

Aus dem Pathologischen Institut der
Ludwig- Maximilians- Universität München
Direktor: Professor Dr. Thomas Kirchner

**CCL22, CD8 und FoxP3 als prognostische Marker beim
fortgeschrittenen Ovarialkarzinom-
Umfassende retrospektive Analyse mit Hilfe der
Immunhistochemie**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Cecilia J.L. Hermans

aus Köln

2013

Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr.med. Doris Mayr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Stemmler
Priv. Doz. Dr. Miriam Lenhard

Mitbetreuung durch den promovierten
und habilitierten Mitarbeiter

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Einleitung	4
1 Epidemiologie der Tumoren des Ovars.....	4
2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	5
3 Histologie.....	7
3.1 <i>Grading</i>	11
3.2 <i>Staging</i>	12
4 Klinik.....	14
4.1 <i>Symptome</i>	14
4.2 <i>Screening und Diagnostik</i>	14
5 Prognosefaktoren und Therapie.....	15
6 Einführung Tumorimmunologie.....	17
6.1 <i>Treg-Zellen, Zytotoxische T-Zellen und Tumorescape</i>	19
6.2 <i>CCL22</i>	19
Zielsetzung und Fragestellungen	21
Material und Methoden	22
1 Materialien.....	22
1.1 <i>Geräte</i>	28
1.2 <i>Verbrauchsmaterial</i>	28
1.3 <i>Chemikalien</i>	29
1.4 <i>Detektionssysteme</i>	30
1.5 <i>Primärantikörper</i>	30
1.6 <i>Färbemittel</i>	31
2 Methoden.....	32
2.1 <i>Prinzip Immunhistochemie</i>	32
2.2 <i>Versuchsprotokoll Doppelfärbung CCL22/FoxP3</i>	35
2.3 <i>Versuchsprotokoll Einzelfärbung CD8</i>	39
2.4 <i>Auswertung</i>	41
2.5 <i>Sonstiges</i>	45

2.6	<i>Statistische Auswertung</i>	46
	Ergebnisse	47
1	Deskriptive Statistik.....	47
1.1	<i>Anzahl der Zellen</i>	47
1.2	<i>Verteilungsmuster der Zellen</i>	51
1.3	<i>Tumorinfiltration der Zellen</i>	55
2	Korrelationen CD8+/FoxP3+/CCL22+ Parameter.....	59
2.1	<i>CD8+ Zellen</i>	59
2.2	<i>FoxP3+ Zellen</i>	60
2.3	<i>CCL22+ Zellen</i>	61
2.4	<i>Korrelation der FoxP3+ Zelle, CD8+T-Zellen und CCL22 Zellen mit Überlebenszeit Tumorgrading und histologischem Subtyp</i>	65
2.5	<i>Korrelationsverhalten anderer gängiger Prognosevariablen</i>	69
3	Überlebenszeitanalyse: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell.....	71
3.1	<i>Adjustierung nach Alter</i>	71
3.2	<i>Adjustierung nach Grading</i>	73
3.3	<i>Adjustierung für den Faktor OP- Radikalität</i>	74
4	Überlebenszeitanalyse mittels Kaplan- Meier- Kurven und Logrank Test.....	76
4.1	<i>CD8+ Zellen</i>	76
4.2	<i>FoxP3+ Zellen</i>	78
4.3	<i>CCL22+Zellen</i>	80
5	Expression von FoxP3 und CCL22 auf Tumorzellen.....	82
	Diskussion	83
1	CD8+, FoxP3+, CCL22+ Zell Anzahl, Lage und Tumorinfiltration.....	85
2	CD8+, FoxP3+ und CCL22+ Zellen und gängige Prognosefaktoren.....	87
3	Prognosefaktoren mit Einfluss auf das Überleben.....	88
4	CD8+, FoxP3+ CCL22+ Zellen und deren Einfluss auf das Überleben.....	89
4.1	<i>Anzahl der Zellen</i>	89
4.2	<i>Verteilungsmuster der Zellen</i>	89
4.3	<i>Infiltration der Zellen ins Tumorgewebe</i>	91
5	Expression von CCL22 und FoxP3 durch das Tumorgewebe.....	93

6	Ausblick - Entwicklung einer Tumor- Immunotherapie.....	96
6.1	<i>CTLA4 Blockade</i>	96
6.2	<i>B7-H1 Rezeptor Blockade</i>	96
6.3	<i>CD4+ Stimulation</i>	97
6.4	<i>VEGF Rezeptor Blockade</i>	97
6.5	<i>INF- Gamma</i>	98
6.6	<i>Anti- CD4+ Antikörper/ Eliminationstherapie mit Denileukin difitox (ONTAK)</i>	98
6.7	<i>TNF- Beta und IL-10 Blockade</i>	98
6.8	<i>Anti CCR4 Antikörper</i>	99
6.9	<i>CCL22 „knock-down“</i>	99
	Zusammenfassung	101
	Anhang	104
1	Einführung in die T-Zell Entwicklung.....	104
2	Funktionsmechanismen der Treg -Zellen.....	108
3	Funktionsmechanismen der CD8+ T-Zellen	110
4	Schematische Darstellung der intrazellulären Kommunikation im Tumor: Migration, Aktivierung, Blockade.....	111
5	Schematische Darstellung der einzelnen Zellfunktionen.....	114
	Literaturverzeichnis	117
	Nachwort	126
	Danksagung	132
	Eidesstattliche Versicherung	133

Einleitung

1 Epidemiologie der Tumoren des Ovars

Die World Health Organization (WHO) veröffentlichte zuletzt im Jahr 2008 eine Statistik, der zu Folge weltweit jährlich ca. 200.000 Frauen an Tumoren des Ovars erkranken. Demnach sind 30% aller Neoplasien der weiblichen Genitalorgane am Ovar lokalisiert. In Nordamerika sterben heute mehr Frauen an den Folgen des Ovarialkarzinoms als an allen anderen Neoplasien des Beckens zusammen [1]. Es ist die am häufigsten tödlich verlaufende Tumorerkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane. Laut Schätzungen des Robert-Koch-Instituts wurden in Deutschland, allein im Jahr 2006, 9.670 Neuerkrankungen verzeichnet. Damit steht das Ovarialkarzinom mittlerweile, mit 4,9%, an fünfter Stelle der Inzidenzen aller bösartiger Neubildungen der Frauen, nach Brust-, Darm-, Lungen- und Gebärmutterkörperkrebs [2]. Seit Mitte der 1980er- Jahre bis Ende der 1990er- Jahre hat die Inzidenz des Ovarialkarzinoms kontinuierlich zugenommen und anschließend wieder leicht abgenommen, sodass sich insgesamt ein Anstieg der Inzidenzraten um 10% ergibt. Bemerkenswert ist hierbei die Divergenz zwischen den regionalen Inzidenzen. So erkranken in Südostasien und Afrika nur etwa 2 von 100.000 Frauen an malignen Ovarialtumoren, wohingegen es in Nord- und Osteuropa 15 von 100.000 sind [3]. Obwohl sich die Überlebensaussichten für Patientinnen in den vergangenen Jahren deutlich verbessert haben, verstarben allein in Deutschland im Jahr 2006 5.636 Frauen an dieser Erkrankung, was 5,7% aller Krebssterbefälle der Frauen in Deutschland entspricht. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate schwankt, unterschiedlichen Krebsregistern nach, zwischen 35% und 49% und ist, US-Amerikanischen Berechnungen zu Folge, stark altersabhängig [2]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Inzidenz und Mortalität gemäß den Schätzungen des Robert-Koch-Instituts für das Jahr 2006.

Tabelle 1: Übersicht Epidemiologie des Ovarialkarzinoms

	Frauen
Erkrankungsfälle 2006	9670
Projektion für 2010	9960
Rohe Neuerkrankungsrate je 100.000	23
Standard. Neuerkrankungsrate je 100.000	15,8

	Frauen
Sterbefälle 2006	5636
Standard. Sterberate (Europa) je 100.000	8
Standard. Sterberate (Weltweit) je 100.000	5,3

Die, im Vergleich zu anderen Krebskrankheiten der Geschlechtsorgane, schlechten Überlebenschancen, lassen sich vornehmlich durch das Fehlen von zuverlässigen Screeningverfahren, sowie eine im Verlauf spät einsetzenden und uncharakteristische klinische Symptomatik erklären [4-5]. Über 70% der Neuerkrankungen werden im FIGO Stadium III und IV diagnostiziert, in dem der Tumor bereits in regionäre Lymphknoten, in die Bauchhöhle, oder darüber hinaus metastasiert ist und meist nur noch palliativ behandelt werden kann. Bei den verbleibenden 30% Patientinnen, bei denen die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung noch auf das kleine Becken begrenzt ist, entsprechend dem FIGO Stadium I oder II, bestehen hingegen 5-Jahres-Überlebenschancen von 65-90% [6].

2 Ätiologie und Risikofaktoren

Bei 10% der Erkrankten lässt sich die Entwicklung des Ovarialkarzinoms auf eine bestimmte genetische Mutation zurückverfolgen [7]. Charakteristischer Weise kommt es bei dieser Form des „hereditären Ovarialkarzinoms“ bereits im frühen Lebensalter zu einem gehäuftem Auftreten von Ovarial-, Mamma-, Kolon- und Zervixkarzinomen, seltener auch zu einer Anhäufung anderer Tumorarten [4]. Mutationen der Gene HNPCC, BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, TP53 sind ursächlich an der Entstehung beteiligt [2] [7] [4]. Die Wahrscheinlichkeit an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, ist bei einer nachgewiesenen Keimbahnmutation dieser Gene um bis zu 50-fach erhöht. Das Risiko einer betroffenen Patientin, im Laufe ihres Lebens ein Ovarialkarzinom zu entwickeln, beträgt demnach 45-60%, je nach Penetranzschätzungen und abhängig von dem betroffenen Gen [4-5].

