten (epithelial und stromal zusammen), aufgetrennt nach Durchschnitt und Maximalwert je Fall, konnte ebenfalls eine Tendenz zu prognostisch günstigeren Überlebensverläufen der Lymphozytenreichsten Tertile in allen Berechnungen beobachtet werden, wenngleich die Kurvenauftrennung im Vergleich zum Mittelwert der epithelial vorkommenden CD3-positiven Lymphozyten nicht so deutlich heraus gestellt wird und es immer wieder zu Kurvenüberschneidungen der Tertilenkurven kommt. (Abb. 16)

Dennoch waren alle Berechnungen statistisch signifikant (CD3 stroma max.  $p=0,059$ ; CD3 stroma mittel  $p=0,041$ ; CD3 gesamt max. und CD3 gesamt mittel jeweils  $p<0,001$ ).

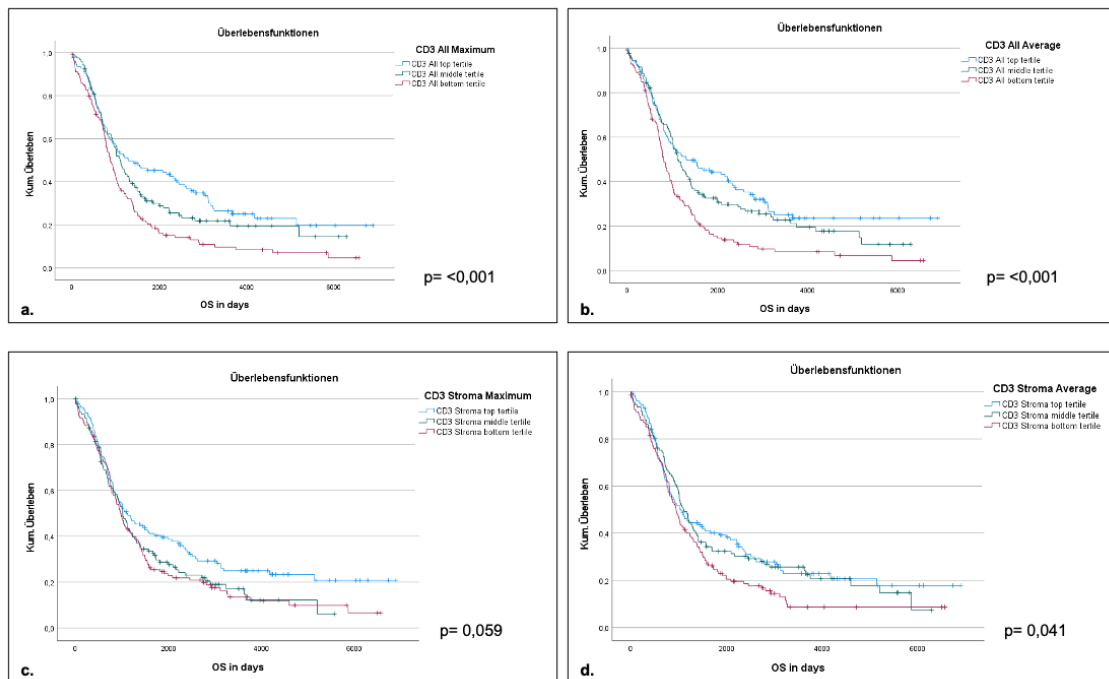


Abbildung 16: Gesamtüberlebenskurven CD3-Expression ausgewertet nach **a.** Maximalwerte TIL Gesamt (stromal + epithelial), **b.** Durchschnittswerte TIL Gesamt (stromal + epithelial), **c.** Maximalwerte stromale Expression, **d.** Mittelwerte stromale Expression.

### 3.3.2 Einfluss der CD8-positiven TIL-Population auf das kumulative Überleben

Anschließend wurde die CD8-Expression im Kollektiv untersucht. Hierzu wurde die absolute Anzahl der CD8 positiven Lymphozyten pro HPF zu ermittelt. Es wurde unterschieden, ob die Lymphozyten epithelial oder stromal lokalisiert waren (CD8 Epi vs. CD8 Stroma). (Abb. 17)

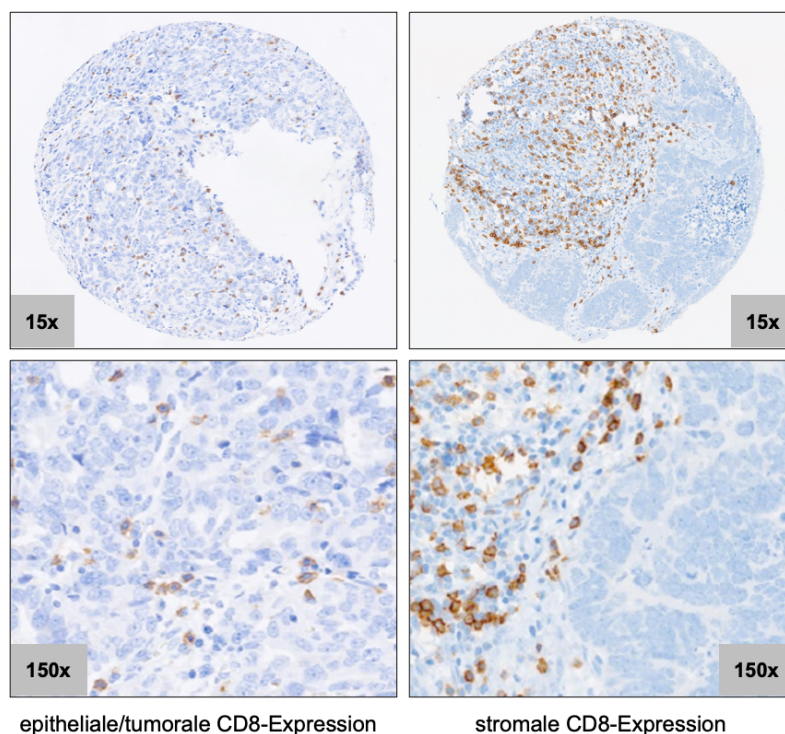


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbungen CD8-Expression. Eigene Darstellung.

Die Zahlen der CD8-positiven Lymphozyten reichten im Gesamten von 0 bis 180/HPF pro Fall.

Die weiteren Wertespannen der jeweiligen Untergruppen sind in folgender Tabelle (Tab. 7) gelistet.

Tabelle 7: Ranges CD8+ TIL nach Minimal-, Maximal- und Mittelwert.

TIL CD8 +	Min	Max	Mittel
CD8 epithelial	0-80/HPF	0-100/HPF	0-95/HPF
CD8 stromal	0-44/HPF	0-133/HPF	0-79/HPF
CD8 total (stromal + epithelial)	0-80/HPF	0-180/HPF	0-113/HPF

Auch hier wurde das Kollektiv in Tertile unterteilt.

Für die Mittelwerte der epithelialen CD8 positiven TIL ergab sich eine obere Tertile (top tertile) mit n=129 Fällen und einer Range an CD8 positiven Lymphozyten von 11 bis 95/HPF, eine mittlere Tertile (middle tertile) mit n=115 Fälle und einer Range von 5 bis 10 CD8 positiven Lymphozyten pro HPF und eine untere Tertile (bottom tertile) mit n=137 Fälle und einer Range von 0 bis 4/HPF (Fälle total n=381).

Bei den CD8 positiven Lymphozyten konnten wir im Vergleich zu CD3 ähnliche Ergebnisse feststellen. Es zeigten sich ebenfalls bei den Mittelwerten der epithelialen TIL-Untersuchung die relevantesten Unterschiede (Abb. 18). Wir konnten zeigen, dass das Gesamtüberleben signifikante Unterschiede je nach Quantität des CD8-positiven Lymphozytenaufkommens aufwies. So zeigten die Fälle der oberen Tertile ein deutlich besseres Gesamtüberleben mit 1548 Tagen, gegenüber der mittleren mit 1078 Tagen und der unteren Tertile mit 813 Tagen.

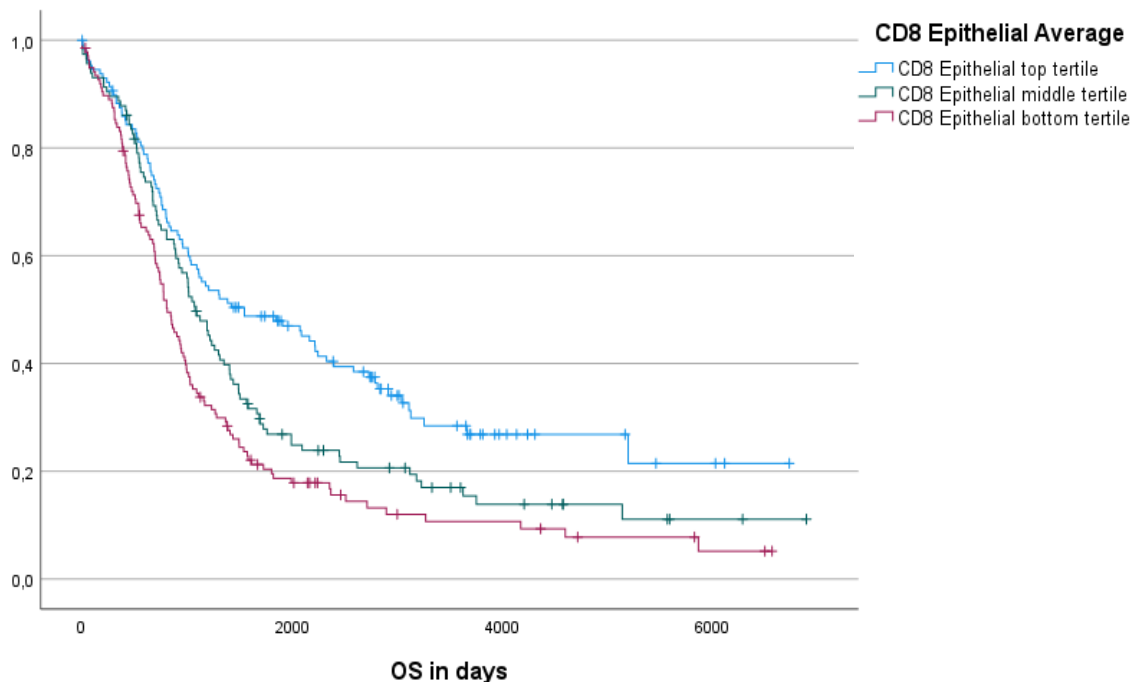


Abbildung 18: Gesamtüberlebenskurven (overall survival) bezogen auf die CD8-Expression.  $p < 0,001$ .

Die Kurvenverläufe der stromalen und der summierten CD8-positiven Lymphozyten zeigen gleichfalls eine Tendenz zu verlängertem medianem Gesamtüberleben bei Tumorpatientinnen der oberen und mittleren TIL-Tertile, wenngleich auch hier die Kurven teilweise überlagern. Die Werte für CD8 stroma max. und CD8 gesamt max. sowie CD8 gesamt mittel waren jeweils signifikant ( $p=0,004$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,001$ ), wohingegen die Berechnungen für CD8 stroma mittel keine Signifikanz zeigten ( $p=0,096$ ). (Abb. 19)

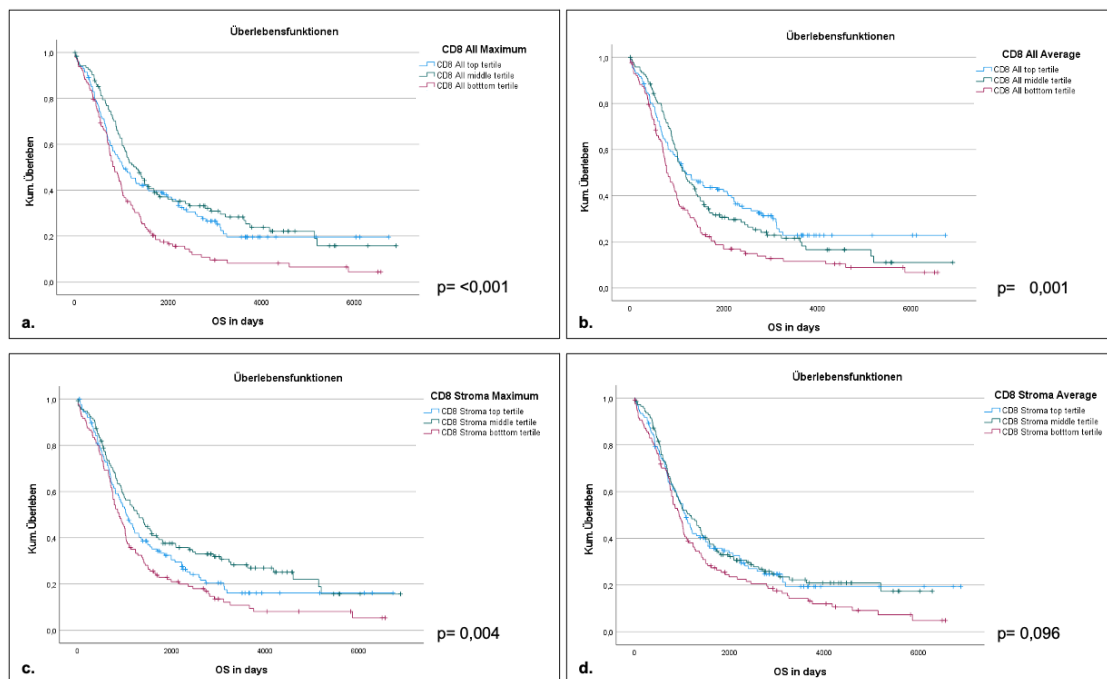


Abbildung 19: Gesamtüberlebenskurven CD8-Expression ausgewertet nach **a.** Maximalwerte TIL gesamt (stromal + epithelial), **b.** Durchschnittswerte TIL gesamt (stromal + epithelial), **c.** Maximalwerte stromaler Expression, **d.** Mittelwerte stromaler Expression.

### 3.3.3 PD-L1-Expression in high-grade serösen Ovarialneoplasien

#### 3.3.3.1 CPS mit DAKO-Agilent Antikörper

Die PD-L1 Auswertung anhand des CPS erfolgte wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben. Dabei wurden die Anzahl der PD-L1-positiven Tumor- als auch der Immunzellen (Lymphozyten und Makrophagen) berücksichtigt.

Repräsentative Bilder der unterschiedlichen Cut-Offs finden sich in Abbildung 20.

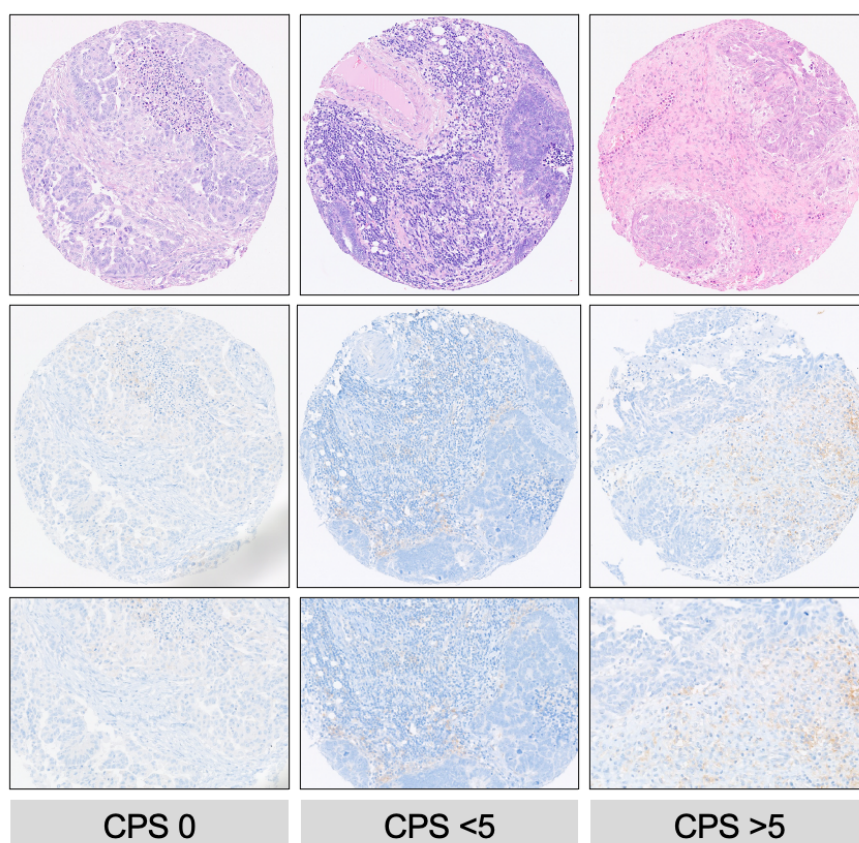


Abbildung 20: PD-L1-Expression (DAKO 22C3) in HGSC: **CPS 0** (HE in 15x und CPS max. 0, in 15x, 20x), **CPS <5** (HE in 15x, CPS max. 13 in 15x, 20x), **CPS >5** (HE in 15x und CPS max. 40 in 15x, 20x). Eigene Darstellung.

Innerhalb unseres Kollektivs an 412 HGSC-Fällen generierten wir für 392 Patientinnen PD-L1-Daten unter Verwendung des DAKO-Antikörpers 22C3. 20 Fälle waren aus technischen Gründen nicht auswertbar. Für einige weitere Fälle waren keine Follow-Up Daten verfügbar, sodass 387 Fälle in die finale Auswertung gingen. Die meisten Fälle zeigten sich negativ oder mit einem CPS-Maximalwert von <1 (n=278; 71,8%). 28,2% der Fälle jedoch zeigte eine PD-L1-Expression mit einem CPS-Maximalwert  $\geq 1$  (Chi Quadrat = 0,608).

Für den CPS-Maximalwert setzen wir folgende Grenzwerte fest: 0 und < 1 (n=278; 71,8%), 1–5 (n=61; 15,8%) und > 5 (n=48; 12,4%). Die Spanne des CPS-Maximalwerts reichte von 0 bis 70, die des CPS-Minimalwerts von 0 bis 10 und die des CPS-Mittelwerts von 0 bis 13 pro Fall.

276 Patientinnen hatten das FIGO-Stadium III (71,3%) und 65 (16,8%) FIGO IV zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit einer relativ homogenen Verteilung von PD-L1 exprimierenden Tumoren in jeder der CPS-Cut-off-Gruppen. Für vier Patientinnen waren keine Daten zum FIGO-Stadium verfügbar (1%).

Eine hohe PD-L1-Expression mit einem CPS-Maximalwert >5 war mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine vollständige Resektion verbunden. (Tab. 8)

*Tabelle 8: PD-L1-Expression anhand CPS und klinische Parameter (Alter, FIGO Status, Resektionsstatus, OS und DFS).*

	<b>CPS 0</b>	<b>CPS &lt;1</b>	<b>CPS 1-5</b>	<b>CPS &gt;5</b>	<b>Total</b>	<b>p-Wert, Pearson <math>\chi^2</math></b>
<b>Alter</b>						
<60	60,7% (n=85)	7,1% (n=10)	18,6% (n=26)	13,6% (n=19)	100% (n=140)	0,608 ( $\chi^2$ )
>60	66,0% (n=163)	8,1% (n=20)	14,2% (n=35)	11,7% (n=29)	100% (n=247)	
<b>FIGO</b>						
I	57,1% (n=8)	0% (n=0)	14,3% (n=2)	28,6% (n=4)	100% (n=14)	0,153 ( $\chi^2$ )
II	46,4% (n=13)	10,7% (n=3)	14,3% (n=4)	28,6% (n=8)	100% (n=28)	
III	65,9% (n=182)	7,2% (n=20)	15,9% (n=44)	10,9% (n=30)	100% (n=276)	
IV	66,2% (n=43)	9,2% (n=6)	15,4% (n=10)	9,2% (n=6)	100% (n=65)	
<b>Resektions- status</b>						
R0 (0mm)	55,7% (n=78)	7,9% (n=11)	17,1% (n=24)	19,3% (n=27)	100% (n=140)	0,067 ( $\chi^2$ )
R1 (1-10mm)	70,5% (n=103)	8,9% (n=13)	11,6% (n=17)	8,9% (n=13)	100% (n=146)	
R2 (>10mm)	66,3% (n=59)	6,7% (n=6)	20,0% (n=18)	6,7% (n=6)	100% (n=89)	
R unbek.	66,7% (n=8)	0% (n=0)	16,7% (n=2)	16,7% (n=2)	100% (n=12)	
<b>Medianes OS (Tage)</b>	926	1112	1237	2400	1017	<0,001
<b>Medianes DFS (Tage)</b>	452	465	520	691	465	0,018

Die Kurventrennung des Gesamtüberlebens (OS) war am signifikantesten bei einem CPS-Cut-off-Maximalwert von 5: die mediane Überlebenszeit von 996 Tage für Patientinnen mit einem PD-L1-CPS-Status <5, während Patientinnen mit CPS >5 ein medianes OS von 2400 Tagen zeigten (p-Wert <0,001). (Abb. 21)

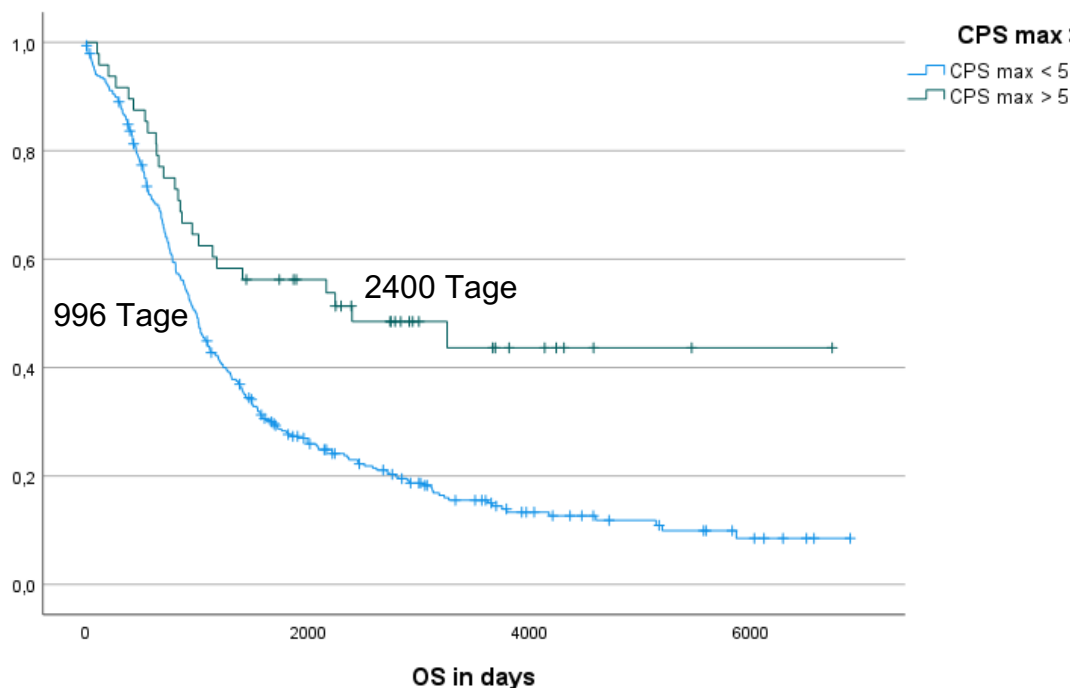


Abbildung 21: Gesamtüberlebenskurven (overall survival) bezogen auf die PD-L1-Expression anhand des CPS-Maximalwertes.  $p < 0,001$

Die Untergruppenanalyse vom CPS-Maximalwert (CPS max.) 0, <1, 1-5 und >5 zeigt ebenfalls ein signifikant vorteilhaftes OS für alle Patientinnen mit CPS-Maximalwert >5, mit sich stufenweisen verschlechternden Verläufen für CPS-Maximalwert 1-5 und 0. Hervorzuheben ist das relativ gute OS für Patientinnen mit CPS-Maximalwert <1 innerhalb der ersten 5 Jahre. Die Kurve entspricht der für CPS-Maximalwert 1-5 mit plötzlichem Zusammenbruch nach 6,5 Jahren. Für ein krankheitsfreies Überleben ist ein CPS-Maximalwert >5 ebenfalls von Vorteil, wobei innerhalb der Gruppen des CPS-Maximalwerts <5 kein deutlicher Unterschied im DFS besteht ( $p = 0,018$ ).