Bei den verbleibenden 90% der Patientinnen ist die Ätiologie des Ovarialkarzinoms jedoch noch Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Anerkannte Risikofaktoren zur Entwicklung eines nicht- hereditären Ovarialkarzinoms sind eine früh einsetzende Menarche und eine spät einsetzende

Menopause, Kinderlosigkeit, fehlende Stillzeit, sowie Östrogen Hormonersatz [2] [8] [9]. Es gibt darüber hinaus Hinweise auf einen Zusammenhang von Adipositas, Ernährung und anderen „Lifestyle“ Faktoren, mit der Entwicklung eines malignen Ovarialtumors [3, 10]. Dahingegen wirken ovulationshemmende Faktoren, wie die Einnahme oraler Kontrazeptiva, Schwangerschaft und Stillzeit protektiv der Tumorentstehung entgegen [3, 11]. Diesen Überlegungen zu Grunde liegt die Ovulationstheorie der Entstehung von Ovarialtumoren. Dieser Theorie zu Folge entsteht im Zuge der Ovulation eine Schädigung des Oberflächenepithels, welches sich daraufhin regenerieren muss. Die Wahrscheinlichkeit einer auftretenden Mutation und potentieller Transformation des Gewebes in ein malignes Karzinom wächst mit der Häufigkeit der Ovulationen, die eine Frau im Laufe ihres Lebens vollzieht, an. Darüber hinaus wird auch auf den negativen Einfluss von Gonadotropin auf die Proliferation des ovariellen Oberflächenepithels hingewiesen [12]. Mutmaßlich spielen, bei der Entstehung eines Ovarialkarzinoms, all diese Faktoren auf unterschiedliche Weise eine Rolle. Bislang konnte jedoch, für die Gruppe der 90% sporadisch auftretenden malignen Tumoren des Ovars, noch kein universal etabliertes Tumorgenese-Modell aufgestellt werden. In Anlehnung an das weitgehend erforschte Tumorgenese-Modell des Endometriumkarzinoms, wird auch für die große Gruppe der epithelial-stromalen Oberflächentumore ein dualistisches Tumorprogressionsmodell angenommen. Hierin entwickeln sich „low-grade“ Neoplasien stufenweise aus Borderlinetumoren, durch jahrzehntelange, progrediente Anhäufung von Mutationen entlang des KRAS, BRAF Pathways, des β -Catenins, PTEN, sowie durch Mikrosatelliten Instabilität. Die „low-grade“ Neoplasien sind nicht mit Keimbahnmutationen der BRCA 1&2 Gene assoziiert und zeigen keinerlei komplexe genetischen Abnormitäten auf. „High-grade“ Karzinome hingegen entstehen rasant de novo, metastasieren unkontrolliert und sind häufig mit P53, BRCA1&2 Mutationen, sowie genetischer Heterogenität innerhalb des Tumors assoziiert [13-16]. Um die genauen genetischen Mechanismen der Tumorgenese vollständig verstehen zu können und schlussendlich mit diesem Wissen in Zukunft auch beim Ovarialkarzinom mit gezielteren Therapien vorgehen zu können, bedarf es jedoch noch weiterer Forschung.

3 Histologie

Die überwiegende Anzahl der Tumoren am Ovar, lassen sich, ihrem embryologischen Ursprung entsprechend, in drei große Klassen einteilen. Annähernd 90% aller Ovarialkarzinome gehören histologisch zur Gruppe der epithelial-stromalen Oberflächentumoren. Alle hierunter klassifizierten Tumoren stammen embryologisch vom Mesothel ab, welches sich zum Oberflächenepithel weiterentwickelt. Entsprechend der Häufigkeit ihres Auftretens aufgelistet, setzt sich diese Gruppe zusammen aus: dem high-Grade und low-Grade Serösen Karzinom, dem Klarzelltumor, dem Endometrioiden Karzinom, dem Muzinösen Karzinom, dem Transitionalzell Karzinom, dem Squamösen Karzinom, sowie den undifferenzierten nicht klassifizierbaren Karzinomen [17]. Die zweitgrößte Klasse rekrutiert sich, mit 5-8% der Fälle, durch die Keimstrangstromatumoren. Ursprungszellen sind hier die Keimstrangzellen, Granulosazellen und Sertolizellen, und/oder das sexuell determinierte Mesenchym des Ovars, die Thekazellen, Leydigzellen und Hiluszellen. Die dritte und letzte Klasse rekrutiert sich aus 3-5% Keimstrangzelltumoren. Die restlichen Tumoren, welche keiner der drei Klassen angehören, kommen nur extrem selten vor. Es handelt sich hierbei um Tumoren des Rete Ovarii, den Keimzell-Keimstrangstromatumoren, Mesotheliomen, Gonadoblastomen und Tumoren unsicherer histologischer Genese [5, 18] [3].

Innerhalb der einzelnen Gruppe, wird des weiteren zwischen benignen, borderline, und malignen Untergruppen differenziert. Benigne Tumoren zeigen keinerlei invasives Wachstum und mäßige Proliferationsraten, wohingegen Borderline Tumoren zwar ebenfalls kein invasives Verhalten aufzeigen, jedoch atypisch proliferieren. Maligne Tumoren schließlich weisen sowohl invasives Wachstum, als auch atypisch proliferatives Wachstum auf [17] .

Die präzise Einteilung der Ovarialkarzinome in distinguierte histologische Subklassen ist aus dem Grund von entscheidender Bedeutung, da diese Subklassen sich hinsichtlich der Risikofaktoren, dem genetischem Risiko, der Metastasierung, der Onkogenese, dem Ansprechen auf Chemotherapie und letztlich der Prognose deutlich von einander unterscheiden [16] .

Da in dem Patientinnenkollektiv, welches im Rahmen dieser Dissertation behandelt wird, ausschließlich Patientinnen mit Ovarialkarzinomen vom epithelial-stromalen Oberflächentyp eingeschlossen wurden, folgt die Auflistung der histologischen Klassifikation ausschließlich dieses Subtyps:

Histologische Klassifikation gemäß der WHO [3]:

1. Seröse Tumoren

1.1. Benigne

- a) Zystadenom
- b) Papilläres Zystadenom
- c) Oberflächenpapillom
- d) Adenofibrom und Zystadenofibrom

1.2. Borderlinetumoren

- a) Zystischer Tumor und papillär-zystischer Tumor
- b) Oberflächlich-papillärer Tumor
- c) Adenofibrom und Zystadenofibrom

1.3. Maligne

- a) Adenokarzinom: Papilläres Adenokarzinom und Papilläres Zystadenokarzinom
- b) Oberflächlich-papilläres Adenokarzinom
- c) Adenokarzinofibrom und Zystadenokarzinofibrom

2. Muzinöse Tumoren

2.1. Benigne

- a) Zystadenom
- b) Adenofibrom und Zystadenofibrom

2.2. Borderlinetumoren

- a) Intestinaler Typ
- b) Endozervikaler Typ

2.3. Maligne

- a) Adenokarzinom und Zystadenokarzinom
- b) Adenokarzinofibrom und Zystadenokarzinofibrom

2.4. Muzinös zystischer Tumor mit Wandknoten

2.5. Muzinös zystischer Tumor mit Pseudomyxoma peritonei

3. Endometroide Tumoren mit squamös differenzierten Varianten

3.1. Benigne

- a) Zystadenom

b) Adenofibrom und Zystadenofibrom

3.2. Borderlinetumoren

a) Zystischer Tumor

b) Zystischer Tumor mit plattenepithelialer Differenzierung

c) Adenofibrom und Zystadenofibrom

d) Adenofibrom und Zystadenofibrom mit plattenepithelialer Differenzierung

3.3. Maligne

a) Adenokarzinom und Zystadenokarzinom, ohne anderweitige Spezifizierung

b) Adenokarzinom und Zystadenokarzinom mit plattenepithelialer Differenzierung

c) Adenokarzinofibrom und Zystadenokarzinofibrom

d) Maligner Müllerscher Misch tumor

e) Adenosarkom

f) Endometrioides Stromasarkom

g) Undifferenziertes Ovarialsarkom

4. Klarzelltumoren

4.1. Benigne

a) Zystadenom

b) Adenofibrom und Zystadenofibrom

4.2. Borderlinetumoren

a) Zystischer Tumor

b) Adenofibrom und Zystadenofibrom

4.3. Maligne

a) Adenokarzinom

b) Adenokarzinofibrom und Zystadenokarzinofibrom

5. Transitional- Zelltumoren

5.1. Benigne

a) Brenner-Tumor

b) metaplastische Variante

5.2. Borderlinetumoren

a) Borderline Brenner- Tumor

b) proliferierende Variante

5.3. Maligne

a) Transitional-Zellkarzinom

b) Maligner Brenner-Tumor

6. Squamöse Tumoren

6.1. Squamöses Karzinom

6.2. Epidermoidzyste

7. Epitheliale Mischtumoren

7.1. Benigne

7.2. Borderlinetumoren

7.3. Maligne

8. Undifferenzierte und unklassifizierte Tumoren

8.1. Undifferenziertes Karzinom

8.2. Anderweitig nicht spezifiziertes Adenokarzinom

3.1 Grading

Das 1998 von Silverberg [19-20] vorgestellte Gradingssystem, zur Beurteilung der Differenzierung von Zellen, entspricht dem von der WHO empfohlenen Standard [18] und wurde im Rahmen dieser Dissertation angewandt. Hierbei werden Zellen, unabhängig vom Gewebetyp, hinsichtlich der Parameter Architektur, Kernpleomorphologie und Mitosezahl pro Gesichtsfeld analysiert und anschließend ein Gesamtscore errechnet. Das wichtigste Kriterium der Gradeinteilung ist der relative Anteil tubulärer oder papillärer Areale des Tumors, da gut differenzierte Karzinome ausschließlich aus tubulären oder papillären Strukturen, wenig differenzierte Karzinome hingegen überwiegend oder ausschließlich aus soliden Strukturen bestehen [6]. Tabelle 2 gibt einen Überblick über das Gradingssystem nach Silverberg:

Tabelle 2: Gradingssystem nach Silverberg

Punktwert	1	2	3
Architektur	Glandulär	Papillär	Solide
Kernpleomorphologie	Relativ uniforme vesikuläre Kerne; Kerngrößenvarianten <2:1; keine prominenten Nukleolen	Kerngrößenvariationen zwischen 2:1 und 4:1; kleine Nukleolen; keine bizarren Kerne	Kerngrößenvariation 4:1; große eosinophile Nukleolen; evtl. bizarre Kerne
Mitosezahlen			
Sehfeldzahl 20	0-7	8-18	>19
Sehfeldzahl 26	8-18	10-24	>25

G1: Gut differenziert	3-5 Punkte
G 2: Mäßig differenziert	6-7 Punkte
G3-4: Schlecht differenziert	8-9 Punkte
GX : Nicht beurteilbar	-
GB: Borderline- Malignität	-

Nach wie vor gibt es für das Grading beim Ovarialkarzinom kein universal anerkanntes System. Neben dem hier angewandten Silverberg Grading System, werden zusätzlich die Grading Systeme der FIGO und GOG verwendet. Es zeigte sich in Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Systeme unter einander, dass die fehlende Standardisierung und die daraus resultierende Verwendung mehrerer Grading Systeme dazu führt, dass die Klassifikation eines Tumors, je nach appliziertem System, teilweise erheblich divergiert. So betrug die Konkordanzrate in einer prospektiven randomisierten Phase III Studie an 334 Präparaten zwischen dem System nach Silverberg und dem GOG- System lediglich 66,8%, zwischen Silverberg und FIGO-System nur 69,9% [21]. Diese Zahlen verdeutlicht eindrücklich, wie dringend eine Standardisierung nötig ist. Auf Grund der Heterogenität der unterschiedlichen malignen Tumoren des Ovars wird kontinuierlich auch ein Histotyp-spezifisches System diskutiert [22]. Fraglich ist nur in wieweit es praktikabel und klinisch möglich ist, ein solches zu implementieren. Wie in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte, erfüllt das in dieser Arbeit angewandte Silverberg System die Anforderungen an prognostische Aussagekraft und Praktikabilität gleichermaßen in Hinblick auf alle histologischen Typen [23-24].

3.2 Staging

Das Staging kann sowohl nach dem FIGO-System (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique), als auch nach dem TNM- System der UICC (Union International Contre le Cancer) vorgenommen werden, die sich weitestgehend decken. Hierbei steht T für Tumor, N für Nodus und M für Metastase. Als regionäre Lymphknoten gelten beim Ovarialkarzinom Lymphknoten an den Aa. Iliacae internae (hypogastrisch, einschließlich Obturatorlymphknoten), communes und externae, sowie laterale sakrale, inguinale und paraaortale Lymphknoten. Zur Beurteilung müssen intraoperativ mindestens 10 Lymphknoten entfernt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer lymphogenen Metastasierung wächst mit dem FIGO Stadium von 20-30% im Stadium I bis 50-100% im Stadium IV [12]. Lebermetastasen werden, je nach Lokalisation, als FIGO III (Leberkapsel) oder M1 (Leberparenchym) klassifiziert. Zur Erhebung des M-Status bei Pleuraerguß muss der histologische Nachweis maligner Zellinfiltrate erbracht werden [18]. Bei etwa 10% der Ovarialkarzinome kommt es zu einer Peritonealkarzinose ohne, oder mit geringer Beteiligung der Ovarien, die aller Wahrscheinlichkeit nach von subperitonealen Endosalpingioseherden ausgehen. Klinisch und prognostisch werden diese dem FIGO Stadium III zugeordnet und nicht als

Einleitung

Fernmetastasen angesehen [4, 25]. Typischer Weise metastasiert das Ovarialkarzinom per continuitatem, lymphogen und hämatogen. Häufige Lokalisation sind alle Organe des Beckens, das Peritoneum, das Omentum majus und minus, das Diaphragma, sowie Leber, Lunge und Gehirn [12]. Tabelle 3 zeigt im Überblick die Stadieneinteilung gemäß dem FIGO- und TNM-System:

Tabelle 3: Einteilung der Tumorstadien gemäß dem FIGO- und TNM- System [4, 6]

<u>TNM</u>		<u>FIGO</u>		<u>Befundsituation</u>
TX				Primärtumor nicht beurteilbar
T0				Kein Anhalt auf Primärtumor
T1		I		Tumor ist begrenzt auf die Ovarien
	T1a		IA	Tumor ist begrenzt auf ein Ovar, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
	T1b		IB	Tumor ist begrenzt auf beide Ovarien, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
	T1c		IC	Tumor ist begrenzt auf ein oder beide Ovarien, mit Kapselruptur, Tumor auf der Oberfläche des Ovars, maligne Zellen im Aszites oder bei der Peritonealspülung
T2		II		Tumor befällt ein oder beide Ovarien Tumor ist begrenzt auf das Becken
	T2a		IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n)
	T2b		IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
	T2c		IIC	Ausbreitung im Becken (T2a oder T2b) und maligne Zellen im Aszites oder bei der Peritonealspülung
T3	Und/ oder N1	III		Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen und/oder Lymphknotenmetastasen
	T3a		IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
	T3b		IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens mit größter Ausdehnung $\leq 2\text{cm}$
	T3c	Und/ oder N1	IIIC	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens mit größter Ausdehnung $> 2\text{cm}$ und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
	NX			Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
	NO			Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1			Regionäre Lymphknotenmetastasen
M1		IV		Fernmetastasen

4 Klinik

4.1 Symptome

Die Symptomlosigkeit, oder vielmehr die Fehlinterpretation der auftretenden Symptome bei der Mehrzahl der Patientinnen, erklärt zu großen Teilen die erschreckend hohen Mortalitätsraten, die heute noch mit einem Malignom des Ovars assoziiert werden. Studien von Goff et al., sowie von Vine et al. zu Folge, verzeichnen über 90% der Patientinnen durchaus ein oder mehrere Symptome, diese sind jedoch häufig unspezifisch und werden weder vom Arzt, noch von der Patientin mit einander in Verbindung gebracht [26]. Durchschnittlich bereits 5-7 Monate vor Diagnosestellung verzeichnete Symptome sind Blähungen, Appetitlosigkeit, Völlegefühl, Übelkeit und Erbrechen, Verstopfung, Menstruationsunregelmäßigkeiten, sowie abnorme Blutungen oder Ausfluss, Schmerzen beim Geschlechtsverkehr und Müdigkeit. Später kommen dann auch Gewichtsverlust, Unterleibsschmerzen, Vergrößerung des Unterleibsumfangs und Thoraxschmerzen hinzu [26-27]. Dennoch entschließt sich die überwiegende Anzahl der Patientinnen erst bei ausgeprägtem Beschwerdebild dazu einen Arzt zu konsultieren, sodass in über 70% der Fälle, zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, bereits das FIGO Stadium IIB-IV vorliegt. Bislang konnte bedauerlicher Weise noch kein Symptomindex erstellt werden, der durch hinreichende Spezifität und Sensitivität zur früheren Diagnosestellung beitragen würde.

4.2 Screening und Diagnostik

Bislang kann ein generelles Screening der weiblichen Bevölkerung für das Ovarialkarzinom, mittels Vaginalsonographie und Bestimmung des Tumormarkers CA 125, auf Grund der zu geringen Sensitivität und vor allem der mangelnden Spezifität, nicht empfohlen werden [5] [4, 28] [29]. Dabei beruht die hohe Mortalitätsrate des Ovarialkarzinoms gerade auf der späten Diagnosestellung bei der überwältigenden Mehrheit der Patientinnen; eine Entwicklung neuer Früherkennungswerkzeuge ist entsprechend dringend indiziert. Im Falle einer routinemäßigen Vorsorge, ähnlich der für das Zervixkarzinom eingeführten Regeluntersuchung, käme es jedoch übermäßig häufig zu falsch- positiven Ergebnissen und unnötigen operativen Eingriffen. So steigt der Tumormarker CA 125 beispielsweise auch bei benignen Adnextumoren,

Autoimmunerkrankungen, Lebererkrankungen, Endometriose, genitalen und peritonealen Infektionen an [5]. Derzeit gilt die transvaginale Sonographie immer noch als der Goldstandard [12] zur Diagnostik der Tumoren des Ovars, wobei folgende Kriterien vom Untersucher beurteilt werden können: Organzugehörigkeit, Größe, Echogenität, Wanddicke, Zystengröße, Vaskularisierung, Vorhandensein von Septen und soliden Anteilen, sowie Abgrenzbarkeit zu Nachbarorganen [5, 29]. Dennoch konnte bislang das operative Staging nicht durch apparative Bildgebung ersetzt werden [4].