### 3.3.3.2 TPS mit Antikörperklon 28.8

Die PD-L1 Auswertung anhand des TPS erfolgte wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben. Hier wurden ausschließlich PD-L1-positive Tumorzellen berücksichtigt.

Repräsentative Bilder für unterschiedlichen Cut-Offs finden sich in Abbildung 22.

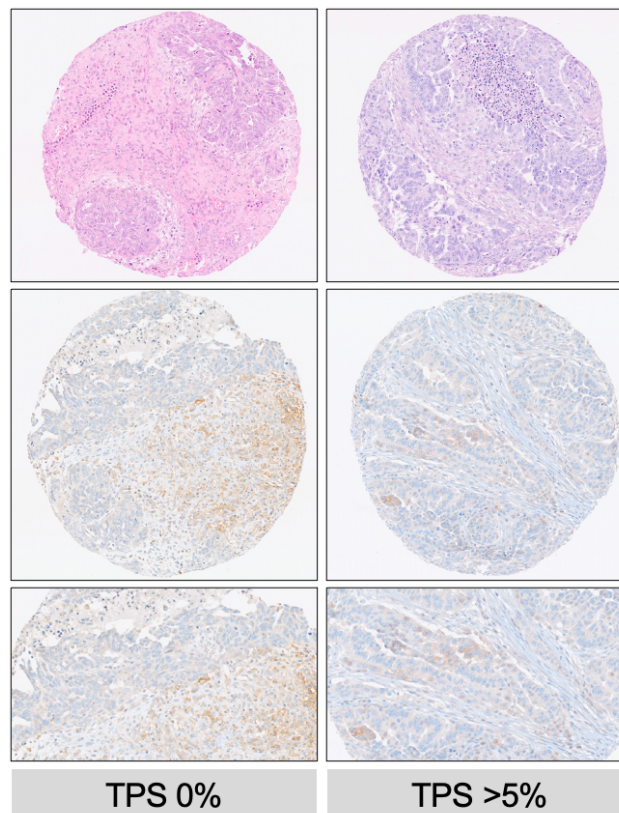


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung für PD-L1 (Abcam 28.8): **TPS 0%** (HE 15x und TPS max. 0 in 15x, 20x) und **TPS >5%** (HE in 15x und TPS max. 17 in 15x, 20x). Eigene Darstellung.

Anhand des TPS ermittelte Daten zu PD-L1 konnten für 392 HGSC-Patientinnen gewonnen werden. Hier waren für 387 Patientinnen Follow-Up Daten verfügbar. Es zeigten sich 298 Fälle (77,0 %) als PD-L1-negative Fälle oder mit einem TPS-Maximalwert (TPS max.) <1%.

63 Patientinnen zeigten einen TPS-Maximalwert 1-5% (16,3%) und 26 Patientinnen zeigten einen TPS-Maximalwert von mehr als 5% (6,7%).

Die Grenzwerte für den TPS-Maximalwert wurden mit 0%, <1%, 1-5% und >5% festgelegt. Die Spanne der TPS-Maximalwerte reichte von 0 bis 80% pro Fall, der TPS-Minimalwerte von 0 bis 5% und der TPS-Mittelwerte von 0 bis 42%.



Die TPS-Maximalwerte mit einem Cut-Off von 5% zeigten einen Trend für ein besseres Gesamtüberleben (OS), aber ohne Signifikanz ( $p=0,129$ ). (Abb. 23)

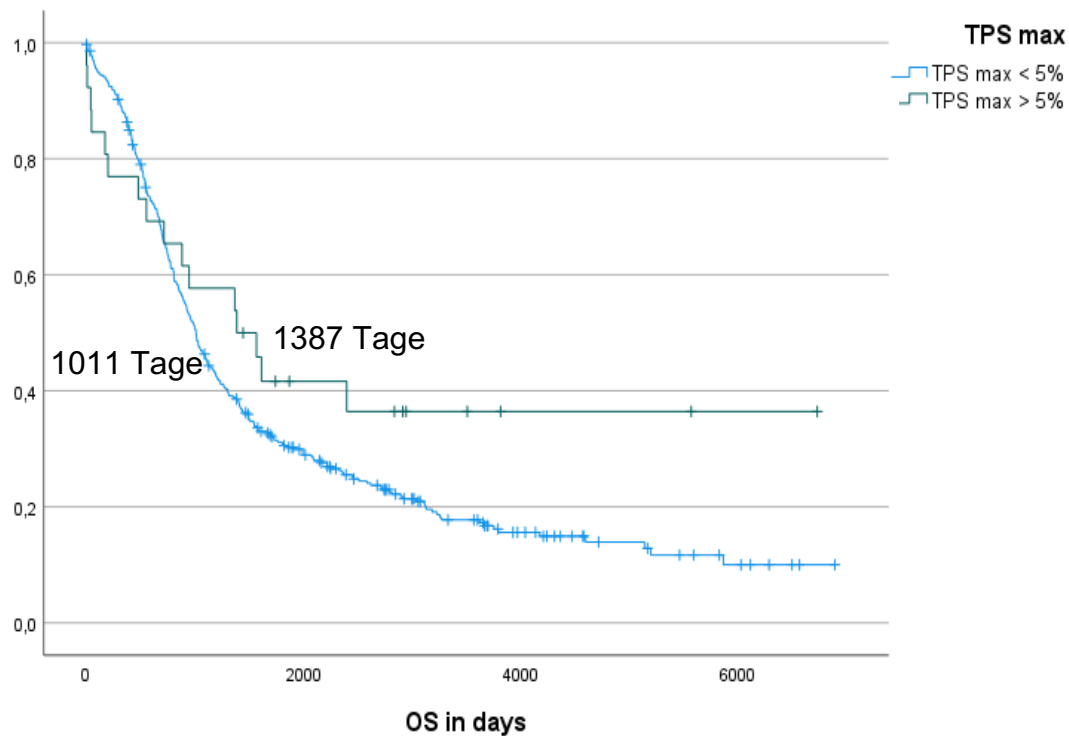


Abbildung 23: Gesamtüberlebenskurven (overall survival) bezogen auf PD-L1-Expression nach TPS-Maximalwert  $\leq$  5%.  $p=0,129$ .

Die weitere Analyse zeigte auch einen Trend zu einem vorteilhaften Gesamt- und krankheitsfreien Überleben sowie 5- und 10-Jahres-OS und -DFS bei TPS-Maximalwerten  $> 5\%$  (ohne statistische Signifikanz, OS  $p=0,245$ ; DFS  $p=0,757$ ).

Auch bezogen auf das Alter, den FIGO Status und den Resektionsstatus zeigten sich bei der Auswertung von PD-L1 anhand des TPS nur Trends hinsichtlich eines prozentual leicht vermehrten Vorkommens an R0-resezierten Patientinnen bei Vorliegen einer PD-L1 Positivität (>1%) und besonders bei Überschreiten des Cut-Offs von >5%. Die übrigen Verteilungsmuster ähneln denen der CPS-Auswertung. Das FIGO-Stadium III war in der Gesamtverteilung in allen Cut-Off-Einteilungen am häufigsten vorzufinden. Eine signifikante Korrelation von PD-L1-Expression anhand des TPS mit dem FIGO-Stadium war nicht gegeben. (Tab. 9)

Tabelle 9: PD-L1-Expressionsstatus mittels TPS-Mittelwert: Verteilungsanalyse bezüglich Alter, FIGO-Status, Resektionsstatus.

	TPS 0%	TPS <1%	TPS 1-5%	TPS >5%	Total	p-Wert, Pearson $\chi^2$
<b>Alter</b>						
<60	65,0% (n=91)	6,4% (n=9)	22,9% (n=32)	5,7% (n=8)	100% (n=140)	
>60	74,1% (n=183)	6,1% (n=15)	12,6% (n=31)	7,3% (n=18)	100% (n=247)	0,065 ( $\chi^2$ )
<b>FIGO</b>						
I	64,3% (n=9)	14,3% (n=2)	21,4% (n=3)	0% (n=0)	100% (n=14)	
II	57,1% (n=16)	7,1% (n=2)	21,4% (n=6)	14,3% (n=4)	100% (n=28)	
III	72,5% (n=200)	5,8% (n=16)	15,9% (n=44)	5,8% (n=16)	100% (n=276)	
IV	70,8% (n=46)	6,2% (n=4)	15,4% (n=10)	7,7% (n=5)	100% (n=65)	0,629 ( $\chi^2$ )
<b>Resektionsstatus</b>						
R0 (0mm)	63,6% (n=89)	7,9% (n=11)	19,3% (n=27)	9,3% (n=13)	100% (n=140)	
R1 (1-10mm)	76,0% (n=111)	6,2% (n=9)	15,1% (n=22)	2,7% (n=4)	100% (n=146)	
R2 (>10mm)	75,3% (n=68)	4,5% (n=4)	12,4% (n=11)	7,9% (n=7)	100% (n=89)	
R unbek.	58,3% (n=7)	0% (n=0)	25,0% (n=3)	16,7% (n=2)	100% (n=12)	0,164 ( $\chi^2$ )
<b>Medianes OS (Tage)</b>	981	1235	1193	1387	1017	0,245
<b>Medianes DFS (Tage)</b>	453	684	495	465	465	0,757

### 3.3.4 Korrelation PD-L1-Expression mit CD3-positiven intratumoralen/intraepithelialen TIL

Wie wir vorhergehend in Einzelanalysen zeigen konnten, besteht bei CD3-Lymphozyten-reichen Tumoren sowie bei PD-L1 exprimierenden Tumoren eine signifikante Auswirkung auf das Gesamtüberleben den Patientinnen. Daher untersuchten wir weitergehend, ob eine Korrelation der beiden Marker einen ähnlichen Effekt auf das Gesamtüberleben der Patientinnen hat oder Abhängigkeiten der Faktoren voneinander zu erkennen sind.

*Tabelle 10: Epitheliale CD3-positive TIL (Mittelwert) mit zugehöriger Standardabweichung und Wertebereich anhand von CPS-Maximalwerten.*

	CPS 0	CPS <1	CPS 1-5	CPS >5	Total	p-Wert
<b>CD3 Epi Mittelwert</b>	7,46/HPF	18,5/HPF	17,13/HPF	28,45/HPF	12,50/HPF	
<i>Standardabweichung</i>	6,605	12,797	12,768	23,032	13,594	
<i>Wertespanne</i>	0-33	3-57	2-76	2-117	0-117	<0,001

Es zeigt sich, dass eine PD-L1-Expression den stärksten zusätzlichen Überlebenseffekt in lymphozytenreichen Tumoren aufweist. In Kombination mit PD-L1-Expression waren hohe epitheliale CD3-Mittelwerte prognostisch günstiger als TIL-Spiegel der mittleren und unteren Tertile.

Ein CPS-Maximalwert >5 hatte eine zusätzliche vorteilhafte Wirkung sowohl auf das OS als auch auf das DFS ( $p < 0,001$ ).

Niedrige TIL-Spiegel und PD-L1-Negativität zeigten das schlechteste Ergebnis.

Es zeigte sich zudem, dass die PD-L1-Expression wohl eine stärkere Auswirkung auf das Gesamtüberleben zeigt als die Menge an CD3 positiven TIL. Die Gruppe der PD-L1 wenig exprimierenden Tumoren (CPS max. <5) mit vielen CD3 positiven TIL (CD3 top Tertile) zeigte ein deutlich schlechteres Gesamtüberleben im Vergleich zur Gruppe, die eine starke PD-L1-Expression (CPS max. >5) und ebenfalls viele CD3 positive TIL (CD3 top Tertile) aufwies. (Abb. 24)

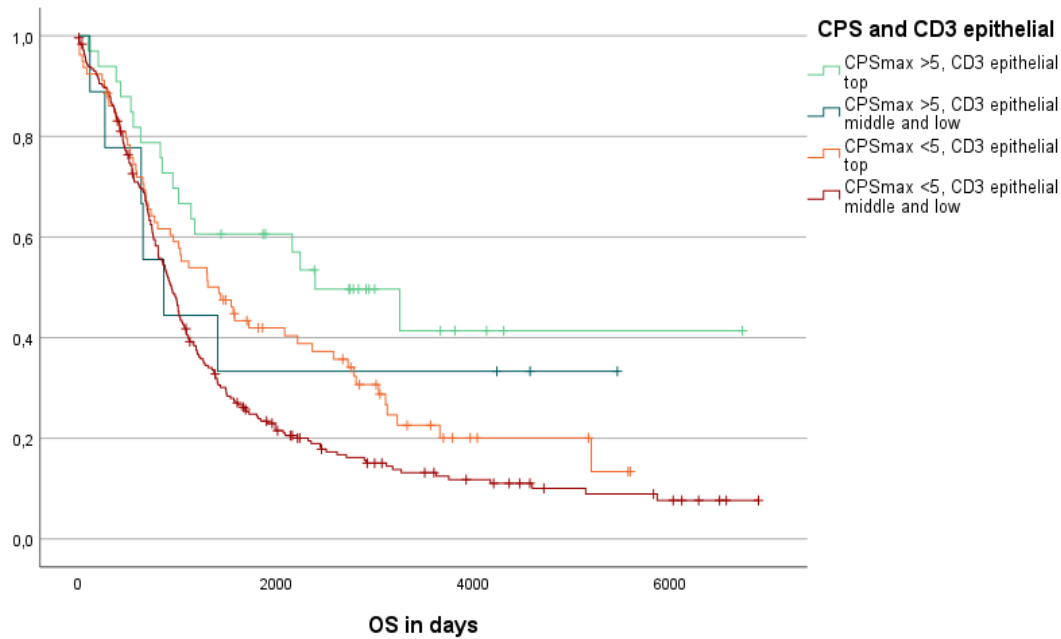


Abbildung 24: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS) und CD3-positive TIL nach Tertilen top vs. mid & low.  $p < 0,001$ .

Die Ergebnisse der Korrelation von PD-L1 und CD3 positiven Lymphozyten auf dem Boden TPS-Analysen ähneln sich im Wesentlichen ( $p < 0,001$ ). Die Kurven der CD3 Epi Mittelwerte der top Tertile verlaufen je nach TPS max.  $>5\%$  oder  $<5\%$  analog zu den Kurven des CPS, mit Dominanz des PD-L1 Wertes gegenüber den Lymphozytentertilen. (Abb. 25)

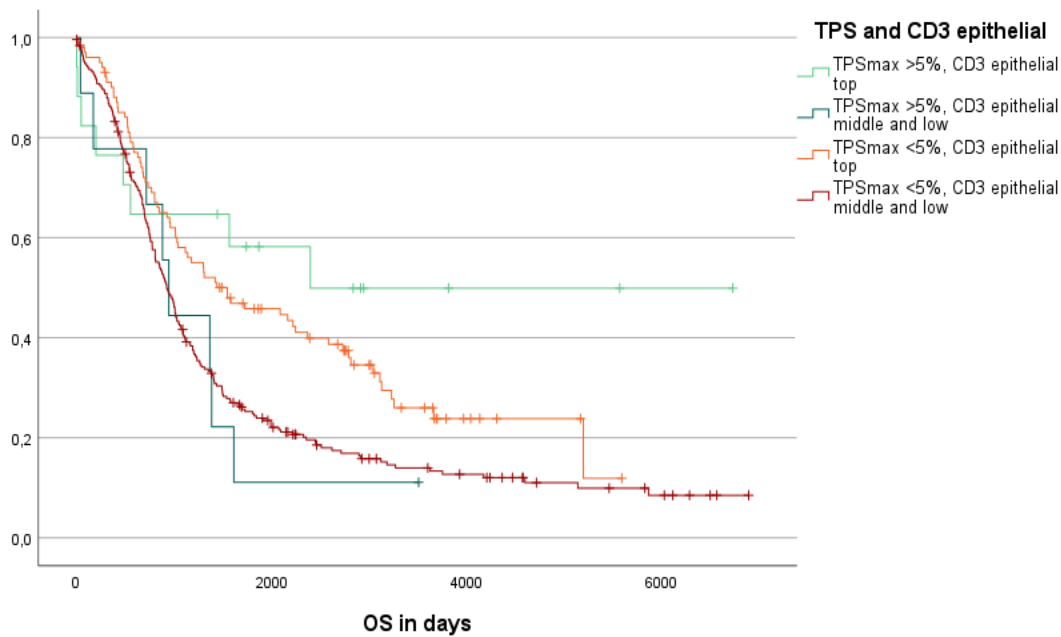


Abbildung 25: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (TPS) und CD3-positive TIL nach Tertilen top vs. mid & low.  $p < 0,001$ .

Eine Subgruppenanalyse hinsichtlich des Resektionsstatus auf gegliedert nach R0 gegen R1/2 im Vergleich zu CPS-Maximalwerten <5 und >5 zusammen mit CD3-positiven intraepithelialen TIL-Werten zeigten ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben für vollständig resezierte Patientinnen mit einem CPS-Maximalwert >5 und epitheliale/intratumoral vorkommenden CD3-positiven TIL in der oberen Tertile. Patientinnen mit optimalem Debulking und einem CPS-Maximalwert <5 und CD3-positiven TIL in der mittleren bis niedrigen Tertile hingegen hatten schlechte Überlebensergebnisse. Fälle mit CPS-Maximalwert >5 und CD3 Expression in der mittleren oder niedrigen Tertile waren nahezu nicht vorhanden in der Gruppe der R0-resezierten Patientinnen. (Abb. 26)

Medianes OS für R0-resezierte, PD-L1 CPS-Maximalwert >5 Patientinnen mit hohen intratumoralen CD3-Werten waren 3257 Tage vs. 654 Tage (CD3 mittlere und untere Tertile, CPS max. >5) vs. 3043 Tage (CD3 obere Tertile, CPS max. <5; R0 p=0,009).

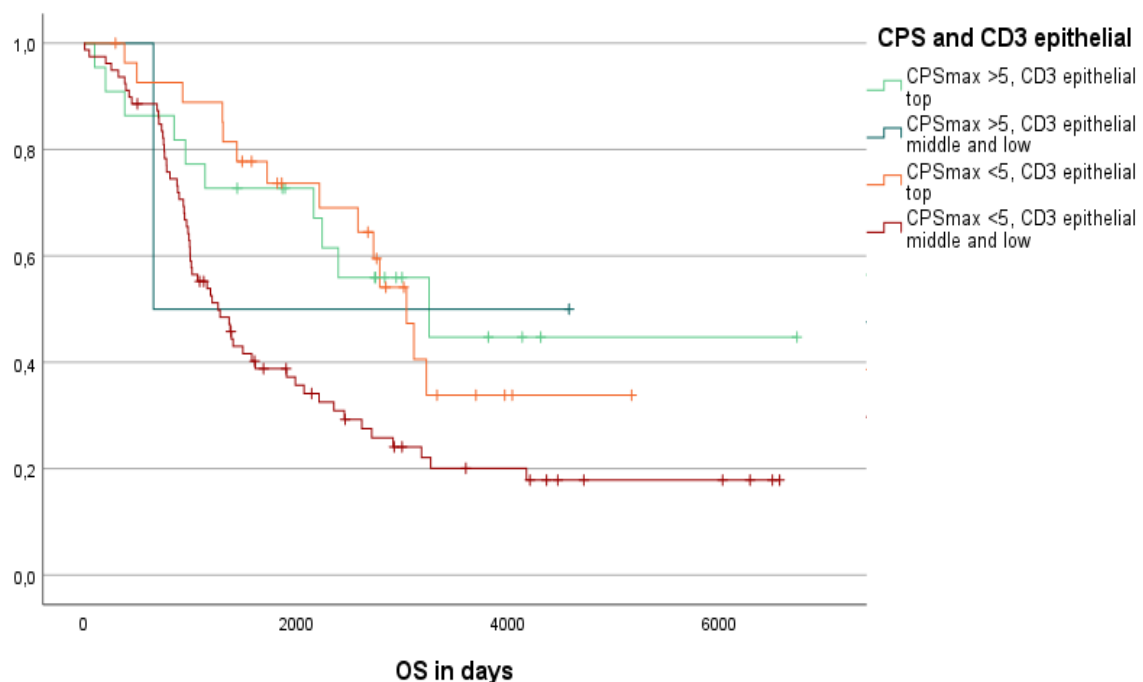


Abbildung 26: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS) und CD3-positive TIL bei Patientinnen mit stattgehabter R0-Resektion. p=0,009.