Durch die Verwendung multimodaler diagnostischer Maßnahmen, wie der Anamnese, einem individuellen Risikoscoring, Laborwerten, Tumormarkern und verschiedener Bildgebungen, kann die Spezifität und Sensitivität insgesamt deutlich verbessert werden [5].

Patientinnen, bei denen der Verdacht auf ein hereditäres Ovarialkarzinom besteht, sollten an eine interdisziplinäre Beratungsstelle weitergeleitet werden. Die standardisierten Früherkennungsmaßnahmen in Zentren der Deutschen Krebshilfe-Konsortien werden dort auf das individuelle Erkrankungsrisiko der Patientin abgestimmt [4]. Gesunden Patientinnen mit einer nachgewiesenen BRCA1 oder BRCA2 Mutation, kann, nach abgeschlossener Familienplanung, zu einer prophylaktischen bilateralen Salpingoovarektomie geraten werden. Diese führt zu einer Risikoreduktion, hinsichtlich der Entwicklung eines Ovarialkarzinoms von 85-97%, hinsichtlich der Entwicklung eines Mammakarzinoms von 50-72% [30].

5 Prognosefaktoren und Therapie

Als Prognosefaktoren werden das Alter, der Allgemeinzustand, der postoperative Tumorrest, der histologischer Subtyp, das Tumorstadium, sowie das Tumorgrading anerkannt [4, 6]. Beim frühen Ovarialkarzinom spielen außerdem auch das Vorhandensein einer Tumorruptur und die Therapiequalität eine entscheidende Rolle. Für das fortgeschrittene Stadium ist der bei weitem entscheidendste Prognosefaktor die optimale operative Tumorentfernung. Aus diesem Grund ist in jedem Fall, selbst bei Patientinnen im Stadium FIGO IV, eine „komplette Tumorsektion“ immer der sogenannten „optimalen Tumorsektion“, mit Tumorrest kleiner 1cm, vorzuziehen. Im Anschluss an die operative Resektion konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe und Persistenz des CA 125 Wertes, sowie Höhe des postoperativen Hämoglobinwertes, auf das Gesamtüberleben hergestellt werden. In wie fern ein präoperativer hoher CA125 Serumspiegel zur Prognose einer Patientin beiträgt ist noch umstritten [12]. Es scheint jedoch, dass der

molekularpathologische Nachweis der Expression bestimmter Gene auf der Oberfläche des Tumors sehr genaue Rückschlüsse auf die Überlebensdauer zulässt [5, 31]. Da sich aus der Bestimmung der zuletzt genannten Prognosefaktoren bislang jedoch noch keine klinische Konsequenz ergibt, ist deren Bestimmung zur Zeit noch auf klinische Studien limitiert.

Die in Deutschland etablierten Leitlinien zum therapeutischen Vorgehen beim Ovarialkarzinom unterscheiden lediglich zwischen frühem, FIGO I-IIA, und spätem, FIGO IIB- IV, Tumorstadium. Nur bei gesichertem FIGO IA Staging mit Grading 1, ist ein fertilitätserhaltendes Vorgehen, unter Belassung des Uterus und des kontralateralen Ovars, denkbar. Die optimale operative Entfernung aller makroskopisch erkennbaren Tumormanifestationen, inklusive Hysterektomie, Adnexektirpation beiderseits, Omentektomie, pelviner und paraaortraler Lymphonodektomie, sowie Appendektomie beim muzinösen Subtyp, gehört zum Standardvorgehen. Mit Ausnahme des FIGO IA Grad1 Stadiums, in dem auf eine Chemotherapie verzichtet werden kann, folgt die adjuvante platin- und taxanhaltige Chemotherapie in 3-6 Zyklen. Hierbei sind die Substanzen der Wahl, zum jetzigen Zeitpunkt, Carboplatin und Docetaxel/Paclitaxel[4]. Leider sprechen klarzellige und muzinöse Ovarialkarzinome bedeutend schlechter auf die Standardchemotherapie an, als serös-papilläre und endometroide Karzinome. Aus diesem Grund hat sich auch eine Tendenz hin zur Subtyp-spezifischen Therapie entwickelt [16]. Es wurde kürzlich gezeigt, dass „high-grade“ seröse Karzinome, mit 70-80% Ansprechraten deutlich besser auf Chemotherapien ansprechen, als „low-grade“seröse Karzinome. Muzinöse Karzinome, die hohe Amplifikationsraten des HER2 Gens aufweisen, können möglicherweise durch die Therapie mit dem Biological Trastuzumab, deutlich besser therapiert werden als durch die Standardchemotherapie, die nur in 15-35% der Fälle anspricht. Aus einer ähnlichen Problematik heraus wird momentan Radiochemotherapie als alternative Therapieoption für das klarzellige Karzinom diskutiert [16].

Im Falle eines Tumorrezidivs, profitieren wahrscheinlich nur die Patientinnen von einer Rezidivoperation, bei denen Tumorfreiheit erreicht werden kann und deren Tumore auf eine platinhaltige Chemotherapie ansprechen. Ist dies nicht der Fall, wird die Durchführung einer nicht platinhaltigen Monochemotherapie, mit rein palliativer Zielsetzung, empfohlen. Spätestens zu diesem Zeitpunkt ist auch die Hinzunahme einer psychoonkologischen Fachkraft angezeigt. Psychoonkologische Betreuung hat als integraler Bestandteil der Therapie eines jeden Ovarialkarzinoms in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen und sollte jeder Patientin frühzeitig angeboten werden [4].

6 Einführung Tumormimmunologie

Die Rolle des adaptiven Immunsystems als Mediator der körpereigenen Tumorbabwehr, ist in den vergangenen zwei Jahrzehnten zum Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Diskussion geworden. In einer Reihe von Studien gelang es Robert North und seinem Forschungsteam bereits Mitte der achtziger Jahre, am Beispiel eines durch Methylchloranthren induzierten Fibrosarkoms, erstmals am Mausmodell nachzuweisen, dass, obwohl der Tumor eine potente T-Zell Antwort, im Sinne einer Tumor Abwehr, provoziert, diese nicht im Stande war, das Tumor Wachstum einzudämmen. Als Ursache hierfür identifizierte North eine Subpopulation von Suppressor Zellen, die durch den Tumor selbst aktiviert worden war und die körpereigenen Abwehrmechanismen unterdrückte [32]. In weiteren Experimenten gelang es ihm die Suppressor T-Zell Population mittels ihrer Oberflächenstruktur als CD4⁺ CD8⁻ zu kategorisieren. Durch gezielte Applikation eines gegen CD4⁺ gerichteten Antikörpers konnte er eine Tumorregression erzielen. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Zellaktivität und dem Tumorwachstum war hergestellt [33]. Bei den von North entdeckten CD4⁺ T-Zellen, handelte es sich, gemäß der CD-Oberflächenstruktureinteilung, um T-Lymphozyten der T-Helferzell Subpopulation (siehe hierzu auch Anhang 1). Durch Sakaguchi et al. wurde im Jahr 1995 diese Subpopulation weiter spezifiziert. In einem Mausmodell gelang es dort eine CD4⁺CD25⁺ T- Zell Subpopulation zu identifizieren, welche in der Lage war, Autoimmunreaktionen der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen zu unterbinden. Auf Grund des regulatorischen Einflusses, den diese Zellen auf andere Zellen der Immunabwehr ausübten, wurde diese Subpopulation als T-regulatory Cells (Treg-Zellen) klassifiziert [34]. Als Unterscheidungsmerkmal der Treg-Zellen war nun die Oberflächenstruktur CD25⁺ hinzugekommen. CD25 wird von naiven CD4⁺ T-Zellen, im Zuge ihrer Aktivierung exprimiert [35]. Als Voraussetzung der Aktivierung einer T-Zelle und deren klonaler Expansion, muss es notwendigerweise zur Expression von CD25⁺, der IL2R α Kette des IL-2 Rezeptors kommen. Der IL-2 Rezeptor ist einer der potentesten Wachstumshormonrezeptoren von Lymphozyten. Er besteht aus drei Polypeptidketten (α β γ), von denen naive T-Zellen lediglich die β - und γ - Untereinheit auf ihrer Oberfläche exprimieren. Im Zuge des kostimulatorischen Dialogs mit einer antigenpräsentierenden Zelle, exprimiert die aktivierte T-Zelle die fehlende IL2R α Untereinheit, die drei Untereinheiten fügen sich zusammen und der Rezeptor wird aktiviert [36].