Die Analyse für R1- und R2-resezierte Patientinnen zeigte alle ein verringertes OS mit optimaleren Verläufen sofern der CPS-Maximalwert >5 betrug, wobei hier nur 16 Fälle vorkamen (R1/R2 p=0,312). (Abb. 27)

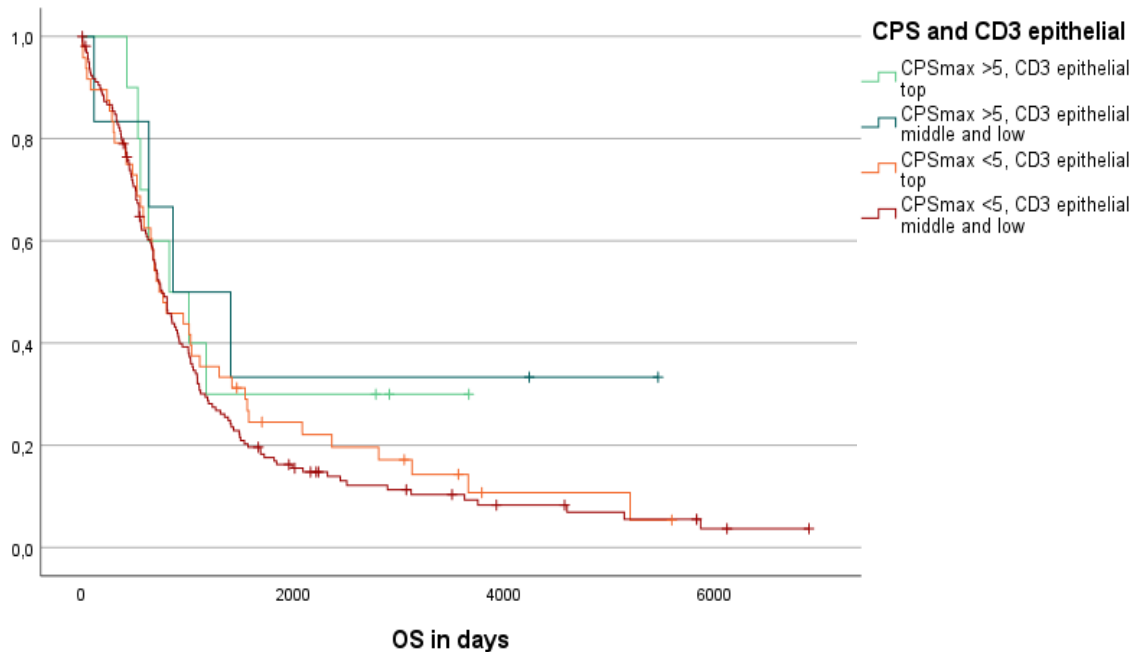


Abbildung 27: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS-Maximalwert) und CD3- positive TIL bei Patientinnen mit stattgehabter R1/R2 Resektion. p=0,312.

### 3.3.5 Korrelation PD-L1-Expression mit CD8-positiven intratumoralen/intraepithelialen TIL

Bei den CD8-positiven TIL zeigten sich, dass sich ein vermehrtes Vorkommen positiv auf das Gesamtüberleben auswirkt. Daher untersuchten wir auch hier weitergehend, welche Auswirkungen eine Korrelation mit der PD-L1-Expression des Tumors auf das Gesamtüberleben ausübt.

Tabelle 11: Epitheliale CD8-positve TIL (Mittelwert) mit zugehöriger Standardabweichung und Wertebereich anhand von CPS-Maximalwerten. p <0,001.

	CPS 0	CPS <1	CPS 1-5	CPS >5	Total	p-Wert
CD8 Epi Mittelwert	6,16/HPF	13,57/HPF	13,46/HPF	23,81/HPF	10,14/HPF	
Standardabweichung	6,234	10,444	11,051	19,581	11,664	
Wertespanne	0-34	2-49	0-61	1-95	0-95	<0,001

Auch hier konnten wir zeigen, dass die Gruppe der stark PD-L1 exprimierenden Tumoren (CPS max. >5) mit vielen CD8-positiven TIL (CD8 top Tertile) im Gesamtüberleben den anderen Gruppen gegenüber einen prognostisch günstigeren Verlauf zeigte.

Es bestätigte sich auch hier, dass die PD-L1-Expression wohl eine stärkere Auswirkung auf das Gesamtüberleben hat als das Vorkommen von CD8-positiven TIL alleine. Die Gruppe der PD-L1 wenig exprimierenden Tumoren (CPS max. <5) mit vielen CD8-positiven TIL (CD8 top Tertile) zeigte ein deutlich schlechteres Gesamtüberleben im Vergleich zur Gruppe, die eine starke PD-L1-Expression und ebenfalls viele CD8 positive TIL aufwies. (Abb. 28)

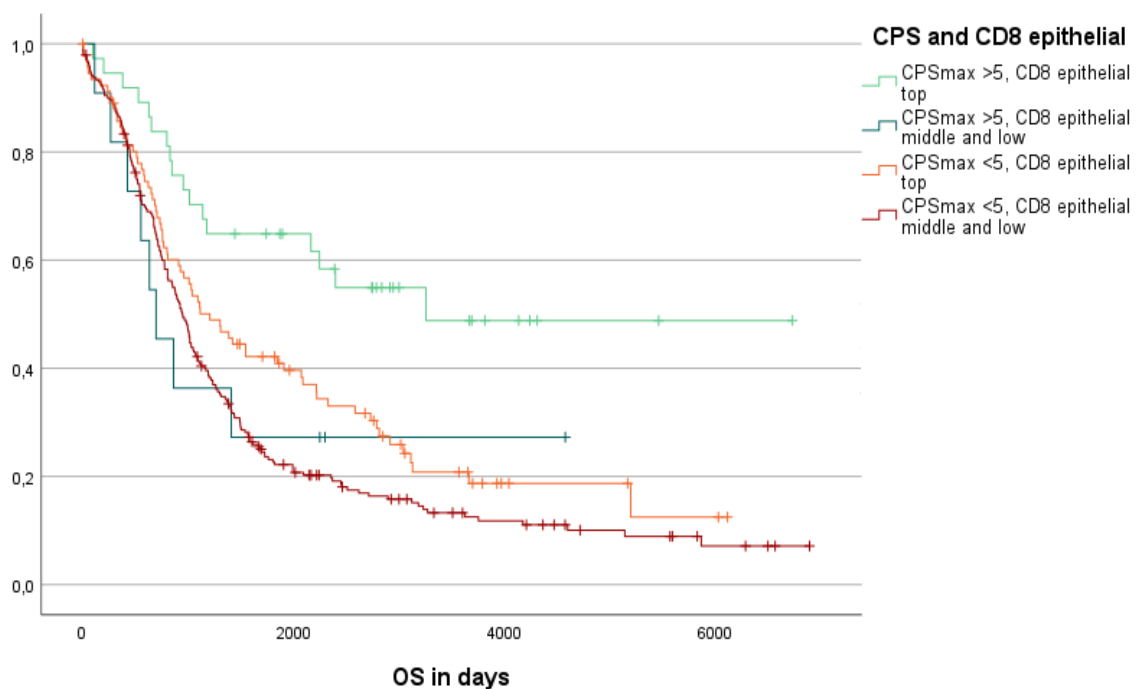


Abbildung 28: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS) und CD8 Expression in TIL.  $p < 0,001$ .

Anhand der durchgeführten TPS-Analyse konnten wir die oben genannten Ergebnisse mit einer statistischen Signifikanz ( $p < 0,001$ ) bestätigen. (Abb. 29)

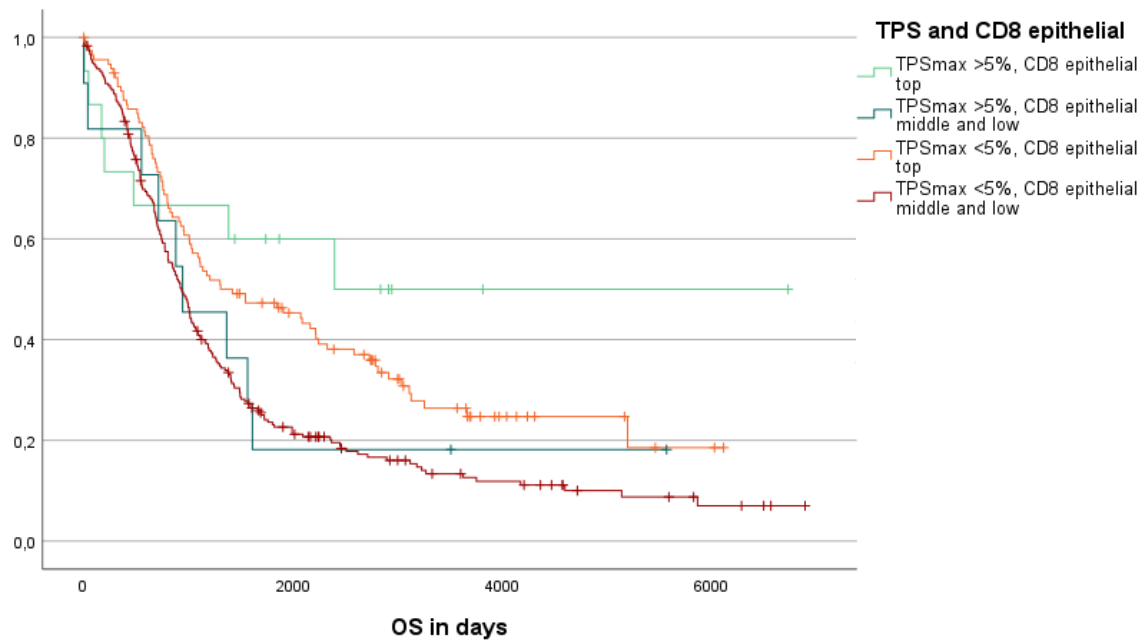


Abbildung 29: Gesamtüberlebenskurven Korrelation PD-L1 (TPS) und CD8 Expression in TIL.  $p < 0,001$ .



Die Analyse des Resektionsstatus hinsichtlich R0- vs. R1/R2-resezierten Patientinnen zusammen mit CPS- und TIL-Anzahl zeigte für den R0-Resektionszustand und eine hohe Anzahl an CD8-postiven TIL intraepithelial zusammen mit PD-L1 CPS-Maximalwert >5 ( $p=0,006$ ) vergleichbare Daten wie bei CD3 Expression, bei jedoch nur 2 Fällen mit CPS-Maximalwert >5 in der mittleren und unteren CD8-positiven Tertile. (Abb. 30)

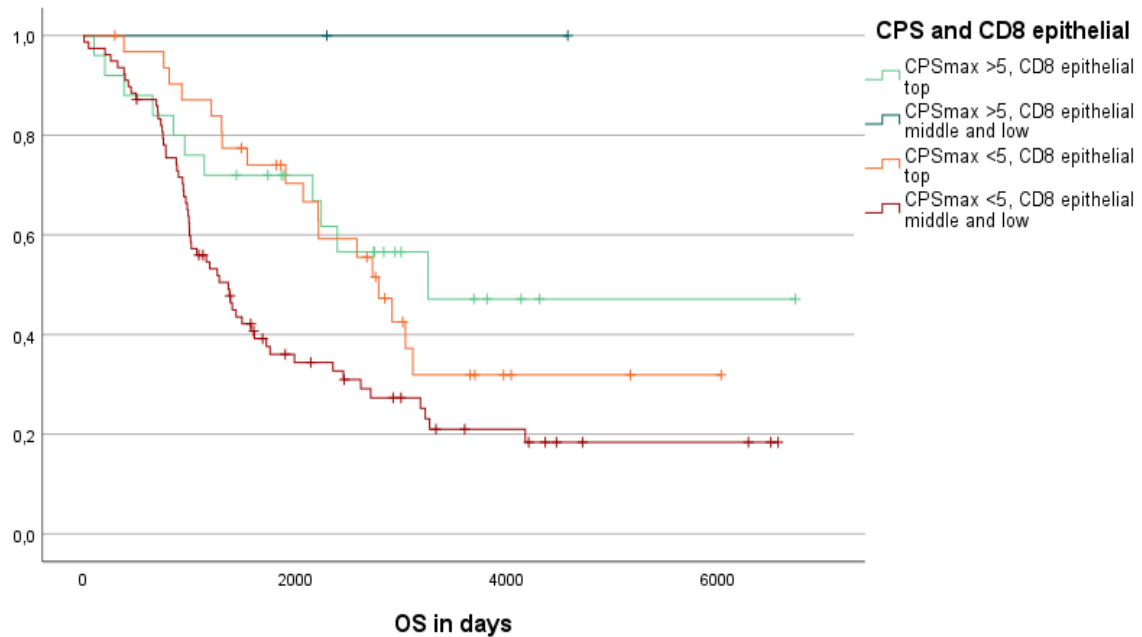


Abbildung 30: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS) und CD8-positiv TIL bei Patientinnen mit stattgehabter R0-Resektion.  $p=0,006$ .

Bemerkenswert ist, dass bei R1/R2 resezierten Patientinnen die obere Tertile der CD8-positiven epithelialen TILs und ein CPS-Maximalwert >5 einen deutlichen positiven Unterschied im Gesamtüberleben machten bei unvollständiger Tumorresektion ( $p=0,062$ ; medianes OS obere Tertile 1180 Tage vs. max. 779 Tage). (Abb. 31)

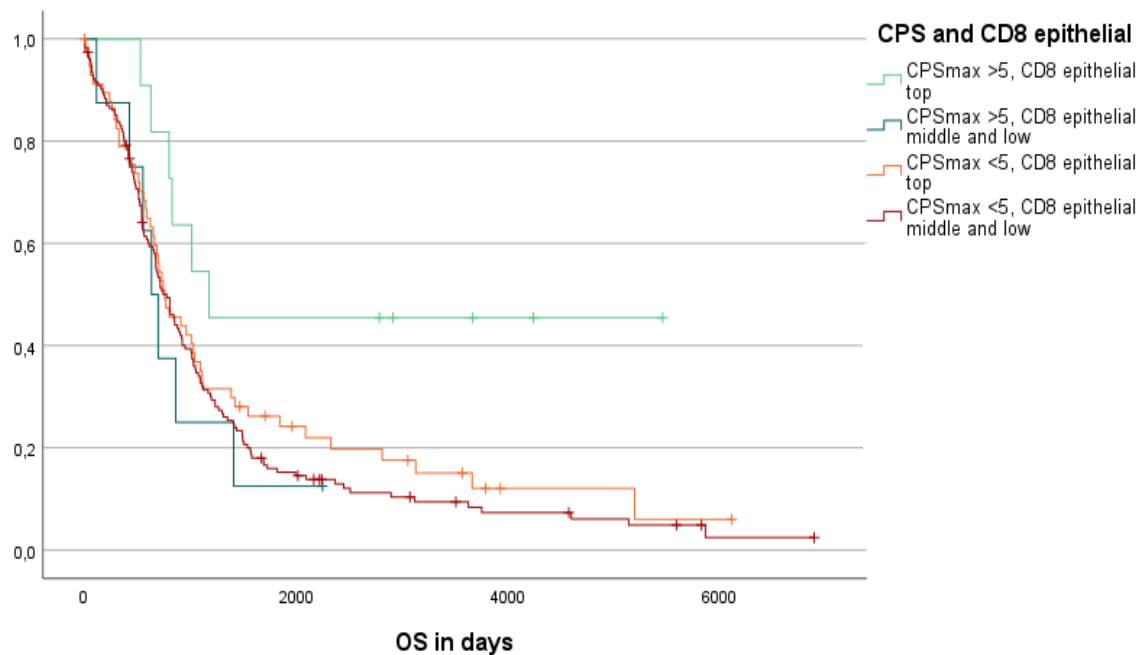


Abbildung 31: Gesamtüberlebenskurve Korrelation PD-L1 (CPS-Maximalwert) und CD8- positive TIL bei Patientinnen mit stattgehabter R1/R2 Resektion.  $p=0,062$ .

### 3.4 IDO1-Expression in high-grade serösen Ovarialneoplasien

Die IDO1 Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 2.4.2. beschrieben. Die Analysen erfolgten anhand des zuvor festgelegten Färbe-Scores. Repräsentative Bilder der unterschiedlichen Färbe-Scores finden sich in Abbildung 32.

Berücksichtigt wurde die Expression von IDO1 zum einen auf Tumorzellen und zum anderen auf Tumor-infiltrierenden Lymphozyten.

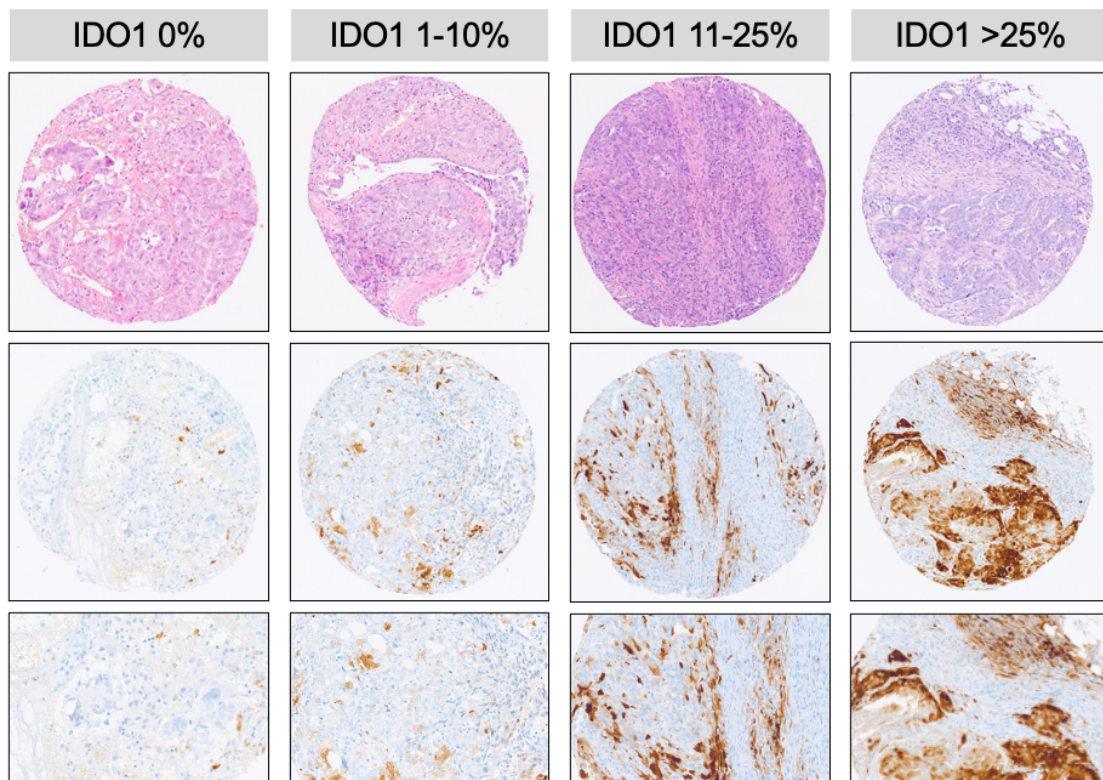


Abbildung 32: IDO1-Expression in HGSC: IDO1 0% (HE 15x, IDO1 TIL: Score 1 TU: Score 0 in 15x, 20x), IDO1 1-10% (HE 15x, IDO1 TIL: Score 1 TU: Score 2 in 15x, 20x), IDO1 11-25% (HE 15x, IDO1 TIL: Score 4 TU: Score 3 in 15x, 20x), IDO1 >25% (HE 15x, IDO1 TIL: Score 5 TU: Score 5 in 15x, 20x). Eigene Darstellung.

Für 387 Fälle konnten auswertbaren Daten zu IDO1 generiert werden.

Dabei zeigten 56,8% der Fälle eine IDO1-Expression auf TIL (n=178 mit IDO1 max. 1%-10%; n=30 mit IDO1 max. >10%; n=12 mit IDO1 max. >25%). 43,2% (n=167) der Fälle zeigten keine Expression von IDO1.

Beim IDO1 Mittelwert auf den TIL anhand der zuvor besprochenen Kategorien (0 bis 5) zeigten 210 Fälle (54,3%) Score 1 (1-5%), 6 Fälle (1,5%) einen Score von 2 (6-10%) und 3 Fälle (0,8%) einen Score von 3 (11-25%). Beim IDO1 Mittelwert auf TIL wurde keine IDO1-Expression mit Score 4 oder 5 nachgewiesen.

Die Erhebung der IDO1-Expression auf Tumorzellen, zeigte in 9,8% der Fälle (n=38/387) eine IDO1-Negativität (Score 0), während 90,2% (n=348) der Fälle eine Positivität >1% (n=144 IDO1 TU max. >1%; n=205 IDO1 TU max. >10%). Die Verteilung analog dem Auswertalgorithmus zeigte 193 Fälle (49,9%) mit Score 1 (1-5%), 73 Fälle (18,8%) mit einem Score von 2 (6-10%), 45 Fälle (11,6%) mit einem Score von 3 (11-25%), 24 Fälle (6,2%) mit einem Score von 4 (26-50%) und 13 Fälle (3,4%) mit einem Score von 5 (>50%).

Minimale IDO1-Expression pro Fall oder Mittelwertberechnungen ergaben keine statistisch relevanten Ergebnisse.

#### ***3.4.1 IDO1-Expression auf TIL und Korrelation mit Alter, FIGO-Stadium und R-Status***

Mit Blick auf die klinischen Parameter betrug die Altersverteilung innerhalb der HGSC-Kohorte 36,2% mit Alter <60 Jahre vs. 63,8% älter als 60 Jahre mit ähnlichen IDO1-Verteilungsmustern.