Aus heutiger Sicht ist CD25⁺ demzufolge lediglich ein Zeichen der Aktivierung einer T-Zelle, kein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal einer spezifischen T-Zell Population. Seit dem Jahr 2003, ist es jedoch endlich möglich die CD4⁺CD25⁺ exprimierenden Treg-Zellen eindeutig von den aktivierten CD4⁺CD25⁺ T-Helferzellen und CD8⁺CD25⁺ zytotoxischen T-Zellen abzugrenzen. Durch Fontenot et al. sowie durch Hori et al. [37-38] wurde der Forkhead Box Protein 3 Transkriptionsfaktor (FoxP3) als spezifischer Treg-Zell Oberflächenmarker identifiziert. FoxP3 ist ein DNA bindendes Aminosäuremotiv der Forkhead box Familie [39]. Durch Bindung der DNA im Zuge der Transkription ermöglicht FoxP3 die selektive Stimulation der Produktion bestimmter Proteine, die zur Funktion der Treg-Zelle essentiell sind e.g. IL-10 [37]. Die wesentliche Bedeutung des Transkriptionsfaktors FoxP3, im Rahmen der Regulation von Immunprozessen, wird angesichts der Konsequenzen einer Mutation dieses Genes besonders deutlich. So ist eine Mutation des FoxP3 Genes ursächlich an der X-abhängigen rezessiven Mutation der „Scurfy“- Maus [40] beteiligt. Beim Menschen ist diese Mutation für das Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrom (IPEX- Syndrom) verantwortlich [41], das mit schweren Autoimmunerkrankungen einhergeht [38, 42]. In zahlreichen weiteren Experimenten haben sich, seit der Entdeckung des FoxP3 Proteins CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ Treg-Zellen als Standard etabliert [43-44] [37, 45] [46-47]. Treg-Zellen entstammen zum Teil als CD3⁺CD4⁺CD25⁺ und zu einem geringeren Anteil als CD3⁺CD8⁺CD25⁺ Zellen direkt dem Thymus. Diese haben im Zuge der T-Zell Reifung im Thymus, kein Apoptosesignal erhalten, obwohl sie eine hohe Affinität gegenüber Selbstpeptiden aufweisen [35, 39]. Durch diesen Entstehungsmechanismus sind Treg-Zellen in der Lage selbstpeptidspezifische T-Zellen, die beispielsweise im Rahmen einer Autoimmunerkrankung auftreten, zu identifizieren und inaktivieren. Da auch Tumorzellen häufig selbstpeptidische Strukturen aufweisen, wird durch diesen Entstehungsmechanismus auch der Schutz des Tumorgewebes durch Treg-Zellen verständlich.

Neben diesen natürlichen Treg-Zellen (nTreg), gibt es jedoch auch solche, die erst der Peripherie, durch Stimulation zu Treg- Zellen konvertiert werden, die induzierten Tregs (iTreg). Diese scheinen unter Bedingungen von geringer Antigenpräsentation durch MHCI/MHCII Moleküle oder durch fehlerhaften kostimulatorischen Dialog im Zuge der T-Zell Aktivierung zu entstehen [36]. Eindeutig ist, dass die forcierte Expression von FoxP3 in naiven T-Zellen zu deren Konversion zu Treg-Zellen führt, sowohl hinsichtlich des Phänotyps als auch der Funktion [37-38]. Eine Unterscheidung der beiden Gruppen in der Peripherie ist mit den uns bekannten Methoden jedoch noch nicht möglich.

6.1 *Treg-Zellen, Zytotoxische T-Zellen und Tumorescape*

Treg-Zellen sind physiologischer Weise an der Steuerung von Autoimmunkrankheiten und chronisch entzündlichen Prozessen beteiligt und sind somit für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz von essentieller Bedeutung [42]. Darüber hinaus fungieren sie als Mediatoren zwischen Körperzellen und dem adaptiven Immunsystem. Diesen positiven regulatorischen Effekten stehen negative inhibitorische Begleiterscheinungen der Treg-Zell-Funktion gegenüber. So sind sie maßgeblich an der Entstehung von chronisch entzündlichen Erkrankungen, zahlreichen Autoimmunerkrankungen und an der Unterdrückung einer immunologischen Tumorabwehr beteiligt. Auf der Oberfläche von Tumoren werden tumorspezifische Antigene exprimiert, die von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können [48]. Mittels direkter oder indirekter, durch Dendritische Zellen vermittelter Mechanismen, sind sie dann in der Lage Tumorzellen gezielt zu zerstören. Um dieser Immunabwehr zu entgleiten, haben Tumorzellen mannigfaltige Tumorescapemechanismen entwickelt. Durch die Sekretion von Botenstoffen wie TGF- β und IL-10, kann ein direkter inhibitorischer Reiz auf Immunzellen ausgeübt werden [49]. Die Expression von Rezeptoren, wie dem B7-H1 Rezeptor oder dem Fas-Liganden, auf der Oberfläche von Tumorzellen, führt direkt zur Apoptose der T-Zelle [50-51]. Des Weiteren können auch indirekte Mechanismen, wie die Manipulation von Dendritische Zellen, oder die Aktivierung von Treg-Zellen, die Immunantwort unterdrücken [52]. Umstritten ist nach wie vor, ob Tumorzellen in der Lage sind, durch Expression von FoxP3, Treg-Zell ähnliche Funktionen auszuüben [53-54] [55].

6.2 *CCL22*

Bislang ist weitgehend unklar, wie es zu der Ansammlung von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen im Tumorgewebe kommt. Als ein möglicher Mechanismus der Treg-Zell Chemotaxis wird das Chemokin CCL22 diskutiert. Chemokine sind, laut dem Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, eine Gruppe von Botenstoffen, deren primäre Funktion in der Leukozytenmigration im Zuge eines Infektionsgeschehens besteht. Man unterscheidet eine Vielzahl unterschiedlicher Chemokine, die synergistisch auf unterschiedliche Akteure des Immungeschehens Einfluss nehmen können. Als Chemokin der Gruppe Beta (CC-Familie) ist das Chemokin CCL22 hauptsächlich an der Aktivierung von Monozyten beteiligt. Die Aktivierung erfolgt mittels eines

Transmembranrezeptors der Rhodopsin Superfamilie, dem CCR4 Rezeptor [56]. Von multiplen wissenschaftlichen Arbeiten wurde die lokale Anhäufung von CCL22 im Tumorgewebe, sowie die CCR4 Rezeptor Expression auf Treg-Zellen beschrieben [57-58] [59-60] [61-62] [63]. Es wird vermutet, dass CCL 22 möglicherweise eine zentrale Funktion im Zuge der, von Dendritischen Zellen initiierten Zellmigration von T-Zellen, zugeschrieben werden kann [64]. Am Mausmodel konnte die herausragende Rolle des Chemokins CCL22 für die Tumorphathogenese des Ovarialkarzinoms bestätigt werden. Durch die Therapie mit einem CCL22-spezifischen Antikörper, wurde die Anzahl der Treg-Zellen in einem in die Maus implantierten humanen Ovarialtumor deutlich verringert [57] .

Welche Zellen für die Produktion des Chemokins verantwortlich sind ist noch nicht hinreichend erforscht. Im menschlichen Organismus ist der Nachweis von CCL22 physiologischer Weise auf den Thymus und die Lymphknoten begrenzt. Hier nutzen antigenpräsentierende, aktivierte, CD1a+,CD1b+ und CD83+ Dendritische Zellen CCL22 zur Chemotaxis naiver T-Zellen, die dann an den Ort der Infektion auswandern [65]. Produziert werden Chemokine aber auch von vielen anderen Zellarten, unter anderem Leukozyten, T-Zellen, Monozyten, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen [56] . Für Patienten mit Psoriasis und atopische Dermatitis konnte gezeigt werden, dass sich unter den dortigen pathologischen Verhältnissen, auch Monozyten und T- Zellen in der Dermis und Subcutis anreichern, die in der Lage sind CCL22 zu produzieren [65]. Unter Berücksichtigung dieses Umstandes ist auch eine Sekretion von CCL22 durch die Treg- Zellen oder selbst durch Tumorzellen denkbar.

Zielsetzung und Fragestellungen

Lassen sich in den untersuchten Tumoren FoxP3+ T-Zellen nachweisen?

Inwiefern korreliert das Auftreten von FoxP3+ Zellen mit dem Auftreten von CD8+ zytotoxischen T-Zellen?

Lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von FoxP3+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen und dem Chemokin CCL22 nachweisen?

Inwieweit korreliert das Auftreten von FoxP3+Zellen, CD8+ T-Zellen und/oder von CCL22+ Zellen mit gängigen Prognosefaktoren wie Tumorstadium, Tumorgading oder histologischem Subtyp?

Korreliert die FoxP3- und/oder CCL22-Expression oder der CD8+/FoxP3+ Ratio mit dem Überleben der Patientinnen?

Wie ist das Verteilungsmuster der verschiedenen Expressionen im peritumoralen Stroma und innerhalb des Tumorgewebes mit dem Überleben der Patientin assoziiert?

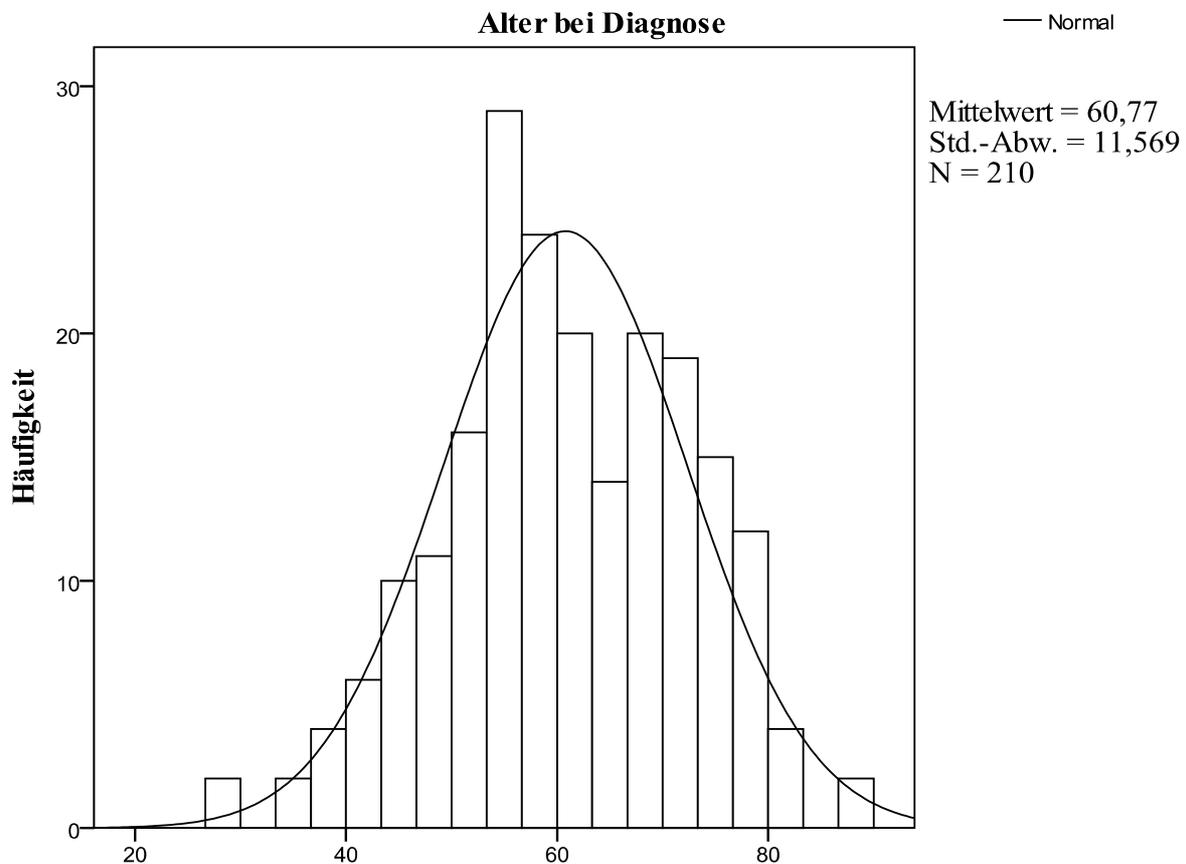
Von welchen Zellen (Lymphozyten, Tumorzellen) werden FoxP3 und CCL22 exprimiert?