Die überwiegende Mehrheit der Fälle (71,3%, n=276) hatte ein FIGO-Stadium III und 65 Fälle (16,8%) ein FIGO-Stadium IV zum Zeitpunkt der Diagnose. Es zeigte sich eine homogene Verteilung von IDO1 auf TIL-exprimierenden Tumoren in jeder Cut-Off-Gruppe. Nur FIGO-Stadium I Tumoren zeigten keine IDO1-Expression von mehr als 25% auf TILs.

Die Mehrheit der Fälle exprimierte IDO1 auf TILs in <10%, wobei in der Gruppe der IDO1 >10% exprimierenden Tumore der Anteil an R0-resezierten Patientinnen im Vergleich zu R1 und R2 dominierte. Diese Verteilung lag ab einer IDO1-Expression >25% nicht mehr vor. Im Übrigen verteilen sich die Resektionsstatus homogen innerhalb der IDO1-Expressionsgruppen.

Bei der Betrachtung von IDO1 und dem FIGO-Tumorstadium ergab sich, eine gleichmäßige Verteilung der Fälle mit jedoch in Summe nur 6 Fällen mit FIGO I und II und einer IDO1-Expression >10% und >25%.

Tabelle 12: IDO1-Expressionsstatus auf **TIL** anhand des Maximalwertes pro Fall: Verteilungsanalyse bezüglich Alter, FIGO-Status, Resektionsstatus.

	IDO1 0%	IDO1 1-10%	IDO1 >10%	IDO1 >25%	Total	p-Wert, Pearson $\chi^2$
<b>Alter</b>						
<60	43,6% (n=61)	46,4% (n=65)	8,6% (n=12)	1,4% (n=2)	100% (n=140)	
>60	42,9% (n=106)	45,7% (n=113)	7,3% (n=18)	4,0% (n=10)	100% (n=247)	0,535 ( $\chi^2$ )
<b>FIGO</b>						
I	42,9% (n=6)	50,0% (n=7)	7,1% (n=1)	0% (n=0)	100% (n=14)	
II	32,1% (n=9)	50,0% (n=14)	14,3% (n=4)	3,6% (n=1)	100% (n=28)	
III	41,7% (n=115)	48,2% (n=133)	6,9% (n=19)	3,3% (n=9)	100% (n=276)	
IV	52,3% (n=34)	35,4% (n=23)	9,2% (n=6)	3,1% (n=2)	100% (n=65)	0,673 ( $\chi^2$ )
<b>Resektionsstatus</b>						
R0 (0mm)	42,9% (n=60)	45,7% (n=64)	8,6% (n=12)	2,9% (n=4)	100% (n=140)	
R1 (1-10mm)	43,2% (n=63)	45,2% (n=66)	7,5% (n=11)	4,1% (n=6)	100% (n=146)	
R2 (>10mm)	43,8% (n=39)	47,2% (n=42)	6,7% (n=6)	2,2% (n=2)	100% (n=89)	
unbekannt	41,7% (n=5)	50,0% (n=6)	8,3% (n=1)	0% (n=0)	100% (n=12)	0,998 ( $\chi^2$ )
<b>Medianes OS (Tage)</b>	967	1049	1549	865	1017	0,007
<b>Medianes DFS (Tage)</b>	453	466	637	477	465	0,089

### 3.4.2 IDO1-Expression auf Tumorzellen und Korrelation mit Alter, FIGO-Stadium und R-Status

In Bezug auf die IDO1-Expression auf Tumorzellen war diese homogen über die Altersgruppen und FIGO-Stadien verteilt, wobei Fälle mit FIGO-Stadium I prozentual häufiger mit >10% IDO-Expression vorkommen. Es konnte festgestellt werden, dass die meisten R0-resezierten Patientinnen positiv mit einer IDO1-Expression von >10% korrelierten (63,1%).

Tabelle 13: IDO1-Expressionsstatus auf **Tumorzellen** anhand des Maximalwertes pro Fall: Verteilungsanalyse bezüglich Alter, FIGO-Status, Resektionsstatus.

	IDO1 0%	IDO1 1-10%	IDO1 >10%	Total	p-Wert, Pearson $\chi^2$
<b>Alter</b>					
<60	4,3% (n=6)	33,6% (n=47)	62,1% (n=87)	100% (n=140)	
>60	13,0% (n=32)	39,3% (n=97)	47,8% (n=118)	100% (n=247)	0,004 ( $\chi^2$ )
<b>FIGO</b>					
I	7,1% (n=1)	28,6% (n=4)	64,3% (n=9)	100% (n=14)	
II	14,3% (n=4)	25,0% (n=7)	60,7% (n=17)	100% (n=28)	
III	9,1% (n=25)	40,9% (n=113)	50,0% (n=138)	100% (n=276)	
IV	10,8% (n=7)	29,2% (n=19)	60,0% (n=39)	100% (n=65)	0,406 ( $\chi^2$ )
<b>Resektionsstatus</b>					
R0 (0mm)	11,4% (n=16)	25,7% (n=36)	62,9% (n=88)	100% (n=139)	
R1 (1-10mm)	6,2% (n=9)	45,9% (n=67)	47,9% (n=70)	100% (n=146)	
R2 (>10mm)	12,4% (n=11)	40,4% (n=36)	47,2% (n=42)	100% (n=89)	
unbekannt	16,7% (n=2)	41,7% (n=5)	41,7% (n=5)	100% (n=12)	0,014 ( $\chi^2$ )
<b>Medianes OS (Tage)</b>	906	857	1311	1017	<0,001
<b>Medianes DFS (Tage)</b>	473	419	535	465	0,016

### 3.4.3 Einfluss von IDO1 auf das Überleben

Fälle mit IDO1-Maximalwert (IDO max.) >10% zeigten ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben (OS) nämlich 1549 Tage vs. 1049 Tage (1-10%) vs. 967 Tage (0%) ( $p = 0,007$ ). IDO1-Maximalwerte > 25% zeigten ein signifikant verringertes OS, sogar schlechter als bei IDO1-Negativität (865 Tage), was trotz der geringen Fallzahl deutlich herausgestellt wird ( $n = 12$ ). Das Diagramm zeigt eine deutliche Trennung der Überlebenskurven (IDO1 TIL max. 0% vs. 1-10% vs. >10%), mit einem klaren vorteilhaften Verlauf für Tumore mit >10% IDO1-Expression. (Abb. 33)

Das krankheitsfreie Überleben zeigte vergleichbare Daten mit den besten Ergebnissen für die Gruppen der IDO1-Expression auf Lymphozyten >10% ( $p=0,089$ ).

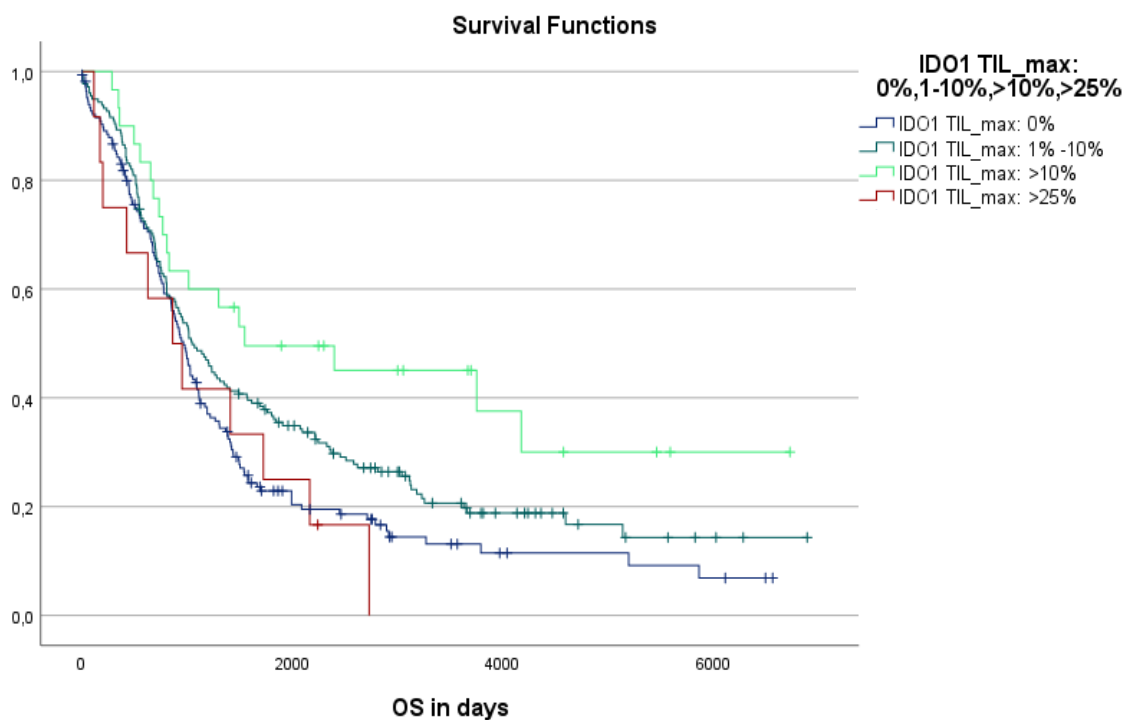


Abbildung 33: Gesamtüberlebenskurven (OS) bezogen auf die IDO1-Expression auf TIL.  $p=0,007$ .

Die IDO1-Analysen gemäß IDO1-TIL-Mittelwerten entlang immunhistochemisch definierter Scores/Kategorien, die im Voraus berechnet wurden, trennten sich die Kurven nicht so klar wie bei den Maximalwerten ( $p=0,057$ ) und der Zusammenfassung der Gruppen 1-5% und >5-10%, zeigten jedoch das beste mediane OS für mittlere TIL-Werte von 1–5% (1142 Tage), wobei nur sehr wenige Fälle eine IDO1-Expression von >10% erreichten ( $n=3$ ). (Abb. 34)

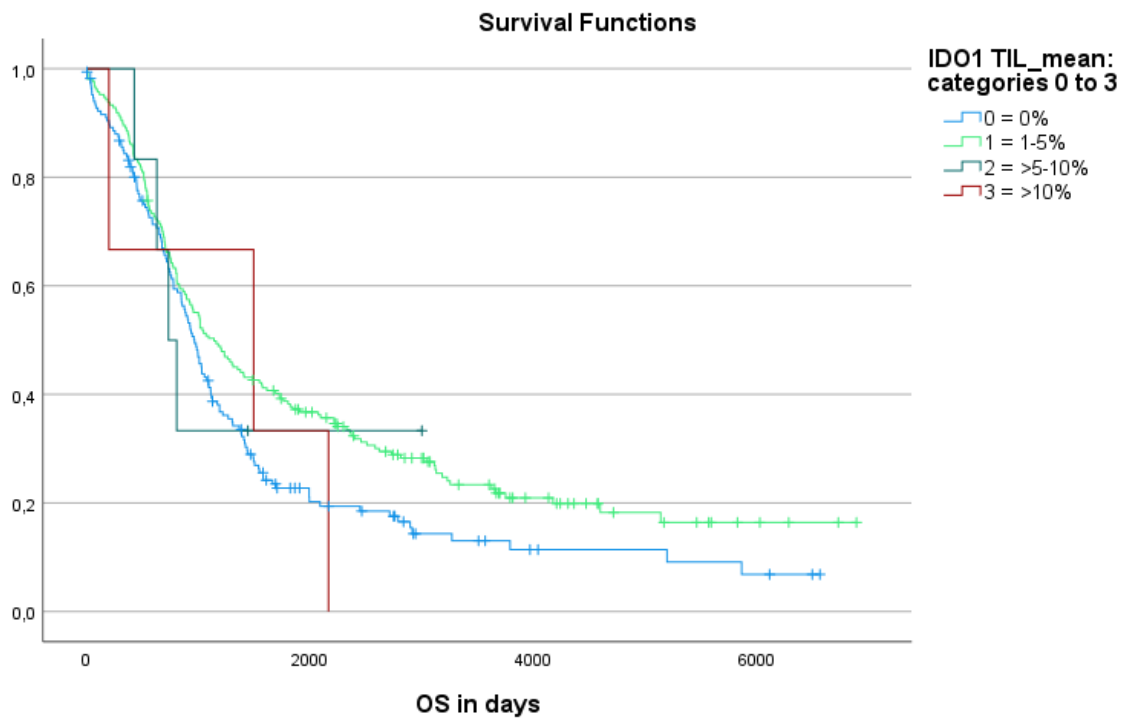


Abbildung 34: Gesamtüberlebenskurve (OS) für IDO1-Expression auf TIL anhand des Auswertescores/nach Kategorien (Mittelwert).  $p=0,057$ .



Die IDO1-Expression auf Tumorzellen zeigt in Bezug auf das Gesamtüberleben günstige Verläufe bei Patientinnen mit einem IDO1-Maximalwert >10%, wohingegen sich die Kurven für 0% und >1-10% assimilieren ( $p < 0,001$ ). (Abb. 35)

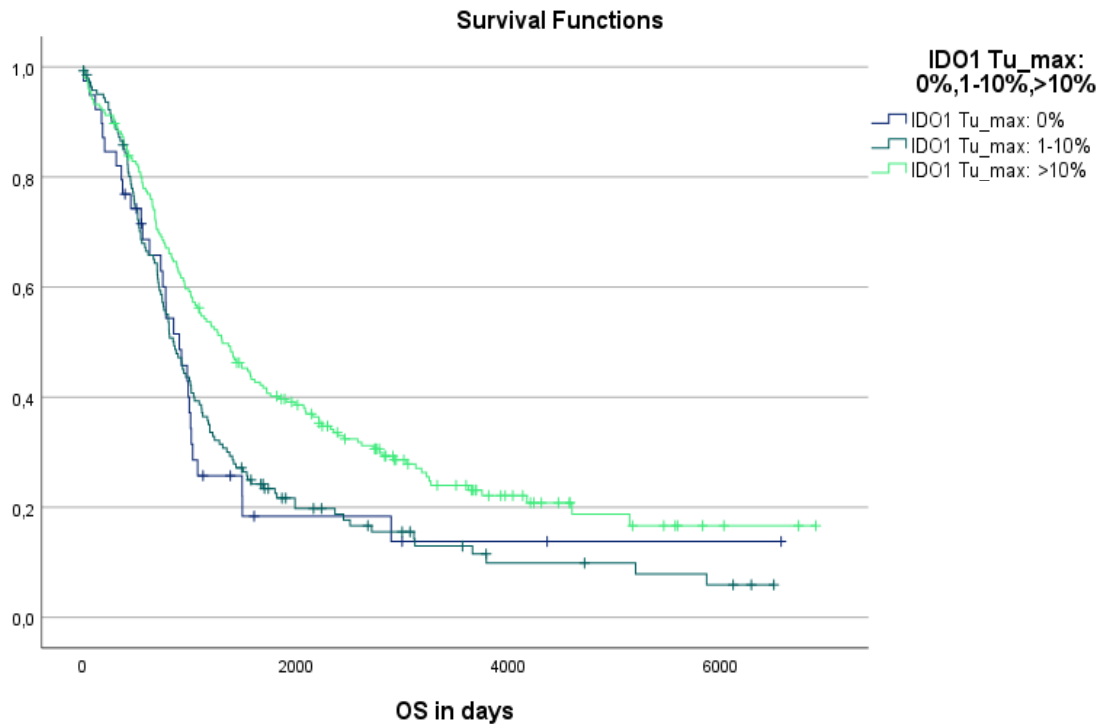


Abbildung 35: Gesamtüberlebenskurven (OS) bezogen auf die IDO1-Expression (Maximalwert) auf Tumorzellen.  $p < 0.001$ .

Die Analyse des Gesamtüberlebens anhand der IDO1-Auswertescores von 0 bis 5 (Bezug auf Mittelwerte) auf Tumorzellen deutet auf ein verbessertes medianes OS für Patientinnen mit hohen oder zumindest mittleren IDO1-Expressionsniveaus hin. Hierbei sollte jedoch angemerkt werden, dass in Bezug auf das 5-Jahresüberleben nahezu alle Kurven eng zusammen verlaufen und hinsichtlich des 10-Jahres-OS die Gruppe mit IDO1-Expression >50% am besten verläuft, gefolgt vom Konglomerat der Kurven >5% bis hin zu >25-50% und abschließend 0% und 1-5% ( $p=0,015$ ). (Abb. 36)

Durch langes Follow-Up generierte Daten stellen besonders das verlängerte >10-Jahres-OS für die IDO1-Expressionsgruppe >10-25% heraus.

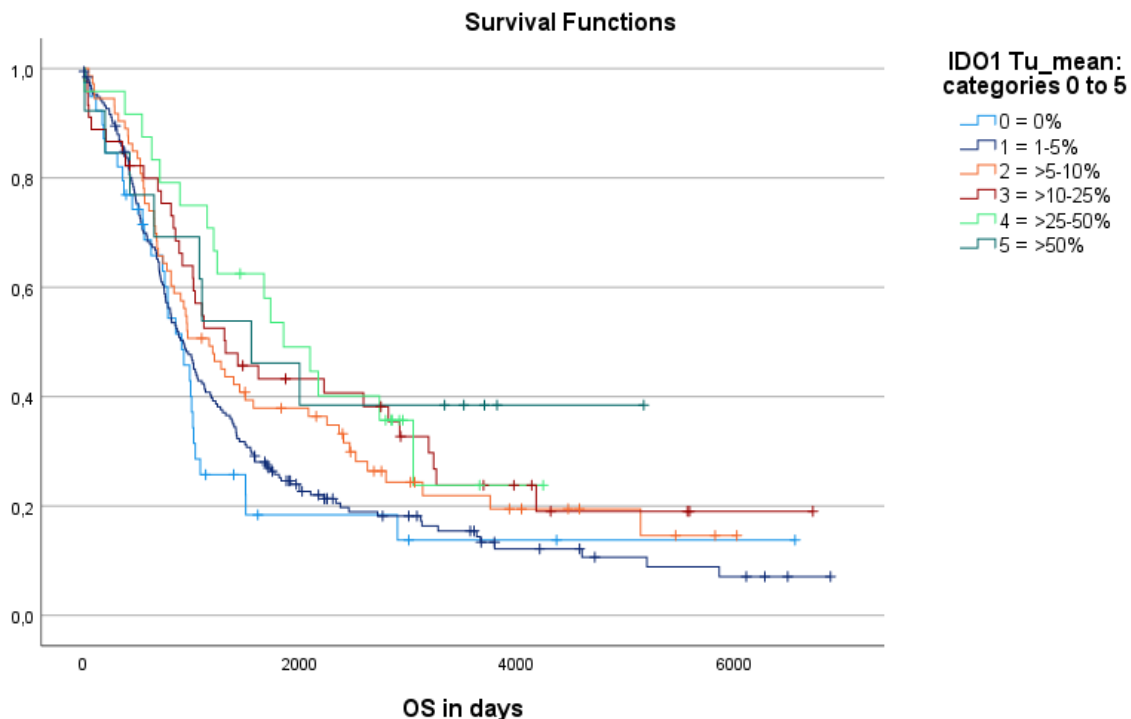


Abbildung 36: Gesamtüberlebenskurve (OS) für IDO1-Expression auf Tumorzellen anhand des Auswertescores (Mittelwert);  $p=0,015$ .

Die Subgruppenanalyse des R0-, R1- und R2-Resektionsstatus im Vergleich zu IDO1 TIL max. <1% (formal negativ) vs. >1% (positiv) zeigte ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben für vollständig resezierte Patientinnen (R0) mit maximaler IDO1-Expression auf TIL >1 % (R0:  $p=0,030$ ; R1/2:  $p=0,079$ ). Das mediane OS für Patientinnen mit R0-Resektion und IDO1-Expression auf TIL >1% betrug 2221 Tage gegenüber 1306 Tagen für IDO1-negative Patientinnen.

Bei mikroskopisch und makroskopisch nicht in toto resezierten Patientinnen (R1/2) betrug das mediane OS 449 Tage für IDO1-negative vs. 515 Tage für IDO1 >1% exprimierende Tumore. (Abb. 37)

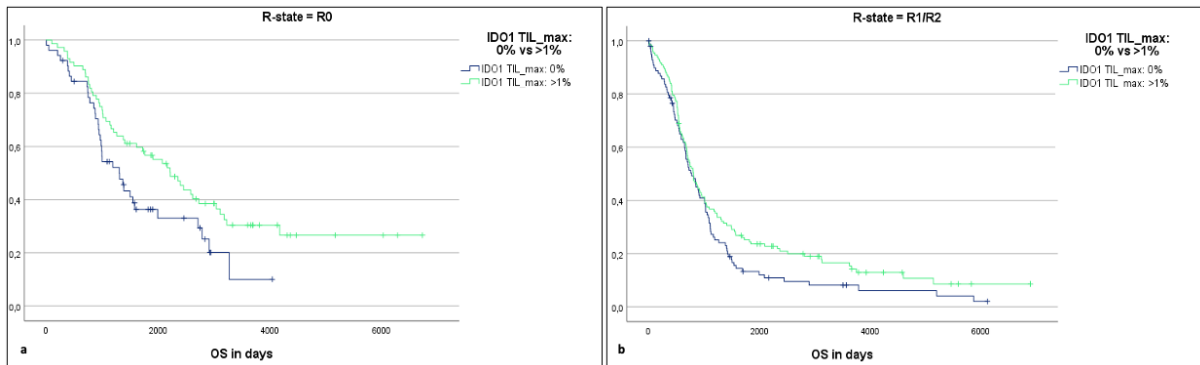


Abbildung 37: Mittleres Gesamtüberleben nach max. IDO1-Expression auf TIL (negativ=0% vs. positiv >1%) bei (a) vollständiger Resektion (R0,  $p=0,030$ ) vs. (b) mikroskopisch oder makroskopisch unvollständiger Resektion (R1/2,  $p=0,079$ ).

Die Subgruppenanalyse für die Maximalwerte der IDO1-Expression auf TIL im Bereich von 0% bis >25% zeigte das beste mittlere OS bei den R0-resezierten Patientinnen mit IDO1-Expression auf TIL von >10% (4177 Tage  $p=0,076$ ). Daten von R1- und R2-resezierten Patientinnen zeigten das am stärksten reduzierte mittlere OS, wenn die IDO1-Maximalwerte >25% waren (630 Tage vs. 1302 Tage (IDO1 >10%), 801 Tage (IDO1 1-10%) und 779 Tage (IDO1 0%);  $p = 0,079$ ). (Abb. 38)

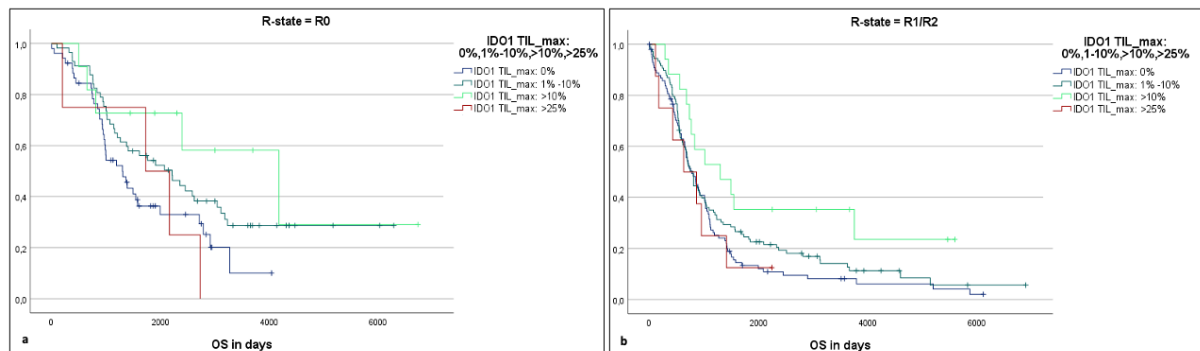


Abbildung 38: Mittleres Gesamtüberleben nach IDO1-Expression auf TILs (Maximalwerte) aufgeschlüsselt nach Prozentgruppen (0%, 1-10%, >10%, >25%) bei (a) vollständiger Resektion (R0,  $p=0,076$ ) vs. (b) mikroskopisch oder makroskopisch unvollständiger Resektion (R1/R2,  $p=0,079$ ).

### 3.4.4 Korrelation IDO1-Expression mit CD3- und CD8-positiven TIL-Subgruppen

Um einen Zusammenhang zwischen IDO1-Expression und den tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Tumormicroenvironment der HGSC darzustellen, analysierten wir ob und inwiefern es Zusammenhänge zwischen den beiden Biomarkern gibt.

Eine kontinuierlich ansteigende IDO1-Expression war mit einer sich ebenfalls erhöhenden Anzahl von TIL pro High Power Field (HPF) in Bezug auf den Mittelwert von CD3-positiven sowie CD8-positiven Lymphozyten verbunden (z. B. CD3-positive TIL bei IDO1 TIL Maximalwert: 0% mit 8,79 TIL/HPF vs. IDO1 TIL Maximalwert: >25% mit 26,0 TIL/HPF), mit statistischer Signifikanz ( $p < 0,001$ ). (Tab. 14)

Tabelle 14: CD3+ und CD8+ TIL (pro HPF, Standardabweichung und Wertespanne) nach IDO1-Expressionsgruppen auf TIL.

	IDO1 0%	IDO1 1-10%	IDO1 >10%	IDO1 >25%	Total	p-Wert
<b>CD3 Epi/HPF</b>	8,74	13,77	20,28	26,00	12,50	
Standardabweichung	8,449	14,000	14,165	33,087	13,594	
Wertespanne	0-56	0-101	6-70	2-117	0-117	<0,001
<b>CD8 Epi/HPF</b>	7,34	11,15	15,13	20,83	10,14	
Standardabweichung	7,684	11,798	12,484	29,670	11,664	
Wertespanne	0-34	0-64	3-62	1-95	0-95	<0,001

Mit zunehmender IDO1-Expression auf Tumorzellen stieg die mittlere Anzahl an TIL. Dies war sowohl für CD3-positive als auch für CD8-positive Lymphozyten signifikant ( $p < 0,001$ ). (Tab. 15)

Tabelle 15: CD3+ und CD8+ TIL (pro HPF, Standardabweichung und Wertespanne) nach IDO1-Expressionsgruppen auf Tumorzellen.

	IDO1 0%	IDO1 1-10%	IDO1 >10%	Total	p-Wert
<b>CD3 Epi/HPF</b>	3,23	10,26	15,87	12,54	
Standardabweichung	5,200	9,803	15,716	13,594	
Wertespanne	0-30	0-51	1-117	0-117	<0,001
<b>CD8 Epi/HPF</b>	2,40	8,49	12,77	10,14	
Standardabweichung	5,198	9,927	12,788	11,664	
Wertespanne	0-30	0-64	0-95	0-95	<0,001

### 3.4.4.1 Korrelation der IDO1-Expression auf TIL und CD3- bzw. CD8-positiver TIL

Die oberste Tertile der epithelialen/intratumoralen CD3-positiven TIL (Mittelwerte) zeigte die größte Relevanz für das mediane OS vor allem innerhalb von Tumoren, die IDO1 auf TIL exprimieren mit Maximalwerten von 1-10% (2248 Tage vs. 1011 Tage (mittlere Tertile) vs. 943 Tage (untere Tertile)).

Konzentriert man sich auf die zuvor hervorgehobene Gruppe mit der IDO1-Expression auf TIL >10%, war das Gesamtüberleben für die epithelial CD3-reichste/Top-Tertile immer noch vorteilhaft (1549 Tage vs. 1497 (mittleres Tertile). Innerhalb der unteren CD3-Epi-Tertile gab es keine Tumoren mit einer IDO1-Expression auf TIL zwischen >10 % und <25%. Alle Daten zum OS in den unterschiedlichen Expressionsgruppen finden sich in Tabelle 16.

Die Daten waren statistisch nicht signifikant mit p-Werten für die obere CD3-positive Epi-Tertile mit  $p=0,271$  (Abb. 39a); die mittlere Tertile mit  $p=0,095$  (Abb. 39b) und die untere Tertile:  $p=0,532$ .

Generell über alle Tertile verteilt hervorzuheben ist das vorteilhafte Langzeit-OS innerhalb der Gruppe von Tumoren mit IDO1-Expression auf Lymphozyten von >10%.

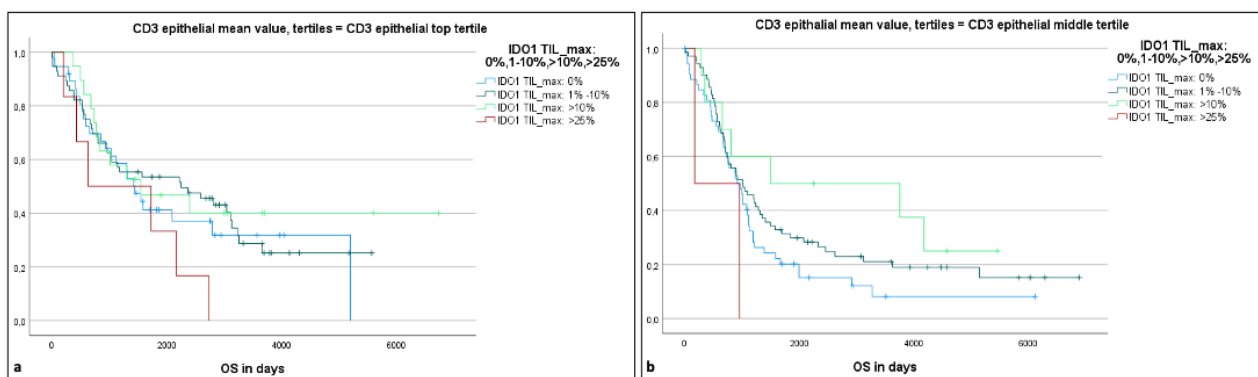


Abbildung 39: Gesamtüberleben in HGSC mit CD3+ epithelialen TIL-Mittelwerte im (a) oberen ( $p=0,271$ ) und (b) mittleren ( $p=0,095$ ) Tertil zusammen mit IDO1- Expression auf TIL (Maximalwerte).

Tabelle 16: Maximale IDO1-Expression auf TIL in Kombination mit der Tertilenanalyse der CD3+ epithelialen TIL und der Einfluss auf das OS (in Tagen).

	IDO1 0%	IDO1 >1-10%	IDO1 >10%	IDO1 >25%	Total	p-Wert
<b>CD3 Epi Mittelwert</b> obere Tertile	1442	2248	1549	630	1569	0,271
<b>CD3 Epi Mittelwert</b> mittlere Tertile	912	1011	1497	174	967	0,095
<b>CD3 Epi Mittelwert</b> untere Tertile	857	943	-	865	926	0,532

Vergleichbare Ergebnisse wie für CD3 wurden auch für die Mittelwerte der epithelialen CD8-positiven-TIL erzielt, wobei sich im Gegensatz zu CD3 das beste OS für Patientinnen mit hohen CD8-Zahlen (Top-Tertile) und einer IDO1-Maximalexpression auf Lymphozyten von >10% ergab. Es zeigte sich ein medianes OS in der oberen Tertile von 2400 Tage (p=0,150) vs. 1302 Tage in der mittleren Tertile (p=0,133) vs. 1497 Tage in der unteren Tertile (p=0,797), ohne statistische Signifikanz. Alle Daten zum OS in den unterschiedlichen Expressionsgruppen finden sich in Tabelle 17.

Im Vergleich zu den CD3-Werten ergab sich jedoch ein relativ verbessertes OS über alle Tertilen wenn IDO1- Expressionen von >10% betrachtet wurde. Das OS sank mit abnehmenden IDO1-Werten: in der oberen Tertile ergaben sich 2076 Tage (bei IDO1 >1-10%) vs. 1311 Tage (bei IDO1 0%), wobei bei IDO1 >25% mit 630 Tagen das kürzeste Gesamtüberleben nachgewiesen wurde. Die Überlebenskurven zeigen eine klare Trennung. (Abb. 40)

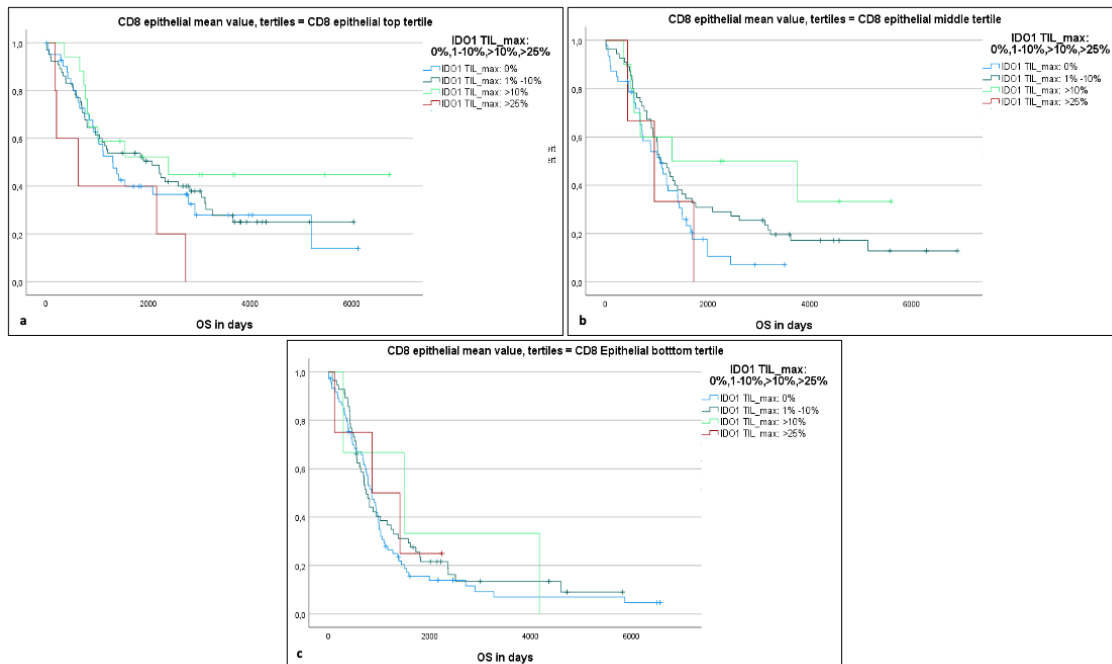


Abbildung 40: Gesamtüberleben (OS) in HGSC mit CD8+ epithelialen TIL (Mittelwert) im (a) oberen  $p=0,150$ , (b) mittleren ( $p=0,133$ ) und (c) unterem ( $p=0,797$ ) Tertil zusammen mit IDO1- Expression auf TIL (Maximalwerte).

Tabelle 17: Maximale IDO1-Expression auf TIL in Kombination mit der Tertilenanalyse der CD8+ epithelialen TIL und der Einfluss auf das OS (in Tagen).

	IDO1 0%	IDO1 >1-10%	IDO1 >10%	IDO1 >25%	Total	p-Wert
<b>CD8 Epi Mittelwert</b> obere Tertile	1311	2076	2400	630	1548	0,150
<b>CD8 Epi Mittelwert</b> mittlere Tertile	1078	1071	1302	953	1078	0,133
<b>CD8 Epi Mittelwert</b> untere Tertile	852	745	1497	865	813	0,797

### 3.4.4.2 Korrelation der IDO1-Expression auf Tumorzellen und CD3- bzw. CD8-positiver TIL

Die Kombination aus hoher Anzahl an intratumoralen/epithelialen CD3-positiven TIL (obere Tertile, Bereich 14-117/HPF) und einer IDO1-Expression auf Tumorzellen >10% zeigte ein überlegenes medianes OS von 2167 Tagen vs. 1118 Tagen für eine IDO1-Expression >1-10% und nur 547 Tagen bei IDO1 0% ( $p=0,138$ ).

Innerhalb der mittleren und unteren Tertile der CD3-positiven TIL schnitt auch die Gruppe der IDO1 >10% am besten ab, mit insgesamt verkürztem OS ( $p=0,019$  und  $p=0,879$ ). (Tab. 18)

*Tabelle 18: Maximale IDO1-Expression auf Tumorzellen – mittleres Gesamtüberleben in Tagen anhand der verschiedenen Tertilen für den CD3 Mittelwert.*

	<b>IDO1 0%</b>	<b>IDO1 &gt;1%</b>	<b>IDO1 &gt;10%</b>	<b>Total</b>	<b>p-Wert</b>
<b>CD3 Epi Mittelwert</b> obere Tertile	547	1118	2167	1569	0,138
<b>CD3 Epi Mittelwert</b> mittlere Tertile	1011	732	1112	967	0,019
<b>CD3 Epi Mittelwert</b> untere Tertile	906	847	1017	926	0,879

Auch bei CD8-reichen Tumoren (obere Tertile) war die IDO1-Expression >10% auf Tumorzellen am vorteilhaftesten (2167 Tage vs. 810 Tage für >1-10% vs. 626 Tage mit 0%), wobei zu erwähnen ist, dass hier kein statistisch verlässlich verwertbarer Prozentsatz für Fälle mit >25% IDO1-Expression erreicht wurde. (Tab. 19)

*Tabelle 19: Maximale IDO1-Expression auf Tumorzellen – mittleres Gesamtüberleben in Tagen anhand der verschiedenen Tertilen für den CD8 Mittelwert.*

	<b>IDO1 0%</b>	<b>IDO1 &gt;1%</b>	<b>IDO1 &gt;10%</b>	<b>Total</b>	<b>p-Wert</b>
<b>CD8 Epi Mittelwert</b> obere Tertile	626	810	2167	1548	0,112
<b>CD8 Epi Mittelwert</b> mittlere Tertile	560	1010	1409	1078	0,022
<b>CD8 Epi Mittelwert</b> untere Tertile	906	745	881	813	0,674



### 3.4.5 Korrelation von IDO1- und PD-L1-Expression anhand des CPS-Wertes

Vergleichende Analysen von IDO1 und PD-L1 unter Verwendung des Combined Positive Score zeigten, wie in Abschnitt 3.3.3.1 bereits beschrieben, dass die meisten Tumoren mit CPS <5 auftraten (n=339, 87,6%), während n=48 (12,4%) einen CPS > 5 zeigten.

Die Analyse für PD-L1 in Korrelation mit der IDO1-Expression auf Tumorzellen zeigte die relative Dominanz IDO1-exprimierender Tumoren mit IDO1-Werten >10% sofern PD-L1 mit einem CPS von >5 exprimiert wurde (n=38/48, 79,2%). Auch das Gesamtkollektiv präsentierte eine relativ überwiegende IDO1-Expression von >10% auf Tumorzellen unabhängig von der PD-L1-Expression (n=205/387, 53,0%). Unabhängig vom PD-L1-Wert wurde das beste mediane Überleben von Patientinnen erreicht, deren Tumorzellen IDO1 >10% exprimierten (CPS <5: 1209 Tage, CPS >5: 3257 Tage). (Tab. 20)

*Tabelle 20: IDO1-Expression auf Tumorzellen (Maximalwerte), in Kombination mit PD-L1-Expression gemäß CPS-Maximalwert </>5 (n.a. = nicht anwendbar, mittleres OS wurde nicht erreicht).*

	IDO1 0%	IDO1 >1-10%	IDO1 >10%	Total	p-Wert, Pearson $\chi^2$
<b>CPS &lt;5</b>	<b>38 (97,4%)</b>	<b>134 (93,7%)</b>	<b>167 (81,5%)</b>	<b>339 (87,6%)</b>	<b>0,001 (<math>\chi^2</math>)</b>
5-Jahres Überleben (%)	18,9	20,9	34,3		
10-Jahres Überleben (%)	14,2	10,9	17,8		
medianes OS (Tage)	906	847	1209	996	0,031
<b>CPS &gt;5</b>	<b>1 (2,6%)</b>	<b>9 (6,3%)</b>	<b>38 (18,5%)</b>	<b>48 (12,4%)</b>	<b>0,001 (<math>\chi^2</math>)</b>
5-Jahres Überleben (%)	0,0	33,3	63,2		
10-Jahres Überleben (%)	0,0	n.a.	48,6		
mittleres OS (Tage)	117	865	3257	2400	<0,001

Die Daten der IDO1-Expression auf Lymphozyten in Zusammenschau mit der PD-L1-Expression zeigen ein dominantes Vorkommen der IDO1-Expression im Rahmen 1-10%. Im Übrigen zeigt IDO1 eine recht homogene Verteilung

wengleich quantitativ geringem Vorkommen bei einer Expression von >10% und >25% auf TILs, unabhängig vom PD-L1-Status. Betrachtet man IDO1 und PD-L1 gemeinsam, so zeigt sich ein deutlich verbessertes medianes OS für PD-L1-positive Patientinnen (CPS >5) in der Gruppe der 1-10% IDO1-exprimierenden Tumore (CPS <5: 1018 Tage vs. CPS >5: 3257 Tage), wobei nur die Daten für CPS >5 statistisch signifikant sind. Hinsichtlich der Gruppe PD-L1 gering exprimierender oder negativer Tumore (CPS <5) besteht der vorteilhafteste Effekt auf das mediane OS in der Gruppe IDO1 >25% mit 1727 Tagen, ohne statistische Signifikanz (p=0,254), wengleich die Fallzahl dieser Gruppe sehr gering ausfällt (n=5, 1,5%). (Tab. 21, Abb. 42)

*Tabelle 21: IDO1-Expression auf TIL (Maximalwerte), in Kombination mit PD-L1-Expression gemäß CPS-Maximalwert </>5, sowie 5- und 10-Jahres-Überleben. (n.a. = nicht anwendbar, mittleres OS wurde nicht erreicht).*

	<b>IDO1 0%</b>	<b>IDO1 &gt;1-10%</b>	<b>IDO1 &gt;10%</b>	<b>IDO1 &gt;25%</b>	<b>Total</b>	<b>p-Wert, Pearson <math>\chi^2</math></b>
<b>CPS &lt;5</b>	<b>163 (97,6%)</b>	<b>155 (87,1%)</b>	<b>16 (53,3%)</b>	<b>5 (41,7%)</b>	<b>339 (87,6%)</b>	<b>&lt;0,001 (<math>\chi^2</math>)</b>
5-Jahres Überleben (%)	21,5	33,0	31,3	40,0		
10-Jahres Überleben (%)	10,2	15,6	20,8	0,0		
medianes OS (Tage)	948	1018	810	1727	996	0,254
<b>CPS &gt;5</b>	<b>4 (2,4%)</b>	<b>23 (12,9%)</b>	<b>14 (46,7%)</b>	<b>7 (58,3%)</b>	<b>48 (12,4%)</b>	<b>&lt;0,001 (<math>\chi^2</math>)</b>
5-Jahres Überleben (%)	75	56,5	71,4	14,3		
10-Jahres Überleben (%)	0,0	42,8	59,5	0,0		
mittleres OS (Tage)	n.a.	3257	n.a.	630	2400	0,002

In Bezug auf die kleine Anzahl von Patientinnen mit CPS >5 (n=48) war das mittlere OS in der Gruppe von IDO1-Maximalwerten 1-10% am besten (3257 Tage vs. 630 Tage (IDO1 TIL Maximalwert >25%, p=0,002). Innerhalb der PD-L1-positiven CPS >5-Kohorte zeigten Tumore, die TIL mit einer IDO1-Expression >25% aufwiesen, den schlechtesten Verlauf. (Abb. 41)

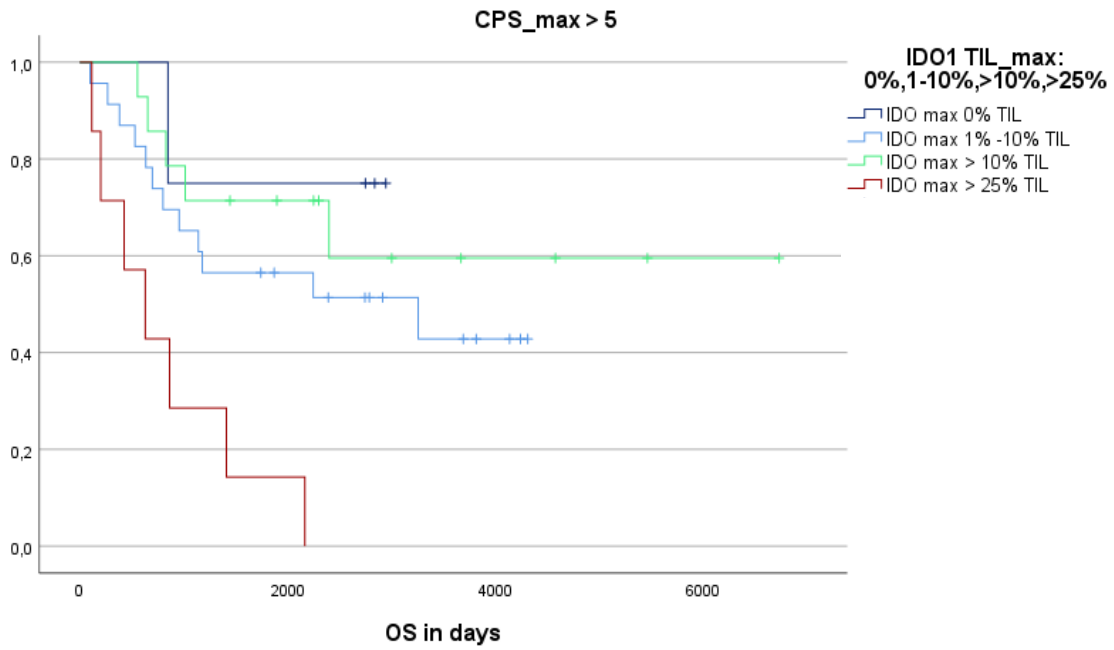


Abbildung 41: Korrelation der IDO1-Expression auf TIL in aufsteigender Reihenfolge (Prozent, schrittweise) in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression CPS-Maximalwert >5.  $p=0,002$ .