Material und Methoden

1 Materialien

Die insgesamt 210 untersuchten Tumoren entstammen den Archiven des Pathologischen Instituts und der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians- Universität München. Es wurden Fälle aus den Jahren 1989-2002 ausgewählt. Alle Patientinnen wurden innerhalb dieses Zeitraums am Klinikum der Universität München operiert. Das Material wurde in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, und als Paraffinblock archiviert. Zu allen Patientinnen waren durch das Tumorregister München ausführliche Follow-Up Daten gesammelt worden. Die Patientinnen waren alle europäischer Herkunft. Das Lebensalter der Patientinnen betrug zum Diagnosezeitpunkt zwischen 27 und 87 Jahre; im Durchschnitt waren die Patientinnen 60,77 Jahre alt, mit einer Standardabweichung von 11,57. Der Median betrug 60,1 Jahre mit einer Gesamtspannweite von 61 Jahren. Diagramm 1 verbildlicht die Altersverteilung der untersuchten Population:

Diagramm 1: Altersverteilung des Patientenkollektivs

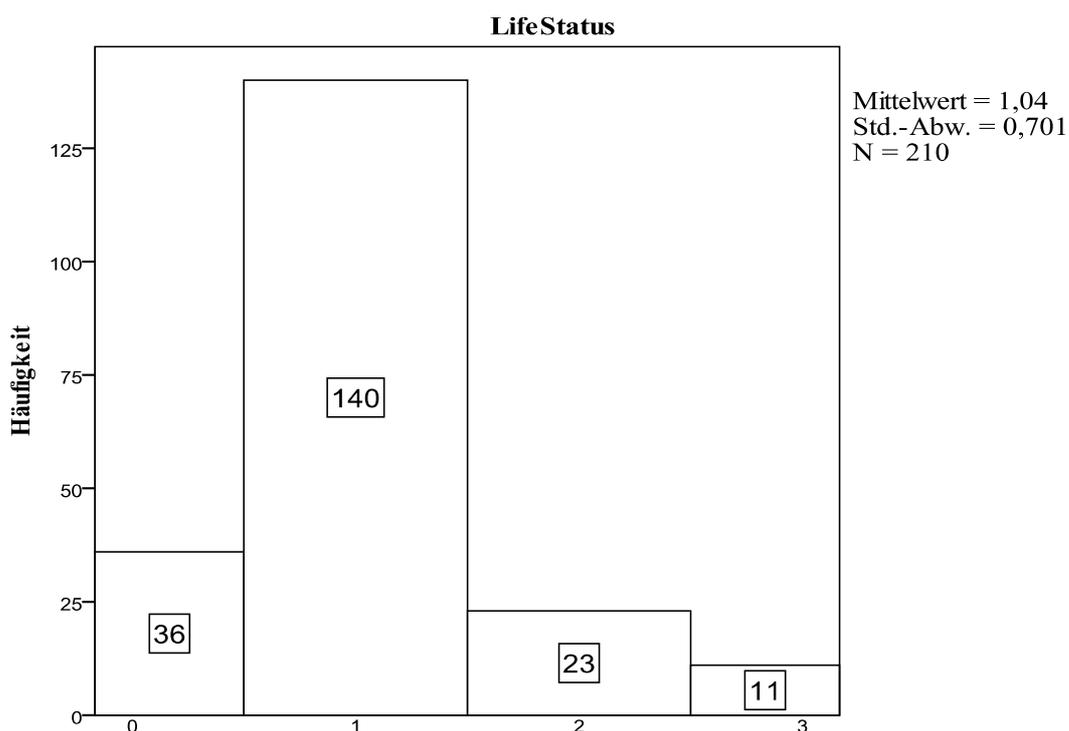


Bei 89% der Patientinnen konnte die Krankengeschichte, dank der Arbeit des Tumorzentrums München, lückenlos erhoben werden. Bei nur 11%, 23 Patientinnen insgesamt, war es nicht möglich ein vollständiges Follow-up zu erheben. Bei diesen Patientinnen bleibt unklar ob sie überlebt haben oder bereits verstorben sind. Aus diesem Grund wurden sie aus den Berechnungen hinsichtlich der Überlebensparameter ausgeschlossen. 71,9% der Patientinnen sind, nach gesicherten Erkenntnissen, bis dato verstorben. Hierbei wurde in 5,2% der Fälle auf dem Totenschein eine tumorunabhängige Todesursache angegeben. Bei den verbleibenden 66,7% der Todesfälle lässt sich zweifelsfrei ein Zusammenhang zwischen dem Versterben der Patientin und dem Ovarialkarzinom herstellen. Überlebt haben bis heute lediglich 36 Patientinnen, was einem Anteil von 17,1% entspricht. Die Einteilung wurde wie folgt vorgenommen:

Tabelle 4: Life Status

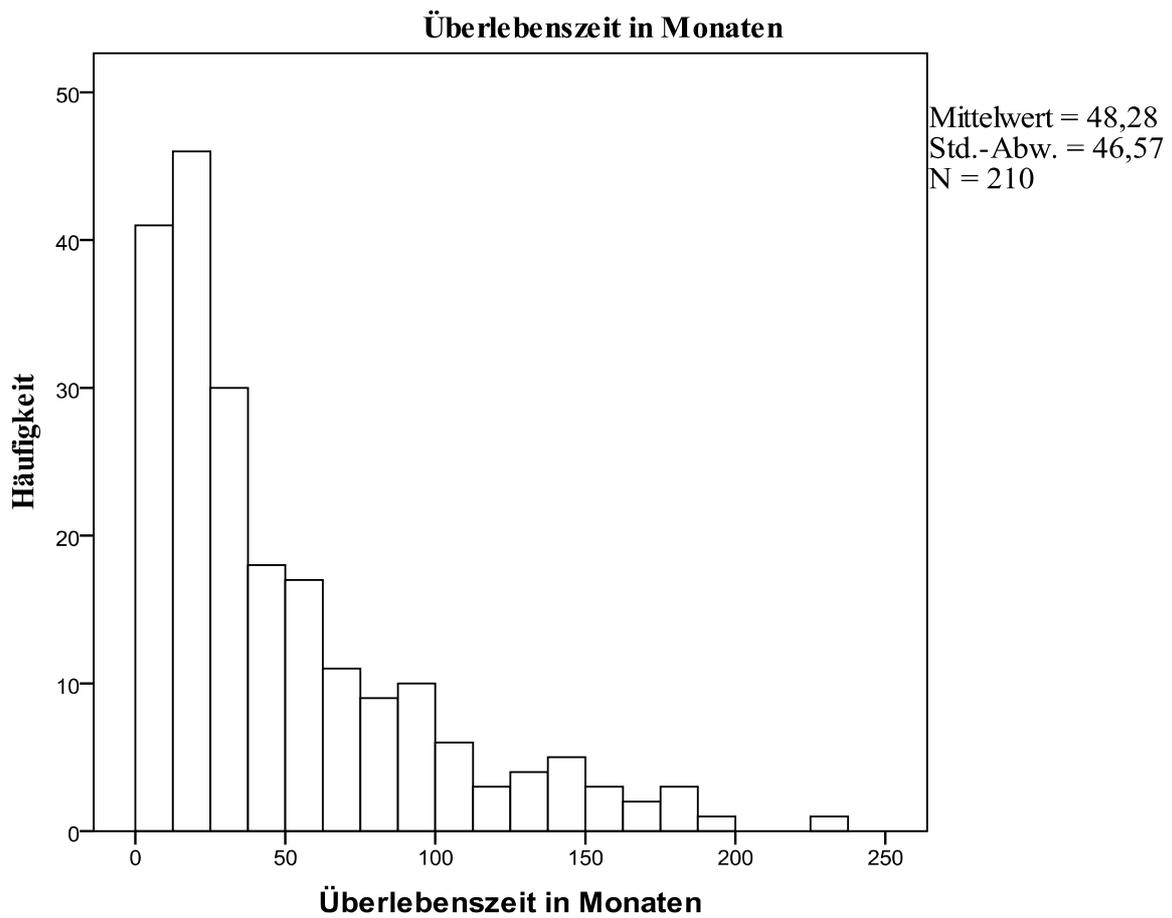
Status	Gesamtpopulation	%
Lebende (Gruppe 0)	36	17,1%
Verstorbene		
a) Todesursache tumorabhängig (Gruppe1)	140	66,7%
b) Todesursache tumorunabhängig (Gruppe 3)	11	5,2%
Follow up unvollständig (Gruppe 2)	23	11%
Gesamt	210	100%

Diagramm 2: Life Status



Die mittlere Überlebenszeit betrug 48,28 Monate mit einer Standardabweichung von 46,57. Der Median lag bei 32 Monaten, die Spannweite betrug entsprechend 230 Monate.