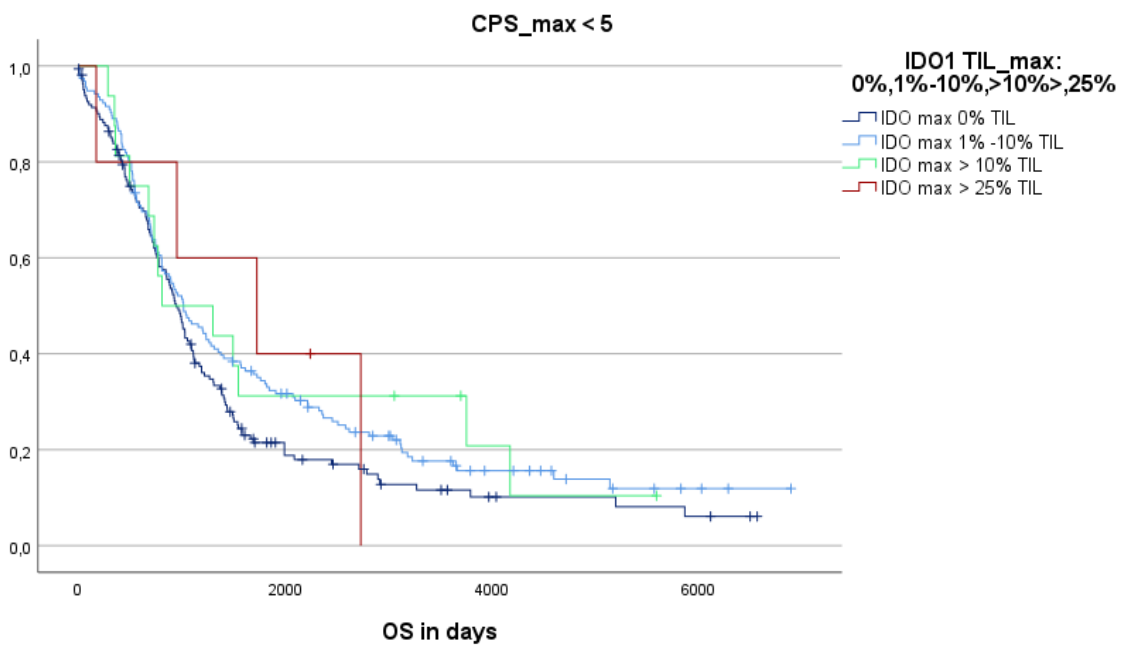


Abbildung 42: Korrelation der IDO1-Expression auf TIL in aufsteigender Reihenfolge (Prozent, schrittweise) in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression CPS-Maximalwert <5.  $p=0,254$ .

Einzel-Analysen von IDO1 auf TIL in Korrelation mit PD-L1 CPS  $\leq$ / $>$ 5 betonen die vorteilhafte Wirkung innerhalb der  $>10$ -25%-IDO1/PD-L1-CPS  $>$ 5 Gruppe ( $p=0,020$ ), gefolgt von 1-10%-IDO1/PD-L1-CPS  $>$ 5 ( $p= 0,026$ ). (Abb. 43)

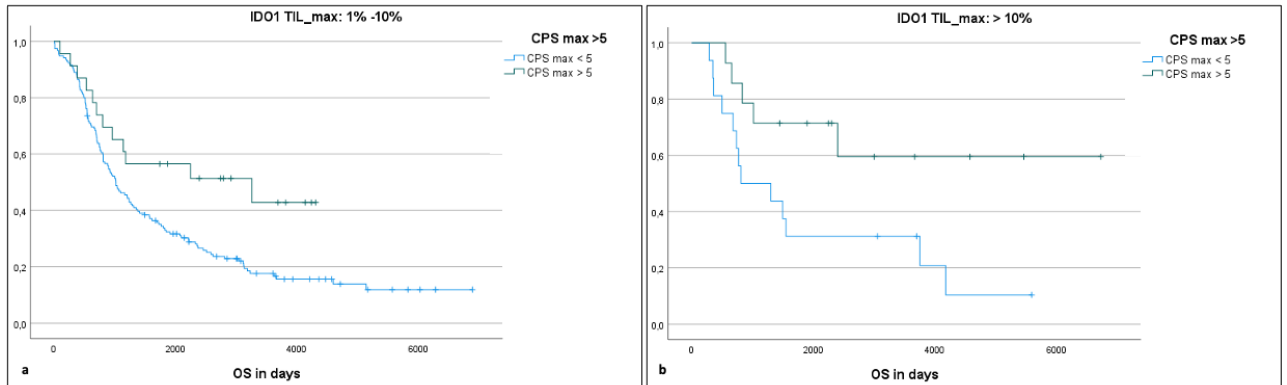


Abbildung 43: IDO1-Expression von (a) 1-10% ( $p=0,020$ ) und (b)  $> 10\%$  ( $p=0,026$ ) in Korrelation mit PD-L1-Expression (CPS-Maximalwerte  $\leq$ / $>$ 5).

Box-Plot-Analysen der PD-L1 (CPS)-Werte-Verteilung in Korrelation mit IDO1-Maximalwerten sowohl auf TIL als auch auf Tumorzellen, strukturiert nach Prozentgruppen 0%, 1-10%, >10% bzw. zusätzlich >25%, zeigen positive Korrelationen, d.h. ein Anstieg von IDO1 auf TIL und Tumorzellen korreliert mit höheren PD-L1 CPS-Werten. (Abb. 44)

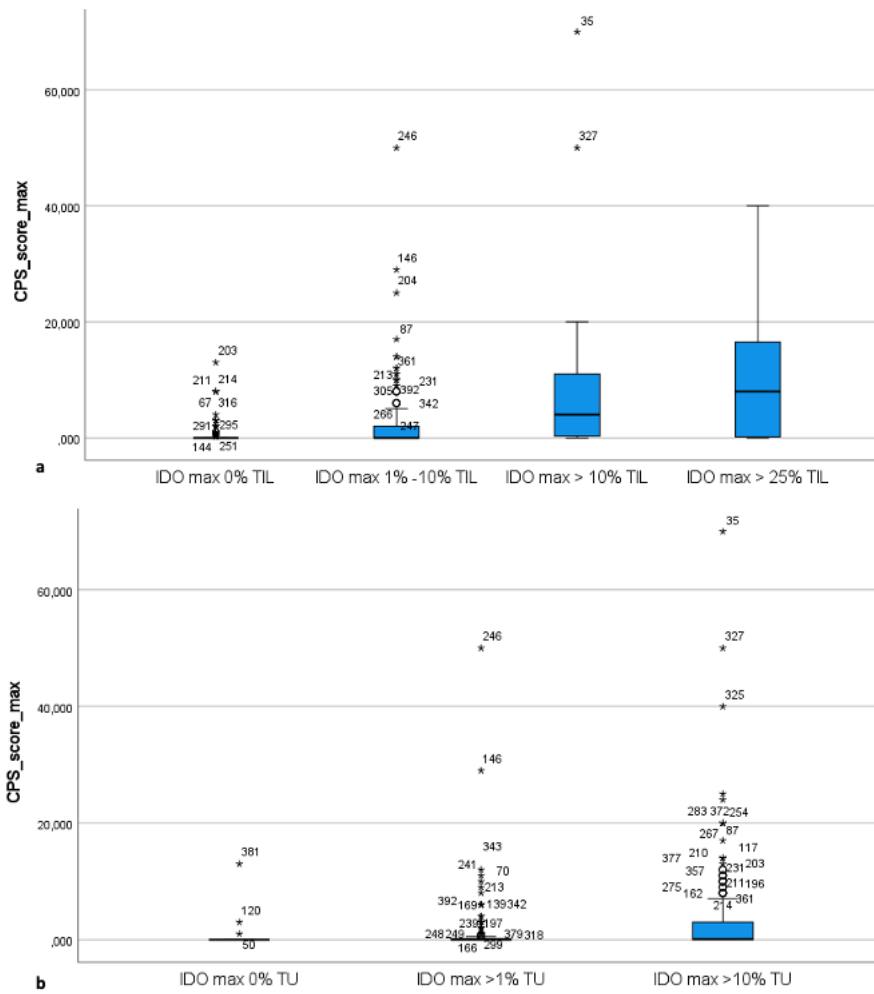


Abbildung 44: Box-Plot-Diagramm der IDO1-Expression auf (a) TIL (Maximalwert) und (b) Tumorzellen zusammen mit der PD-L1-Expression unter Verwendung von CPS  $\geq 5$  (explorative Datenanalyse).

### 3.4.6 Korrelation von IDO1- und PD-L1-Expression anhand des TPS-Wertes

Analysen von PD-L1 unter Verwendung des Tumor Proportion Score liefern ähnliche Ergebnisse für die Verteilung von PD-L1 und IDO1 innerhalb der Kohorte mit Überwiegen von PD-L1-gering exprimierenden und PD-L1-negativen Fällen (TPS <5) und einer Assoziation von TPS >5%, wenn auf Tumorzellen IDO1 exprimiert wird. Diese Analysen sind statistisch signifikant mit einer Dominanz IDO1>10% exprimierender Tumoren in der Gruppe mit PD-L1 Vorkommen >5% (TPS),  $p=0,009$ . (Tab. 22+23)

Tabelle 22: IDO1-Expression auf TIL (Maximalwerte), in Kombination mit PD-L1-Expression gemäß TPS-Maximalwert </>5%.

	IDO1 0%	IDO1 >1%	IDO1 >10%	IDO1 >25%	Total	p-Wert, Pearson $\chi^2$
TPS <5%	158 (94,0%)	172 (94,5%)	26 (86,7%)	10 (83,3%)	366 (93,4%)	0,201
TPS >5%	10 (6,0%)	10 (5,5%)	4 (13,3%)	2 (16,7%)	26 (6,6%)	

Tabelle 23: IDO1-Expression auf Tumorzellen (Maximalwerte), in Kombination mit PD-L1-Expression gemäß TPS-Maximalwert </>5%.

	IDO1 0%	IDO1 1-10%	IDO1 >10%	Total	p-Wert, Pearson $\chi^2$
TPS <5%	39 (100%)	142 (96,6%)	185 (89,8%)	366 (93,4%)	0,009
TPS >5%	0 (0,0%)	5 (3,4%)	21 (10,2%)	26 (6,6%)	

## **4 Diskussion**

### **4.1 Re-Klassifikation**

Wir konnten zeigen, dass anhand des hier verwendeten immunhistologischen Algorithmus 82,4% der zwischen 1999 und 2015 gestellten Originaldiagnosen bestätigt werden konnten. 76 Fälle (15,2%) wurden erfolgreich in andere Histotypen um-klassifiziert. Damit konnte in 97,6% der Fälle eine schlüssige histologische Klassifikation vorgenommen werden, was mit kürzlich veröffentlichten größeren Studien übereinstimmt, die Klassifikationsdaten mit Konkordanz 88-93% angeben [21].

Dennoch war in 2,4% der Fälle die Re-Klassifikation nicht möglich da Morphologie und Immunhistochemie zu stark divergierten. Weitere Analysen mit NGS werden derzeit in unklaren Fällen durchgeführt, um Mutationen oder Aberrationen zu identifizieren, die für die verschiedene Histotypen von Eierstockkrebs typisch sind. Dieser Ansatz ist besonders wichtig, wenn das Ziel darin besteht, gut definierte Kohorten für die translationale Forschung zu etablieren, die Histotyp-spezifische prognostische Marker und therapeutische Ziele anstrebt.

Jedoch bleibt zu beachten, dass die hier untersuchte Stichprobe aufgrund einer Überrepräsentation der primär als seröse Karzinome diagnostizierten Fälle, in ihrer Repräsentativität eingeschränkt ist. Die Re-Klassifikation im Rahmen dieser Arbeit diene vor allem der primären einheitlichen Klassifikation der dann weiter untersuchten Fälle mit dem Ziel, eine klar definierte Kohorte von HGSC zu schaffen.

### **4.2 Tumor infiltrierende Lymphozyten (CD3, CD8)**

Der Nachweis von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) hat sich als positiver prognostischer Faktor bei einer Reihe von soliden Krebsarten etabliert, zum Beispiel beim Melanom [72] oder Kolonkarzinom [73].

Auch im Ovar ist beschrieben, dass das Vorhandensein einer hohen Anzahl TIL mit einer Platinsensitivität, einem längeren progressionsfreien Überleben und einem längeren Gesamtüberleben korreliert [74].

Eine deutsche Arbeitsgruppe untersuchte bereits seröse Ovarialkarzinome im FIGO-Stadium III und fand, dass hohe Zahlen an stromalen und intratumoralen CD8-positive Lymphozyten ein prognostisch vorteilhafter Indikator für ein verbessertes OS darstellen [75].

Die Überlebensvorteile von TIL in Ovarialkarzinomen sind vielfältig beschrieben und auch wir konnten dies bestätigen. So konnten wir zeigen, dass Patientinnen mit Tumoren mit einer hohen Zahl CD3-positiver Lymphozyten und damit vielen T-Lymphozyten ein signifikant längeres Gesamtüberleben aufweisen (1569 Tage in der Top Tertile vs. 926 in der niedrigsten Tertile,  $p < 0,001$ ). Auch für Patientinnen mit Tumoren mit hohen CD8- Werten, also mit vielen zytotoxischen T-Lymphozyten zeigte sich ein signifikant längeres Gesamtüberleben.

Eine hohe Anzahl von epithelialen CD8-positiven TIL wurde in unserer Studie sowohl in der Einzelanalyse als auch zusammen mit der PD-L1-Expression mit vorteilhaftem OS und DFS in Verbindung gebracht. Unsere Studie mit einem Follow-Up von fast 20 Jahren (mittleres Follow-Up 52,62 Monate) bestätigt die Hypothese eines vorteilhaften OS und DFS für die hohe Anzahl an CD8- sowie CD3-positiven TIL in der oberen Tertile (CD8+ epitheliale TIL: obere Tertile 1548 Tage vs. mittlere Tertile 1078 Tage vs. untere Tertile 813 Tage,  $p < 0,001$ ).

### **4.3 PD-L1**

Der Mechanismus von Ligandenbindungsprozessen zwischen Tumorzellen, die PD-L1 exprimieren, und spezifischen T-Zellen (PD-1) besteht in einer immunmodulatorischen und final inhibitorische Funktion dieses Co-Rezeptors. Im menschlichen Körper regulieren solche ko-inhibitorischen Signale die Homöostase und Immunabwehr, außerdem schützen sie die Gewebeintegration. Die Aktivierung von PD-1 im Rahmen einer vorliegenden malignen Neoplasie führt zur Beendigung der T-Zell-Aktivität und Unterdrückung des T-Zell-Rezeptor-Signalwegs (TCR) und führt schließlich zu einer Immuntoleranz. Das Vorhandensein von PD-L1 auf Tumorzellmembranen wird als „Immune Escape“ bezeichnet, da durch die somit im Tumor initiierte PD-1 Aktivierung auf Lymphozyten die Tumorzelle nicht als solche vom Körper erkannt und demnach angegriffen wird. Durch (therapeutische) Blockade von PD-1 und PD-L1 über



Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) kann diese hemmende Wirkung aufgehoben werden [76, 77].

Hypothesen für die PD-L1-Expression in Tumorzellen beschreiben eine mögliche Hochregulation, welche durch eine Aktivierung des onkogenen Signalwegs (PIK3CA/AKT/mTOR) in Tumorzellen bei Tumoren ohne lymphatische Infiltration zustande kommt („angeborene Immunresistenz“) oder eine IFN- $\gamma$ -Expression durch TIL mit anschließender PD-L1-Expression auf Tumorzellen („adaptive Immunantwort“), was zu einer „Immune Escape“ führt [78-82].

Mit Blick auf das Tumormicroenvironment wurde die PD-L1-Expression mittels CPS über den DAKO 22C3-Antikörper im Vergleich zum TPS mittels AbCam 28-8-Antikörper bislang noch nicht vergleichend an Eierstockkrebsgewebe untersucht, wohingegen in anderen Tumorentitäten wie dem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) die PD-L1-Klone harmonisiert wurden und austauschbar anwendbar sind [83-85]. Unsere Studie geht genau dieser praktischen Frage zur Anwendbarkeit und der Ergebnisse bzw. deren Abweichung voneinander bei Verwendung verschiedener Antikörper desselben Biomarkers nach. Bei Plattenepithelen des Kopf-Hals-Bereichs z.B. wurden in einer kürzlich durchgeführten Studie fünf PD-L1-Klone verglichen und unterschiedliche Ergebnisse erzielt, was die Diskrepanzen bei der Färbung und deren Endbewertung unterstreicht, sodass eine kritische und stellenweise typgenaue, spezifische Anwendung von Nöten zu sein scheint [86].

Eine neuere Studie, die die Zuverlässigkeit der PD-L1-Expressionuntersuchung in Lungenbiopsien prüften, erwiesen sich auch an kleineren Gewebefragmenten als zuverlässig und mit dem Gesamttumor final übereinstimmend, selbst wenn die Tumorbiopsate eine Heterogenität aufwiesen [87]. Ähnlich dem Biopsat-Modell erfolgte unsere Studie erfolgte an TMAs, bei denen mit mindestens 3 Proben verschiedene Tumorbereiche der einzelnen Tumoren und damit auch ihre Heterogenität abgebildet wird.

In der aktuellen Literatur finden sich gegensätzliche Ergebnisse zur PD-L1-Expression in Bezug auf Vorteile im OS und PFS, sowohl in Einzel-Analysen als auch im Vergleich mit TIL-Zahlen.

Mills et al. untersuchten CD8+ zytotoxische T-Zellen zusammen mit PD-L1 und anderen Biomarkern unter anderem bei HGSC [68, 78, 88, 89]. Sie zeigten einen Trend zu verbessertem Überleben für PD-L1-exprimierende Tumore, insbesondere wenn hohe CD8-Zahlen registriert wurden, dies entspricht ( $\geq 13$  CD8+TILs/HPF) [68].

Dem gegenüber stehen Daten von u.a. Karakaya et al. und andern, welche eine schlechte prognostische Auswirkung für PD-L1-positive und TIL-reiche Ovarialtumoren feststellten [90-92]. Die derzeitigen Ergebnisse der Biomarker-Expression in HGSC und stellenweise auch die Menge und zuverlässige Cut-Offs der tumorinfiltrierenden Lymphozyten sind diskrepant oder schlichtweg nicht vorhanden, geschweige denn reproduzierbar.

In unserer Studie war der Anteil PD-L1-exprimierender HGSC insgesamt gering. 28,2% der Patientinnen zeigten eine Positivität (CPS  $\geq 1$ ). In 12,4% (n=48/387) der Fälle war der CPS-Maximalwert  $>5$ . Bei der TPS-Analyse zeigten 89 Patientinnen (23,0%) eine PD-L1-Expression  $\geq 1\%$ . Dies weist darauf hin, dass bei Verwendung des CPS unter Einbeziehung von Lymphozyten und Makrophagen in das Bewertungssystem die Population von Patientinnen mit PD-L1-Positivität zunimmt und Türen für eine potenzielle Behandlung öffnet, sollte in Zukunft ein obligatorischer Schwellenwert zur ICI-Therapie angefordert werden.

Patientinnen mit einer PD-L1-Expression von CPS  $>5$  zeigten ein deutlich verbessertes OS (2400 vs. 996 Tage) gegenüber Tumoren mit CPS  $<5$ , mit statistischer Signifikanz ( $p < 0,001$ ). Die Daten für den 28-8 Antikörper liefern vergleichbare Ergebnisse (TPS  $<5\%$ : 1011 Tage vs. TPS  $>5\%$ : 1387 Tage), wenngleich ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,129$ ), sodass in der praktischen Anwendung unserer Meinung nach der CPS unter Verwendung des Dako 22C3-Antikörpers zu bevorzugen wäre. In Assoziation mit dem TIL-Vorkommen, sowohl CD3+ als auch CD8+, konnten wir synergistische Effekte nachweisen. So zeigten Patientinnen in der oberen CD3+ Tertile und einem CPS  $>5$  das längste Gesamtüberleben mit 2400 Tagen gegenüber 865 Tagen in der mittleren und unteren Tertile, sowie 1424 Tagen bei CPS  $<5$  in der CD3-Top Tertile ( $p < 0,001$ ).

Vergleichbare Daten mit statistischer Signifikanz konnten wir auch für PD-L1 zusammen mit nach Tertilen aufgegliederten CD8+ TIL-Werten finden (CPS >5/CD8 Epi Top Tertile: 3257 Tage vs. CPS <5/CD8 Epi Top Tertile: 1209 Tage,  $p < 0,001$ ).

Wachsendes Interesse am Tumormikroenvironment und verschiedene Forschungsaktivitäten erweitern derzeit therapeutische Ansätze und Alternativen zur Regeltherapie. Als klinische Folge sind Anti-CTLA4-Therapeutika (zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4) (Ipilimumab, Tremelimumab) und Anti-PD-L1-Medikamente (Pembrolizumab, Nivolumab, Atezolizumab) bereits für mehrere Tumorentitäten zugelassen, einige abhängig von Biomarker-Scores, andere mittlerweile Score-unabhängig anwendbar, wie beim malignen Melanom [93-98].

Vornehmlich in Patienten mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen kommen anti-PD-1/PD-L1 Therapien – ob solo oder als Kombinationstherapie - zum Einsatz, wie dem metastasierten Mammakarzinom, dem terminalen malignen Melanom oder NSCLC. Atezolizumab in Kombination mit NAB-Paclitaxel-Chemotherapie im metastasierten triple-negativen Mammakarzinom beispielsweise zeigte ein verbessertes Gesamtüberleben von 25,0 Monaten für PD-L1-positive Patientinnen (OS) und einem medianen Progressions-freien Überleben von 7,5 Monaten [99]. Die Kombinationstherapie von anti-PD-1/PD-L1 Antikörpern zusammen mit anti-CTLA4-Antikörpern zeigte eine Effektivität von bis zu 60%, unter anderem im malignen Melanom oder dem fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom (verglichen mit 20-25% in der Monotherapie) [100, 101].

Weitere Therapieansätze kreisen um Poly (ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitoren (PARPi), wie das für Patientinnen mit BRCA-Mutation zugelassene Olaparib als Erhaltungstherapie nach Erstlinien-Chemotherapie und bei platinsensitivem Rückfall, sowie Niraparib und Rucaparib bei platinsensitivem Rückfall unabhängig vom BRCA-Status [102]. Für alle diese Medikamente wurde ein verbessertes progressionsfreies Überleben (PFS) beobachtet, während nur eine geringere Auswirkung auf das OS nachgewiesen werden konnte [103-108]. Dies könnte auf eine hohe Neoantigenlast von BRCA-mutierten Tumoren

zurückzuführen sein, wobei die Tumorprogression zuerst eingedämmt wird, final der Effekt des Therapeutikums auf die Tumorzelle durch die Tumorvariabilität und hohe Mutationslast jedoch zu gering ausfällt und das OS nicht wesentlich verlängert werden kann. Aktuelle therapeutische Strategien kombinieren PARPi mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) und anderen Wirkstoffen [109, 110]. Trotz all des Lobs für neue therapeutische Modalitäten sollten auch die schwerwiegenden Nebenwirkungen dieser Medikamente wie Nausea, Emesis, Diarrhoe, Colitis, Exantheme sowie Nieren-, Leber-, neurologische und endokrine Störungen mitbedacht werden [111]. Auf der anderen Seite bemerkenswert ist, dass die Korrelation zwischen einer hohen Tumormutationslast (TMB) und dem Ansprechen auf eine Immuntherapie zur Zulassung von Anti-PD1-Medikamenten für hochgradig mutierte Krebsarten geführt hat, welche einen Defekt der Mismatch-DNA-Repair aufwiesen [102, 112-115].

In der Vergangenheit wurde PD-L1 oft als „Heiliger Gral“ für die Tumorthherapie bewertet. Heute nehmen die Diskussionen darüber zu, wie und warum eine Anti-PD-L1-Behandlung keine oder nur wenig zufriedenstellenden Ergebnisse bei epithelalem Ovarialkarzinom zeigt. Eine Ursache könnte eine unzureichende Diagnostik der unterschiedlichen Tumortypen und somit Kohorten-„Unreinheit“ sein [116]. Dies ist eine Stärke unserer gut klassifizierten Kohorte von HGSC mit Langzeit-Follow-Up. Ein weiterer derzeit viel diskutierter Grund für den unzureichenden Therapieerfolg von gegen PD-L1-gerichteten Medikamenten ist die hochgradige Immunmodulation des HGSC. Wenn ein Tumor nicht der PD-L1-Achse für die „Immune Escape“ folgt, gibt es noch viele andere Mechanismen und hochregulierte Checkpoint-Gene wie beispielsweise *TIGIT* und *LAG3*, die ein potenzielles Therapeutikum angehen müsste, um diese hochaggressiven Tumorzellen zu eliminieren [117-119].

Dies ist die erste Studienkohorte an reinen HGSC und einer Größe von 392 Fälle mit Langzeit-Follow-Up und Analyse der Tumormikroumgebung.

In früheren Studien wurde außerdem der Subtyp des „high-grade serösen Karzinoms des Ovars“ weitergehend in vier molekulare Untergruppen eingeteilt (C1=mesenchymal, C2=immunreaktiv, C4=differenziert, C5=proliferativ) [10].

Innerhalb unserer Kohorte mit Fokus auf tumorinfiltrierende Lymphozyten und immunregulatorische Prozesse ist es denkbar, dass die TIL-reichen und PD-L1-exprimierenden Tumoren den C2-Subtyp bilden. Dies muss jedoch weiterführend untersucht werden. In Studien von Kassuhn und Kollegen zeigte der C2-Subtyp das längste OS und DFS [120].

Zukünftige Studien zur kombinierten klinischen und histologischen Untersuchung von Tumorsubgruppen, Korrelation von intraoperativen makroskopisch/klinischen und mikroskopisch/histologischen Befunden, Zuordnung unserer Kohorte zu den molekularen Subtypen C1, C2, C4 und C5 sowie weiteren Biomarkern werden zum Verständnis der Tumorbilogie und Eigenschaften beitragen.

#### **4.4 IDO1**

Die IDO1-Expression bei Ovarialkarzinomen ist bisher nur wenig untersucht. In der aktuellen Literatur zu IDO1 wird dieses Enzym aufgrund seiner biologischen Funktion meist mit einer schlechten Prognose und reduzierten Überlebensraten in Verbindung gebracht [121].

In Untersuchungen zu IDO1 in andern Tumorentitäten (Magenkarzinom, Larynxkarzinom) zeigten sich, dass seine hohe IDO1-Expression mit einem schlechteren Outcome verbunden war [122, 123].

Amobi-McCloud und Kollegen untersuchten mehrere metabolische Derivate aus dem enzymatischen Stoffwechsel von IDO1 an Ovarialkarzinomen mit nachteiligen Auswirkungen auf die T-Zell-Aktivität durch Induktion der T<sup>reg</sup>- (regulatorische T-Zellen) Stimulation. Sie fanden ein signifikant verbessertes OS und DFS für TIL<sup>high</sup>/IDO1<sup>low</sup>-Patientinnen. Zu beachten dabei ist, dass diese Kategorien von TIL<sup>high</sup> und IDO1<sup>low</sup> durch Genexpressionsanalyse definiert wurden, sodass kein quantitativer Cut-Off oder eine histomorphologische Anpassung oder Korrelation vorgenommen wurde.

Ferner konnte an kleinen Kollektiven gezeigt werden, dass Patientinnen mit einer hohen IDO1-Expression im Vergleich zu Patientinnen mit keiner oder niedriger

IDO1-Expression ein signifikant schlechteres Gesamt- und progressionsfreies Überleben hatten [67, 69, 124].

Innerhalb unseres Kollektivs von 392 diagnostizierten und zuvor immunhistochemisch (re-)klassifizierten HGSC fanden wir verwertbare Daten bezüglich einer zytoplasmatischen Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Expression sowohl auf TIL als auch auf Tumorzellen, die wir mit zuvor erhobenen PD-L1-Daten korrelieren konnten, für 387 Fällen. Die IDO1-Expression war auf Tumorzellen besonders hoch (89,9% der Fälle, n=348/387). Mehr als die Hälfte der Tumoren präsentierte IDO1 auf TIL (56,8%, n=220/387).

Mills und Kollegen untersuchten IDO1 bereits bei 112 afroamerikanischen Frauen und zeigten IDO1-Raten von 58% in allen Fällen, dabei aber nur 6% mit einer Positivität zwischen 11-25%. Hier wurde die IDO1-Expression auf Tumorzellen untersucht. Innerhalb unserer Kohorte fanden wir eine IDO1-Expression von >10% auf TIL bei 10,9% (n=42/387; davon 3,1%, n=12/387 mit IDO1 >25 %) und auf Tumorzellen bei 53% von >10% IDO1 (n=205/387).

Die Gruppe um Mills zeigte einen Trend zu einem verbesserten Überleben für PD-L1 sowie für IDO1-exprimierende Tumore. Vor allem aber für PD-L1-exprimierende Tumore, wenn sich zusätzlich ein hohes Vorkommen an CD8-positiven TIL vorzufinden war [68].

In unserer Studie zeigte eine zunehmende IDO1-Expression sowohl auf Tumorzellen als auch auf TIL eine zunehmende positive Wirkung auf das OS und DFS. Wurde jedoch auf TIL das IDO1-Expressionslevel von 25% überschritten, verschlechtern sich die Prognosen der Patientinnen radikal, insbesondere bei Tumoren mit hohen TIL-Werten (CD3+ Top Tertile/IDO1 auf TILs >10%: 1549 Tage ( $x^2=0,271$ ) und CD8+ Top Tertile/IDO1 auf TILs >10%: 2400 Tage,  $x^2=0,150$ ). Ähnliche Ergebnisse fanden wir für die Assoziation von IDO1-Expression auf Tumorzellen (TU) mit Lymphozyten-Werten (CD3+ Top Tertile/IDO1 auf TU>10%: 2167 Tage ( $x^2=0,138$ ) und CD8+ Top Tertile/IDO1 auf TU>10%: 2167 Tage,  $x^2=0,112$ ). Tumore mit niedrigen TIL-Raten zeigen ohnehin schlechtere klinische Verläufe, noch mehr als IDO1-negative Tumoren.

Wir vermuten, dass IDO1 in immunologisch „heißen“ Tumoren entzündungsfördernde und T-Zell-anziehende Prozesse auslöst, indem es eine immunogene Opsonierung über Zellzerfallsprodukte auslöst. Dieser Prozess führt zu einer T-Zell-Stimulation und zu vorteilhaften Vorgängen die biologische Selbstverteidigung betreffend, solange die T-Zell-Antwort und die Bildung aktiver immunsuppressiver Metabolite ausgeglichen sind oder die T-Zell-Aktivität überwiegt. Dieser Mechanismus scheint bei einem IDO1-Wert  $>10\%$  aber  $<25\%$  am effektivsten. Bei einem Überschreiten des Schwellenwerts von IDO1  $>25\%$  überwiegt die immunsuppressive Wirkung des Enzyms und führt zu drastisch reduzierten OS- und DFS-Raten.

Der umgekehrte Mechanismus ist ebenfalls denkbar, d. h. die Lymphozyten-Zahl dominiert primär und induziert eine IDO1-Aktivität und dessen Expression in Tumorzellen, sodass der zuvor beschriebene biologische Wirkmechanismus greift.

In beiden Fällen kann die Verwendung von Checkpoint-Inhibitoren gegen IDO1 als Therapeutika zu einer erhöhten Befähigung und Wirksamkeit des Immunsystems des Wirts in Bezug auf Tumorabwehrmechanismen führen. Amobi-McCloud et al. beschrieben erhöhte Frequenzen von PD-1+/CD8+ TILs, wenn der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR), der Teil der IDO1- und PD-1/PD-L1-Achse ist, durch erhöhtes IDO1 auf Tumorzellen aktiviert wurde [121].

Zusammenfassend wird IDO1 in fast 50% der HGSC exprimiert, mit günstiger Prognose bei  $>10\%$  bis  $<25\%$  und unerwünschten Wirkungen ab  $>25\%$ , was auf eine wichtige Rolle in der Tumormikroumgebung hindeutet. IDO1 könnte ein potenzielles therapeutisches Ziel für Checkpoint-Inhibitoren darstellen und neben anderen Checkpoint-Inhibitoren wie PD-L1 als „Enthüller“ von Tumorbereichen für deren chirurgische Resektion fungieren. Aufgrund der deutlich schlechteren Überlebensdaten für Tumoren mit IDO1-Spiegeln  $>25\%$ , was zu einer Immunsuppression führen könnte, stellt sich anhand unseres Kollektivs die Frage nach einem „aktiven Fenster“ von IDO1 im Rahmen von  $>10-25\%$  (auf Lymphozyten exprimiert) und einer effektiven Triggerfunktion für das

Immunsystem und körpereigene Tumor-Abwehrmechanismen. IDO1-Expression auf Tumorzellen war mit >10% am bedeutsamsten für das Gesamtüberleben.

#### **4.5 Vergleich der Marker**

Frühere Studien stellten fest, dass CD3-positive TIL in epithelialen Ovarialtumoren mit verlängertem DFS korreliert waren und die Menge an stromalen CD3-positiven TIL in PD-1-exprimierenden Tumoren höher war [90]. Karakaya et al. beschreiben außerdem signifikant kürzeres DFS und OS wenn CD8+ TIL assoziiert waren, wobei hier in der Literatur gegensätzliche Befunde beschrieben werden [88]. Bei der Studie von Karakaya et al. bleibt anzumerken, dass keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen epithelialen Histotypen gemacht wurde.

Unsere Daten unterstreichen, dass PD-L1 allein ein prognostisch günstiger Faktor ist. Zudem ist die Kombination aus hohen CD8- als auch CD3-positiven intratumoralen/intraepithelialen TIL-Werten zusammen mit hoher PD-L1-Expression (CPS max. >5) auf das Gesamtüberleben bezogen vorteilhaft. Hohe Zahlen an intraepithelialen CD3-positiven sowie CD8-positiven TIL scheinen ein additiver Faktor zu sein, der in Summe bei einer PD-L1-Expression CPS >5/ TPS >5% besonders greift.

Die Analyse des Resektionsstatus zusammen mit TIL-Werten und dem CPS-Wert zeigt überwiegend hohe Lymphozytenzahlen und CPS-Maximalwerte von  $\geq 5$  bei R0 resezierten Patientinnen, während die mittlere und untere Tertile für CD3 sowie CD8 in Kombination mit CPS-Maximalwerten  $\geq 5$  fast nicht vorhanden war. Dies weist darauf hin, dass hohe TIL-Werte, und assoziiert hohe PD-L1 Werte, tendenziell mit einer vollständigen Resektion verknüpft sich, möglicherweise wegen einer verbesserten intraoperativen Sichtbarkeit von Tumornestern oder eher lokalisierten anstatt diffusen Tumorablagerungen. Für R1/R2 resezierte Patientinnen zeigten sich besonders günstige Verläufe, wenn hohe CD8-positiv TIL-Werte und zusätzlich ein hoher PD-L1-Status zusammen kamen.

In der folgenden Analyse von IDO1- und PD-L1-Expression konnten wir zeigen, dass das gleichzeitige Auftreten von PD-L1 und IDO1 für das OS bis zu einem



IDO1-Bereich von >10-25% vorteilhaft war. Beim Überschreiten von 25% wurde das OS deutlich schlechter, selbst wenn PD-L1 unter Verwendung des CPS >5 war. Dies deutet auf eine Potenzierung der Immunogenität eines Tumors hin, wenn beide Liganden der PD-1/PD-L1- und IDO1-Achse vorhanden sind, da Liganden und Katabolite eine Anschwemmung von Lymphozyten auslösen können. Diese könnten das Tumorwachstum kontrollieren und behindern. Wenn IDO1 jedoch eine kritische Schwelle von >25% überschreitet, überwiegen die negativen Wirkungen der IDO1-Metabolite und unterdrückten die Wirkung von TIL, was zu den in anderen Studien berichteten negativen Effekten von IDO1 in Tumoren passt [69, 122-124].

In Korrelation mit epithelialen/intratumorale CD3-positiven oder CD8-positiven TIL bestätigte unsere Studie die positive Wirkung von TIL auf OS und DFS bei HGSC. Diese immunogenetische Relevanz wird durch zunehmendes TIL-Auftreten und deren Korrelation mit der IDO1-Expression unterstützt, was bedeutet, dass „hohe“ TIL-Werte (>15–20/HPF) gefunden wurden wenn IDO1 >10% auf TIL war [125, 126]. Das beste OS und DFS wurde für Patientinnen mit hoher TIL-Zahl und IDO1-Expression >10% aber <25% bei TIL gefunden. Zeigte sich eine IDO1-Expression >25%, waren die mittleren TIL-Werte sogar noch höher, aber das Outcome der Patientinnen verschlechterte sich.

Diese Erkenntnisse zur Immunmodulation tragen zu den Feststellungen zum C2-immunreaktiven Subtyp des high-grade serösen Karzinoms des weiblichen Genitaltrakts bei [127-129].

Dennoch müssen erst neuaufgelegte prospektive klinische Studien zeigen, ob PD-L1 und/oder andere Checkpoint Inhibitoren geeignete therapeutische Angriffspunkte darstellen, welche ggf. mit anderen zielgerichteten Therapien wie PARP-Inhibitoren oder Angiogenesehemmern Synergien bilden.

Zusammenfassend ergeben sich aus unserer Studie folgende Schlussfolgerungen:

PD-L1 wird in einer Untergruppe von HGSC exprimiert. Zusätzlich zu hohen CD3+ und CD8+ TIL-Spiegeln war dieser Biomarker mit einer günstigen Prognose verbunden, was einen Vorteil für das mediane Gesamtüberleben

darstellte. IDO1 hat eine vorteilhafte, potenziell immunogene Kapazität, wenn es zu 10-25% auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten exprimiert wird. Hohe Expressionslevel (>25%) von IDO1 wirken prognostisch ungünstig und möglicherweise immunosuppressiv selbst in immunologisch „heißen“ Tumoren mit hohen Lymphozytenzahlen.

Weiterführende Studien sollten standardisierte Ansätze zur TIL-Bewertung inklusive valider Cut-Offs für Biomarker beim HGSC in Bezug auf den individuellen und molekularen Subtyp erarbeiten.

## 5 Zusammenfassung

**Zielsetzung:** In aktuellen Studien zeigt sich zunehmend eine wichtige Rolle des Tumormikroenvironments in high-grade serösen Ovarialkarzinomen (HGSC). Wir untersuchten daher tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL), sowie PD-L1 und Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) als potenziell zentrale Faktoren des Tumormikroenvironments an einem großen immunhistochemisch klassifizierten Kollektiv HGSC.

**Material und Methoden:** Mittels Immunhistochemie wurden 392 zuvor immunhistochemisch klassifizierte HGSC anhand von Tissue-Micro-Arrays (TMA) untersucht. Die (Bio-)Marker CD3, CD8, PD-L1 und IDO1 wurden in separaten Färbungen untersucht. Analysiert wurde, ob sich Korrelationen zwischen Expression der Marker, Lymphozytenpopulationen und einzelnen Faktoren wie Alter, Resektionsstatus oder Tumorstadium ergeben und welche Auswirkung die Expression auf das Überleben der Patientinnen hat.

**Ergebnisse:** Innerhalb unserer Kohorte neu klassifizierter und bestätigter HGSC wurde eine PD-L1-Expression bei 28,8% der Fälle gefunden. Die PD-L1-Expression mit einem Cut-Off des Combined Positive Score (CPS) Maximalwerts bei  $>5$  zeigte ein deutlich verbessertes Überleben für Patientinnen mit CPS  $>5$  (overall survival (OS) und disease free survival (DFS); Tumor Proportion Score (TPS)  $>5\%$  zeigt einen positiven Trend ohne Signifikanz). In Kombination mit CD3-positiven und CD8-positiven intratumoralen/intraepithelialen TIL ist ein CPS max.  $>5$  ein unabhängiger günstiger prognostischer Marker, der der Lymphozytenzahl allein überlegen ist.

Auch hohe CD3-positive und CD8-positive Lymphozytenzahlen alleine sind prognostisch günstige Parameter mit den besten OS- und DFS-Verläufen für die jeweils obersten Tertile innerhalb unserer Kohorte. In Kombination mit einer hohen Anzahl an TIL hat ein CPS-Maximalwert von  $>5$  den größten Einfluss auf das Überleben.

In unserer Kohorte wurde eine IDO1-Expression auf Lymphozyten von 56,8% gefunden. Die IDO1-Expression auf TIL in einem Cut-Off-Bereich  $>10\%$  aber  $<25\%$  zeigte ein verbessertes Überleben (OS und DFS), während die IDO1-

Expression auf TIL >25% umgekehrte Effekte mit dem schlechtesten medianen OS zeigte. Darüber hinaus zeigt die IDO1-Expression auf TIL >10%, aber <25% in Kombination mit einer hohen oder zumindest mittleren Anzahl an intratumoralen/intraepithelialen CD3-positiven und CD8-positiven TIL ebenfalls die Tendenz ein günstiger prognostischer Marker zu sein. In Bezug auf PD-L1 stellen die Koexpression von IDO1 in einem Bereich von 10–25% und PD-L1 mit CPS >5 die vorteilhaftesten OS-Raten dar, was unter anderem in Korrelation mit dem Resektionsstaus und assoziierten R0-Raten auf einen synergistischen Effekt der Tumorabgrenzung für die intraoperative Resektion und ein verbessertes Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie hindeutet. In dieser Gruppe konnten wir häufiger R0-Resektionen und ein verlängertes OS nachweisen.

**Konklusion:** Zusammenfassend wird PD-L1 in einer Untergruppe von HGSC exprimiert. Zusätzlich zu hohen CD3+ und CD8+ TIL-Spiegeln ist dieser Biomarker mit einer günstigen Prognose verbunden. IDO1 hat eine vorteilhafte, potenziell immunogene Kapazität, wenn es zu <10-25% auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten exprimiert wird. Eine >25%-ige Expression von IDO1 wirkt prognostisch ungünstig und möglicherweise immunsuppressiv, selbst in immunologisch „heißen“ Tumoren.