Diagramm 3: Überlebenszeit der Gesamtpopulation

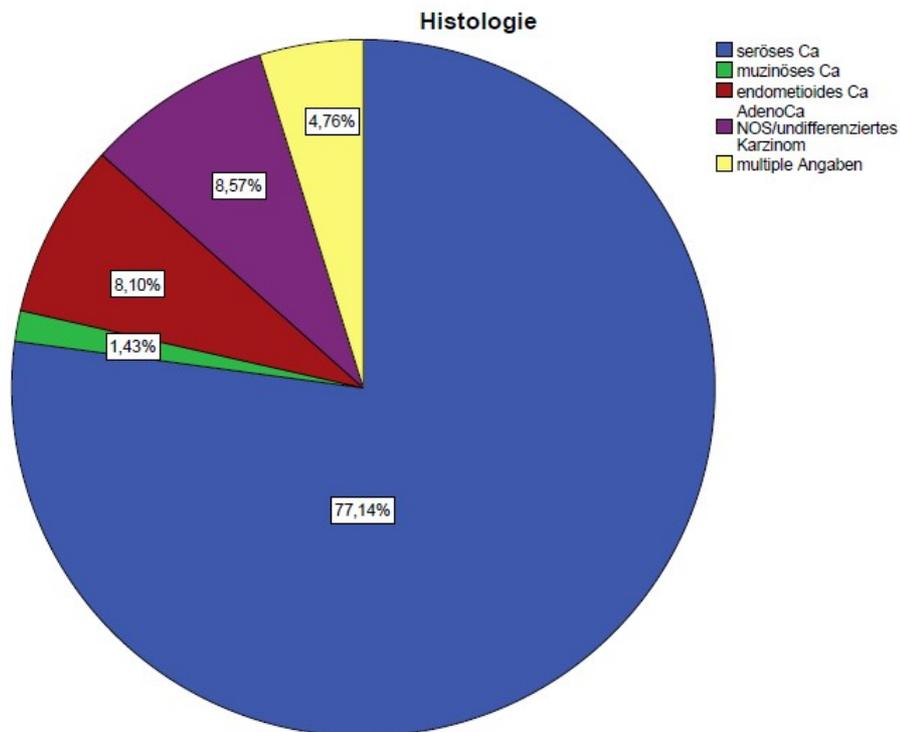


Material und Methoden

Es handelte sich bei allen untersuchten Fälle ausschließlich um Epithelial- Stromale Karzinome, bei dem Großteil der Tumoren, mit einem Anteil von 77,1%, um Karzinome des serösen Subtyps. Die zweitgrößte histologische Gruppe stellen die Karzinome des endometrioiden und nicht anderweitig spezifizierten adenoiden Typs, mit jeweils 8,1% respektive 5,3% Anteilen. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die histologischen Subtypen des Patientenkollektivs:

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung des Histologischen Subtyps

Histologie	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
Seröses Karzinom	162	77,1	77,1
Muzinöses Karzinom	3	1,4	78,6
Endometrioides Karzinom	17	8,1	86,7
Adenokarzinom NOS*	11	5,3	91,9
Undifferenziertes Karzinom	7	3,3	95,2
Multiple Angaben	10	4,8	100
Gesamt	210	100	

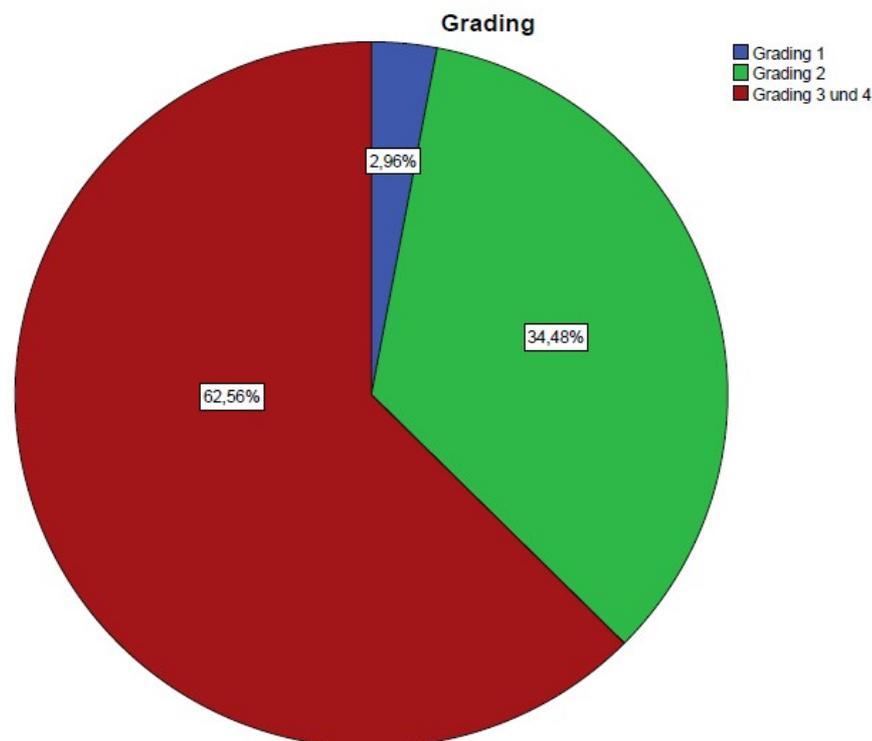


Material und Methoden

Bei 203 der 210 Patientinnen wurde das Tumorgrading dokumentiert, bei sieben Patientinnen fehlen die Daten bezüglich dieses Parameters. Die überwiegende Anzahl der Präparate wiesen ein Grading der Klasse 3 und 4 auf (n=127/60,5%). Gerade Mal sechs Patientinnen wurden an einem Tumor mit Grad 1 Morphologie operiert, was 2,9% entspricht. Bei den verbleibenden 70 Patientinnen wurde der Tumor mit Grading 2 klassifiziert (n=70/33,3%). Tabelle 6 fasst diese Parameter nochmals zusammen.

Tabelle 6: Grading der Tumoren

Status	Häufigkeit	%
Grading 1	6	2,96%
Grading 2	70	34,48%
Grading 3+4	127	62,6%
Gesamt	203	100%

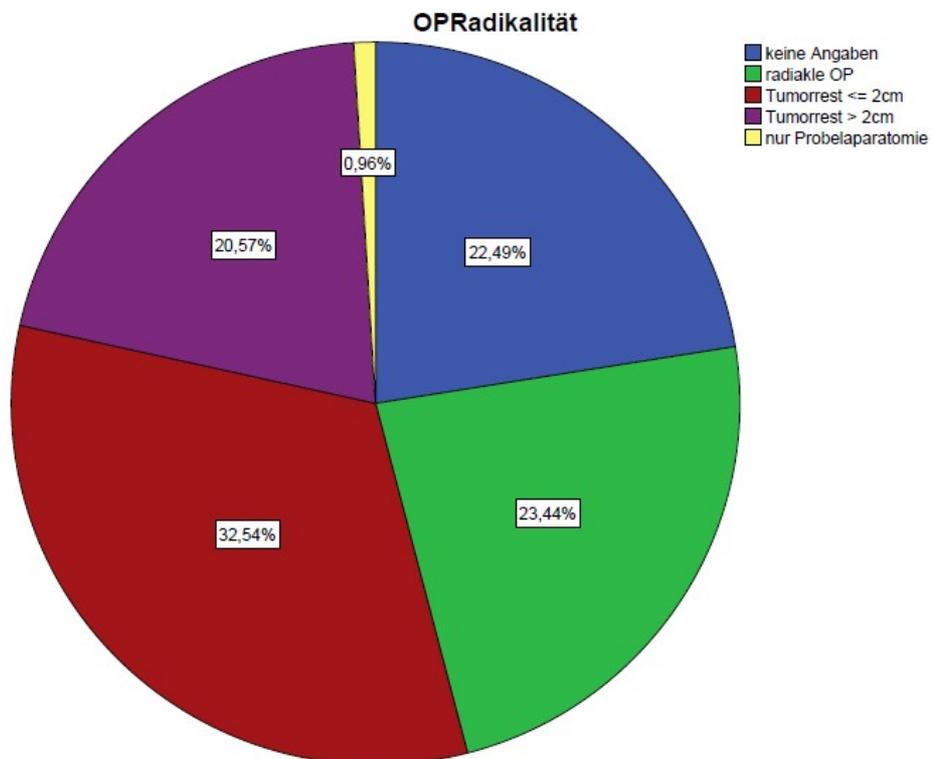


Es wurden ausschließlich Patientinnen ausgewählt, die sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im FIGO Stadium III befanden.

Ein wichtiger Faktor, der bei der Überlebenszeit der Patientinnen im Laufe der Untersuchungen berücksichtigt werden muss, ist die Radikalität der therapeutischen Intervention. Tabelle 7 und das dazugehörige Kreisdiagramm fassen die Population hinsichtlich dieses Parameters anschaulich zusammen.