Dies deutet auf eine wichtige Rolle beider Biomarker im Tumormicroenvironment hin und bietet ein potenzielles therapeutisches Ziel.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. 71(3): p. 209-249.
2. Buttman-Schweiger, N. and K. Kraywinkel, *Epidemiologie von Eierstockkrebs in Deutschland*. Der Onkologe, 2019. 25(2): p. 92-98.
3. Heintz, A.P., et al., *Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer*. Int J Gynaecol Obstet, 2006. 95 Suppl 1: p. S161-92.
4. Cannistra, S.A., *Cancer of the ovary*. N Engl J Med, 2004. 351(24): p. 2519-29.
5. van der Burg, M.E., *Advanced ovarian cancer*. Curr Treat Options Oncol, 2001. 2(2): p. 109-18.
6. Onkologie, L., *S3-Leitlinie Maligne Ovarialtumoren*. 2021. Version 5.
7. Kurman, R.J., L. Hedrick Ellenson, and B.M. Ronnet, *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. 6th ed. 2011: Springer Science & Business Media, LLC 2011.
8. Kurman RJ, C.M., Herrington CS, Young RH, *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. 4th ed. WHO Classification of Tumours. Vol. 6. 2014: Lyon IARC.
9. Kurman, R.J. and M. Shih le, *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. Am J Surg Pathol, 2010. 34(3): p. 433-43.
10. Leong, H.S., et al., *Efficient molecular subtype classification of high-grade serous ovarian cancer*. J Pathol, 2015. 236(3): p. 272-7.
11. Dubeau, L., *The cell of origin of ovarian epithelial tumours*. Lancet Oncol, 2008. 9(12): p. 1191-7.
12. Jarboe, E.A., et al., *Tubal and ovarian pathways to pelvic epithelial cancer: a pathological perspective*. Histopathology, 2008. 53(2): p. 127-38.
13. Piek, J.M., R.H. Verheijen, and P.J. van Diest, *Tubal and ovarian pathways to pelvic epithelial cancer: a pathological perspective*. Histopathology, 2009. 54(4): p. 494-5.
14. Crum, C.P., et al., *Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer*. Clin Med Res, 2007. 5(1): p. 35-44.
15. Kurman, R.J., L. Hedrick Ellenson, and B.M. Ronnet, *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract (6th ed)*. 6th ed. 2011: Springer Science & Business Media, LLC 2011.
16. Dey, P., *Epigenetic changes in tumor microenvironment*. Indian J Cancer, 2011. 48(4): p. 507-12.
17. Guo, L. and K. Hua, *Cervical Cancer: Emerging Immune Landscape and Treatment*. Onco Targets Ther, 2020. 13: p. 8037-8047.
18. Santoiemma, P.P. and D.J. Powell, Jr., *Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer*. Cancer Biol Ther, 2015. 16(6): p. 807-20.
19. Anderson, N.M. and M.C. Simon, *The tumor microenvironment*. Curr Biol, 2020. 30(16): p. R921-R925.
20. Jiang, X., et al., *Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape*. Mol Cancer, 2019. 18(1): p. 10.
21. Kobel, M., et al., *An Immunohistochemical Algorithm for Ovarian Carcinoma Typing*. Int J Gynecol Pathol, 2016. 35(5): p. 430-41.
22. Scharnhorst, V., A.J. van der Eb, and A.G. Jochemsen, *WT1 proteins: functions in growth and differentiation*. Gene, 2001. 273(2): p. 141-61.
23. Call, K.M., et al., *Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus*. Cell, 1990. 60(3): p. 509-20.

24. Makrigiannakis, A., et al., *Regulated expression and potential roles of p53 and Wilms' tumor suppressor gene (WT1) during follicular development in the human ovary*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. 85(1): p. 449-59.
25. Barcena, C. and E. Oliva, *WT1 expression in the female genital tract*. Adv Anat Pathol, 2011. 18(6): p. 454-65.
26. Levine, A.J. and M. Oren, *The first 30 years of p53: growing ever more complex*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(10): p. 749-58.
27. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. 88(3): p. 323-31.
28. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. 358(6381): p. 15-6.
29. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. 408(6810): p. 307-10.
30. Kandath, C., et al., *Mutational landscape and significance across 12 major cancer types*. Nature, 2013. 502(7471): p. 333-339.
31. Bouaoun, L., et al., *TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data*. Hum Mutat, 2016. 37(9): p. 865-76.
32. Cancer Genome Atlas Research, N., *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*. Nature, 2011. 474(7353): p. 609-15.
33. Kobel, M., et al., *Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma*. J Pathol Clin Res, 2016. 2(4): p. 247-258.
34. Hirano, T., et al., *Usefulness of TA02 (napsin A) to distinguish primary lung adenocarcinoma from metastatic lung adenocarcinoma*. Lung Cancer, 2003. 41(2): p. 155-62.
35. Iwamoto, M., et al., *Napsin A is frequently expressed in clear cell carcinoma of the ovary and endometrium*. Hum Pathol, 2015. 46(7): p. 957-62.
36. Yamashita, Y., et al., *Napsin A is a specific marker for ovarian clear cell adenocarcinoma*. Mod Pathol, 2015. 28(1): p. 111-7.
37. Horwitz, K.B. and P.S. Alexander, *In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation*. Endocrinology, 1983. 113(6): p. 2195-201.
38. Savouret, J.F., M. Misrahi, and E. Milgrom, *Molecular action of progesterone*. Int J Biochem, 1990. 22(6): p. 579-94.
39. Lukanova, A. and R. Kaaks, *Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. 14(1): p. 98-107.
40. Langdon, S.P., et al., *Functionality of the progesterone receptor in ovarian cancer and its regulation by estrogen*. Clin Cancer Res, 1998. 4(9): p. 2245-51.
41. Dahl, E., H. Koseki, and R. Balling, *Pax genes and organogenesis*. Bioessays, 1997. 19(9): p. 755-65.
42. Mansouri, A., M. Hallonet, and P. Gruss, *Pax genes and their roles in cell differentiation and development*. Curr Opin Cell Biol, 1996. 8(6): p. 851-7.
43. Khizer, K., et al., *Paired-Box Gene 8 (PAX8) and Its Association With Epithelial Carcinomas*. Cureus, 2021. 13(8): p. e17208.
44. Xiang, L. and B. Kong, *PAX8 is a novel marker for differentiating between various types of tumor, particularly ovarian epithelial carcinomas*. Oncol Lett, 2013. 5(3): p. 735-738.
45. Tomsova, M., et al., *Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol, 2008. 108(2): p. 415-20.
46. Farrag, M.S., et al., *Programmed death ligand-1 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as prognostic predictors in ovarian high-grade serous carcinoma (HGSC)*. J Egypt Natl Canc Inst, 2021. 33(1): p. 16.

47. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. *Nat Med*, 1999. 5(12): p. 1365-9.
48. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26: p. 677-704.
49. Okazaki, T., et al., *A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application*. *Nat Immunol*, 2013. 14(12): p. 1212-8.
50. Sunshine, J. and J.M. Taube, *PD-1/PD-L1 inhibitors*. *Curr Opin Pharmacol*, 2015. 23: p. 32-8.
51. Kim, K.H., et al., *PD-L1 expression on stromal tumor-infiltrating lymphocytes is a favorable prognostic factor in ovarian serous carcinoma*. *J Ovarian Res*, 2019. 12(1): p. 56.
52. Bas, Y., et al., *Clinical and pathological significance of programmed cell death 1 (PD-1)/programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression in high grade serous ovarian cancer*. *Transl Oncol*, 2021. 14(2): p. 100994.
53. Parvathareddy, S.K., et al., *Differential expression of PD-L1 between primary and metastatic epithelial ovarian cancer and its clinico-pathological correlation*. *Sci Rep*, 2021. 11(1): p. 3750.
54. Munn, D.H. and A.L. Mellor, *IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance*. *Trends Immunol*, 2016. 37(3): p. 193-207.
55. Uyttenhove, C., et al., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. *Nat Med*, 2003. 9(10): p. 1269-74.
56. Shimizu, T., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties*. *J Biol Chem*, 1978. 253(13): p. 4700-6.
57. Berthon, C., et al., *Metabolites of tryptophan catabolism are elevated in sera of patients with myelodysplastic syndromes and inhibit hematopoietic progenitor amplification*. *Leuk Res*, 2013. 37(5): p. 573-9.
58. Munn, D.H., et al., *GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase*. *Immunity*, 2005. 22(5): p. 633-42.
59. Stevens, E.A., J.D. Mezrich, and C.A. Bradfield, *The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system*. *Immunology*, 2009. 127(3): p. 299-311.
60. Nguyen, N.T., et al., *Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(46): p. 19961-6.
61. Mezrich, J.D., et al., *An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells*. *J Immunol*, 2010. 185(6): p. 3190-8.
62. Yoshida, R. and O. Hayaishi, *Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. 75(8): p. 3998-4000.
63. Yoshida, R., et al., *Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(8): p. 4084-6.
64. Pfefferkorn, E.R., *Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(3): p. 908-12.
65. Brochez, L., I. Chevolet, and V. Kruse, *The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy*. *Eur J Cancer*, 2017. 76: p. 167-182.
66. Meireson, A., M. Devos, and L. Brochez, *IDO Expression in Cancer: Different Compartment, Different Functionality?* *Front Immunol*, 2020. 11: p. 531491.

67. Inaba, T., et al., *Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2009. 115(2): p. 185-92.
68. Mills, A.M., et al., *Targetable Immune Regulatory Molecule Expression in High-Grade Serous Ovarian Carcinomas in African American Women: A Study of PD-L1 and IDO in 112 Cases From the African American Cancer Epidemiology Study (AACES)*. *Int J Gynecol Pathol*, 2019. 38(2): p. 157-170.
69. Okamoto, A., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells*. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(16): p. 6030-9.
70. Tanizaki, Y., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer by inducing an immunosuppressive environment*. *Cancer Sci*, 2014. 105(8): p. 966-73.
71. Ma, H., et al., *1-MT inhibits the invasion of CBP-resistant ovarian cancer cells via down-regulating IDO expression and re-activating immune cells function*. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2020. 21(1): p. 67.
72. Erdag, G., et al., *Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma*. *Cancer Res*, 2012. 72(5): p. 1070-80.
73. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. *Science*, 2006. 313(5795): p. 1960-4.
74. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. *N Engl J Med*, 2003. 348(3): p. 203-13.
75. Stumpf, M., et al., *Intraepithelial CD8-positive T lymphocytes predict survival for patients with serous stage III ovarian carcinomas: relevance of clonal selection of T lymphocytes*. *Br J Cancer*, 2009. 101(9): p. 1513-21.
76. Schildberg, F.A., et al., *Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family*. *Immunity*, 2016. 44(5): p. 955-72.
77. Zhang, N. and M.J. Bevan, *CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system*. *Immunity*, 2011. 35(2): p. 161-8.
78. Wang, Q., et al., *Prognostic value of tumor PD-L1 expression combined with CD8(+) tumor infiltrating lymphocytes in high grade serous ovarian cancer*. *Int Immunopharmacol*, 2017. 52: p. 7-14.
79. Darb-Esfahani, S., et al., *Morphology and tumour-infiltrating lymphocytes in high-stage, high-grade serous ovarian carcinoma correlated with long-term survival*. *Histopathology*, 2018. 73(6): p. 1002-1012.
80. Taube, J.M., et al., *Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape*. *Sci Transl Med*, 2012. 4(127): p. 127ra37.
81. Ritprajak, P. and M. Azuma, *Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma*. *Oral Oncol*, 2015. 51(3): p. 221-8.
82. Patel, S.P. and R. Kurzrock, *PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy*. *Mol Cancer Ther*, 2015. 14(4): p. 847-56.
83. Savic, S., et al., *PD-L1 testing of non-small cell lung cancer using different antibodies and platforms: a Swiss cross-validation study*. *Virchows Arch*, 2019. 475(1): p. 67-76.
84. Ratcliffe, M.J., et al., *Agreement between Programmed Cell Death Ligand-1 Diagnostic Assays across Multiple Protein Expression Cutoffs in Non-Small Cell Lung Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2017. 23(14): p. 3585-3591.
85. Adam, J., et al., *Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer*. *Ann Oncol*, 2018. 29(4): p. 953-958.



86. Ribbat-Idel, J., et al., *Performance of Different Diagnostic PD-L1 Clones in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. *Front Med (Lausanne)*, 2021. 8: p. 640515.
87. Gradecki, S.E., J.S. Grange, and E.B. Stelow, *Concordance of PD-L1 Expression Between Core Biopsy and Resection Specimens of Non-Small Cell Lung Cancer*. *Am J Surg Pathol*, 2018. 42(8): p. 1090-1094.
88. Sato, E., et al., *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(51): p. 18538-43.
89. Martin de la Fuente, L., et al., *PD-1/PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes are prognostically favorable in advanced high-grade serous ovarian carcinoma*. *Virchows Arch*, 2020.
90. Arman Karakaya, Y., et al., *The relation of CD3, CD4, CD8 and PD-1 expression with tumor type and prognosis in epithelial ovarian cancers*. *Ginekol Pol*, 2021. 92(5): p. 344-351.
91. Wieser, V., et al., *BRCA1/2 and TP53 mutation status associates with PD-1 and PD-L1 expression in ovarian cancer*. *Oncotarget*, 2018. 9(25): p. 17501-17511.
92. Wang, L., *Prognostic effect of programmed death-ligand 1 (PD-L1) in ovarian cancer: a systematic review, meta-analysis and bioinformatics study*. *J Ovarian Res*, 2019. 12(1): p. 37.
93. Robert, C., *A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy*. *Nat Commun*, 2020. 11(1): p. 3801.
94. Robert, C., et al., *Durable Complete Response After Discontinuation of Pembrolizumab in Patients With Metastatic Melanoma*. *J Clin Oncol*, 2018. 36(17): p. 1668-1674.
95. Postow, M.A., M.K. Callahan, and J.D. Wolchok, *Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy*. *J Clin Oncol*, 2015. 33(17): p. 1974-82.
96. Anceviski Hunter, K., M.A. Socinski, and L.C. Villaruz, *PD-L1 Testing in Guiding Patient Selection for PD-1/PD-L1 Inhibitor Therapy in Lung Cancer*. *Mol Diagn Ther*, 2018. 22(1): p. 1-10.
97. Brahmer, J., et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. 373(2): p. 123-35.
98. Mandala, M., B. Merelli, and D. Massi, *PD-L1 in melanoma: facts and myths*. *Melanoma Manag*, 2016. 3(3): p. 187-194.
99. Schmid, P., et al., *Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2018. 379(22): p. 2108-2121.
100. Wei, S.C., C.R. Duffy, and J.P. Allison, *Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy*. *Cancer Discov*, 2018. 8(9): p. 1069-1086.
101. Liu, J., et al., *PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy*. *Front Pharmacol*, 2021. 12: p. 731798.
102. Borella, F., et al., *Immune Checkpoint Inhibitors in Epithelial Ovarian Cancer: An Overview on Efficacy and Future Perspectives*. *Diagnostics (Basel)*, 2020. 10(3).
103. Ledermann, J., et al., *Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer*. *N Engl J Med*, 2012. 366(15): p. 1382-92.
104. Ledermann, J., et al., *Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial*. *Lancet Oncol*, 2014. 15(8): p. 852-61.
105. Ledermann, J.A., et al., *Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer (SOC) and a BRCA mutation (BRCAm)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2013. 31(15\_suppl): p. 5505-5505.
106. Mirza, M.R., et al., *Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer*. *N Engl J Med*, 2016. 375(22): p. 2154-2164.

107. Mirza, M.R., et al., *A randomized, double-blind phase 3 trial of maintenance therapy with niraparib vs placebo in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer (ENGOT-OV16/NOVA trial)*. *Annals of Oncology*, 2016. 27.
108. Pujade-Lauraine, E., et al., *Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial*. *The Lancet Oncology*, 2017. 18(9): p. 1274-1284.
109. Matulonis, U.A., et al., *Phase II study of pembrolizumab (pembro) combined with pegylated liposomal doxorubicin (PLD) for recurrent platinum-resistant ovarian, fallopian tube or peritoneal cancer*. *Gynecologic Oncology*, 2018. 149: p. 24.
110. Matulonis, U.A., et al., *Final results from the KEYNOTE-100 trial of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2020. 38(15\_suppl): p. 6005-6005.
111. Martins, F., et al., *Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019. 16(9): p. 563-580.
112. Le, D.T., et al., *Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade*. *Science*, 2017. 357(6349): p. 409-413.
113. Cristescu, R., et al., *Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy*. *Science*, 2018. 362(6411).
114. Yamashita, H., et al., *Relationship between Microsatellite Instability, Immune Cells Infiltration, and Expression of Immune Checkpoint Molecules in Ovarian Carcinoma: Immunotherapeutic Strategies for the Future*. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(20).
115. Le, D.T., et al., *PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency*. *N Engl J Med*, 2015. 372(26): p. 2509-20.
116. Cha, J.H., et al., *Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer*. *Mol Cell*, 2019. 76(3): p. 359-370.
117. Sun, J., et al., *Immuno-genomic characterisation of high-grade serous ovarian cancer reveals immune evasion mechanisms and identifies an immunological subtype with a favourable prognosis and improved therapeutic efficacy*. *Br J Cancer*, 2022. 126(11): p. 1570-1580.
118. Westergaard, M.C.W., et al., *Tumour-reactive T cell subsets in the microenvironment of ovarian cancer*. *Br J Cancer*, 2019. 120(4): p. 424-434.
119. Westergaard, M.C.W., et al., *Changes in the Tumor Immune Microenvironment during Disease Progression in Patients with Ovarian Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2020. 12(12).
120. Kassuhn, W., et al., *Classification of Molecular Subtypes of High-Grade Serous Ovarian Cancer by MALDI-Imaging*. *Cancers (Basel)*, 2021. 13(7).
121. Amobi-McCloud, A., et al., *IDO1 Expression in Ovarian Cancer Induces PD-1 in T Cells via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation*. *Front Immunol*, 2021. 12: p. 678999.
122. Liu, H., et al., *Increased expression of IDO associates with poor postoperative clinical outcome of patients with gastric adenocarcinoma*. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 21319.
123. Ye, J., et al., *Tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts poor outcome in laryngeal squamous cell carcinoma*. *Virchows Arch*, 2013. 462(1): p. 73-81.
124. Takao, M., et al., *Increased synthesis of indoleamine-2,3-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer*. *Oncol Rep*, 2007. 17(6): p. 1333-9.
125. Hwang, W.T., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis*. *Gynecol Oncol*, 2012. 124(2): p. 192-8.

126. Ovarian Tumor Tissue Analysis, C., et al., *Dose-Response Association of CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Survival Time in High-Grade Serous Ovarian Cancer*. JAMA Oncol, 2017. 3(12): p. e173290.
127. Leary, A., D. Tan, and J. Ledermann, *Immune checkpoint inhibitors in ovarian cancer: where do we stand?* Ther Adv Med Oncol, 2021. 13: p. 17588359211039899.
128. Hudry, D., et al., *Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Epithelial Ovarian Cancer: Heterogeneity, Prognostic Impact, and Relationship with Immune Checkpoints*. Cancers (Basel), 2022. 14(21).
129. Liu, P., et al., *Combined PD-1/PD-L1 and tumor-infiltrating immune cells redefined a unique molecular subtype of high-grade serous ovarian carcinoma*. BMC Genomics, 2022. 23(1): p. 51.

## 7 Anhang

### 1. TNM- und FIGO-Klassifikation der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms

TNM	FIGO	Definition
<b>TX</b>		Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
<b>T0</b>		Kein Anhalt für einen Tumor
<b>T1</b>	<b>I</b>	Tumor auf die Ovarien oder Tuben beschränkt
<b>T1a</b>	<b>IA</b>	auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
<b>T1b</b>	<b>IB</b>	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
<b>T1c</b>	<b>IC</b>	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte:
<b>T1c1</b>	<b>IC1</b>	iatrogene Kapsel- (Serosa-)ruptur
<b>T1c2</b>	<b>IC2</b>	präoperative Kapsel- (Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
<b>T1c3</b>	<b>IC3</b>	maligne Zellen im Ascites oder in der Spülzytologie nachweisbar
<b>T2</b>	<b>II</b>	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
<b>T2a</b>	<b>IIA</b>	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
<b>T2b</b>	<b>IIB</b>	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
<b>T3 und/oder N1</b>	<b>III</b>	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb

		des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
<b>T3</b>		Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
<b>N1a</b>	<b>IIIA1i</b>	Metastasen ≤ 10 mm
<b>N1b</b>	<b>IIIA1ii</b>	Metastasen > 10 mm
<b>T3a jedes N</b>	<b>IIIA2</b>	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
<b>T3b jedes N</b>	<b>IIIB</b>	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
<b>T3c jedes N</b>	<b>IIIC</b>	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
<b>M1</b>	<b>IV</b>	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
<b>M1a</b>	<b>IVA</b>	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
<b>M1b</b>	<b>IVB</b>	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

## **8 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. A. Staebler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. A. Fischer.

Die Erstellung der bereits bestehenden Kollektive auf die im Rahmen dieser Arbeit zum Teil zurück gegriffen wurden von Frau Dr. D. Pham, Frau Dr. A. Fischer und Frau Dr. B. Ney durchgeführt.

Sämtliche Auswertungen und Analysen wurden durch mich mithilfe von Frau Prof. Dr. A. Staebler und Frau Dr. A. Fischer durchgeführt.

Frau C. Beschorner fertigte die TMAs an und war für die Dokumentation deren Zusammenstellung verantwortlich.

Frau K. Greif war für die Etablierung und die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen verantwortlich.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich und durch Frau Prof. A. Staebler.

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

Tübingen, den 17.02.2023

## **9 Danksagung**

Zuerst möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Anna Fischer und meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Annette Staebler danken, die diese Doktorarbeit ermöglicht haben und mich jederzeit unterstützt und gefördert haben.

Ein besonderer Danke geht an Karen Greif und Christine Beschorner für die beharrlicher Hilfe bei allen labortechnischen Unterfangen und das mit Rat-und-Tat-zur-Seite-Stehen.

Der größte Dank gebührt meinem Ehemann, der mich unendlich unterstützt, zeitlich freigesetzt, motiviert und ermutigt hat. Diese Arbeit wäre nicht so verlaufen, wenn es Dich nicht gäbe.