Tabelle 7: OP- Radikalität

Status	Häufigkeit	%
keine Angaben	47	22,4%
radiakle OP	49	23,3%
Tumorrest <= 2cm	68	32,4%
Tumorrest > 2cm	43	20,5%
nur Probelaparatomie	2	1,0%
Gesamt	209	100%



1.1 Geräte

Brutschrank	Heraeus/ Kendro, Langenselbold, Deutschland
Mikrowelle	M637 EC, Miele, Deutschland
Heizplatte	Präzitherm, Störk Tronic, Stuttgart, Deutschland
Vortex	Heidolph Elektro AG, Kehlheim, Deutschland
Mikrotom	Jung AG, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Typ 3047, Köttermann GmbH&Co. Kg, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
pH-Meter	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Zentrifuge	Poly Labo, Straßburg, Frankreich
Lichtmikroskop	Typ Axioskop 20 Zeiss,; Serial No. 984353, Oberkochen, Deutschland
Färbeautomat	Typ Benchmark XT, Ventana Medical Systems, Roche, Basel, Schweiz

1.2 Verbrauchsmaterial

Paraffin	Histosec Paraffin-Pastillen ohne DMSO, Catalog Number 1.15161, Merck, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Menzel-Gläser Super Frost Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig,

Material und Methoden

Deutschland

Deckgläser	Menzel-Gläser, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Feuchte Kammer	Plastikbox
Eindeckgelatine	Kaisers Glyceringelatine, Catalog Number 1.09242.0100, Merck, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

1.3 Chemikalien

1.3.1 Chemikalien Allgemein

Xylol (reinst)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Ethanol (vergällt)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Acqua bidest	H.Kerndl GmbH, Weißenfeld, Deutschland
Tris- Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan:0,05M eingestellt auf pH 7,5 43,9g NaCL+ 34,25g TRIS- HCl + 4,5g TRIS- Base; aufgefüllt auf 5 Liter mit Aqua dest

1.3.2 Chemikalien Vorbehandlung Doppelmarkierung

Wasserstoffperoxid	Hydroxen Peroxid Solution, Catalog Number H0904, Sigma Aldrich Co., München, Deutschland
Target Retrieval	Target Retrieval Solution, Catalog Number S1699, Dako North Amerika Inc., Carpinteria, USA
Protein Block	Protein Block Serum- Free, Catalog Number X0909, Dako North Amerika

Inc., Carpinteria, USA

1.3.3 Chemikalien Vorbehandlung CD8 Markierung

CC1 Cell Conditioning No. 1, Catalog Number 950- 124, Ventana Medical Systems, Tucso, USA

Benchmark XT Full

System Benchmark XT Full System, Catalog Number E750-BMKXT-FS , Ventana Medical Systems, Tucson, USA

1.4 Detektionssysteme

1.4.1 Detektionssysteme Doppelfärbung

ABC-Kit Vecastain ABC-Kit Elite Universal, Vector Laboratories, Catalog Number PK6200, Burlingame, USA

MACH3 Kit MACH 3 Mouse AP-Polymer Detection Kit, Catalog Number M3M532 H, Biocare Medical, Concord, USA

1.4.2 Detektionssystem CD8 Färbung

Basic DAB

Detection Kit Basic DAB Detection Kit, Catalog Number 760-001, Ventana Medical Systems, Tucson, USA

1.5 Primärantikörper

CCL 22 Anti-Human MDC Antigen Affinity Purified Polyclonal Antibody, Catalog Number 500-P107, Polyclonal Rabbit, Preprotech GmbH, Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

FOXP3 Anti- Human FOXP3 Antigen, Catalog Number ab20034, Monoclonal Mouse, Klon 236A/E7, Abcam, Cambridge, UK

CD8- AB-1 Anti- Human CD8- AB-1 Antigen, Catalog Number MS 457, Monoclonal Mouse, Klon C8\144 B, LAB Vision, Fremont, USA

1.6 Färbemittel

1.6.1 Färbemittel Doppelfärbung

DAB+ Chromogen DAB+ Catalog Number K3467, Dako North Amerika Inc., Carpinteria, USA

Chromogen Red Chromogen Red, entnommen aus Real Detection System APAAP, Catalog Number K5000, Dako North Amerika Inc., Carpinteria, USA

Hematoxylin Hematoxylin Gill's Formula, Catalog Number H-3401, Vector Laboratories, Burlingam, USA

1.6.2 Färbemittel CD8 Färbung

DAB Ultra view Universal DAB Detection Kit, Catalog Number 760-500, Ventana Medical Systems, Tucson, USA

Hematoxylin Hematoxylin Counter Stain, Catalog Number 760- 2021, Ventana Medical Systems, Tucson, USA

Bluing Reagent Bluing Reagent, Catalog Number 760- 2037, Ventana Medical Systems, Tucson, USA

2 Methoden

2.1 Prinzip Immunhistochemie

Als eine der zentralen Methoden, die in der modernen histopathologischen Untersuchung eingesetzt werden eignet sich die Immunhistologie dazu, Oberflächenmerkmale wie Lipide, Polysaccharide und Proteine nachzuweisen. Antikörper binden hochspezifisch Epitope, die molekularen Strukturen eines Antigens, und können somit als Nachweismethode für das Expressionsmuster von Oberflächenstrukturen eines histologischen Schnittes eingesetzt werden. Chromogene (Markersubstanzen) dienen hierbei der Sichtbarmachung der im Gewebe befindlichen Antigen-Antikörperkomplexe. Die am häufigsten eingesetzten Enzyme, die zur Umsetzung des Chromogens genutzt werden, sind die Horseradish- Peroxidase, sowie die Alkalische Phosphatase [66]. Da deren Enzymaktivität in hohem Maße abhängig vom pH-Wert, der Temperatur, der Ionenkonzentration des Puffers und der Substratkonzentration ist, wird im folgenden Protokoll auf diese Bedingungen im Rahmen der durchgeführten Untersuchung ausführlich eingegangen werden. Die optimale Verdünnung des Antikörpers, sowie die optimale Inkubationszeit wurden vorab, durch Anfertigung einer Titrationsreihe, bestimmt. Ziel war die maximal- spezifische Färbung bei gleichzeitig minimaler Hintergrundfärbung zu erzielen. Da es sich bei der CCL22/FoxP3 Färbung um eine Doppelfärbung am selben Präparat handelt, musste, zur Vermeidung von unspezifische Reaktionen, mit unterschiedlichen immunhistochemischen Verfahren gearbeitet werden. Diese werden im kommenden Abschnitt kurz dargestellt. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die verwendeten Primärantikörper, die Verdünnungen, die Inkubationszeiten und die Versuchstemperatur.

Tabelle 8: Überblick über die verwendeten Primärantikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Inkubationszeit	Temperatur
Anti-Human MDC(CCL22)	Polyclonal; Rabbit	1:350	60 Minuten	Raumtemperatur
Anti-Human FoxP3	Monoclonal; Mouse	1:180	60 Minuten	Raumtemperatur
Anti- Human CD8	Monoclonal; Mouse	1:50	24 Minuten	37°C

2.1.1 CCL22 Färbung mit der ABC-Methode

Zuerst wurden die Präparate mittels der Avedin- Biotin- Komplex- Methode (ABC-Methode) behandelt um die Zellen anzufärben, die das Chemokin CCL22 exprimieren. Hierbei wird die außerordentlich hohe Affinität des Glykoproteins Avedin für das Vitamin Biotin ausgenutzt, die ungefähr eine Millionen Mal stärker ist als die Bindung zwischen Antigen und Antikörper und somit als irreversibel angesehen werden darf [67]. Zusätzlich dazu besitzt Avedin vier Bindungsstellen für Biotin, was die Bildung von makromolekularen Komplexen zwischen Avedin und biotinilierten Enzymen erlaubt und somit letztlich zu einer erhöhten Sensitivität der Färbung, durch Amplifikation des Signalpfades, führt [67]. Um Störfaktoren der immunhistologischen Färbung vorzubeugen, werden, vor Applikation des Primärantikörpers, die Präparate mit einem equinen Protein Blocking Serum vorbehandelt und unspezifische Proteinbindungen dadurch vorab gesättigt. Danach wird der Primärantikörper aufgetragen. Es handelt sich hierbei um einen polyklonalen Antikörper vom Rabbit in einer Verdünnung von 1:350. Polyklonalen Antikörper sind das natürliche Gemisch aller Antikörper die im Zuge einer Immunreaktion gegen die unterschiedlichen Determinanten eines Antigens durch das Abwehrsystem, B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen, gebildet werden. Auf Grund dieses Entstehungsmechanismus haben polyklonale Antikörper ein sehr breites Reaktionsspektrum und es kommt häufig zu unerwünschten Kreuzreaktionen mit ähnlichen Oberflächenstrukturen. Dem Primärantikörper folgt ein biotinilierter Sekundärantikörper, der sich gegen Epitope des Primärantikörpers richtet. Es handele sich in unserem Versuchsaufbau um einen multi-linked Sekundärantikörper, der sich sowohl gegen Oberflächenmerkmal der Maus, als auch gegen die des Rabbits richtet. Als dritten Schritt wird der Makromolekulare Horseradish-Peroxidase- Avedin Komplex hinzugegeben. Die Horseradish Peroxidase (HRP) eignet sich als Enzym in der Immunhistochemie besonders, da sie auf Grund ihrer kleinen Größe die Antigen-Antikörper Reaktion nicht behindert, stabil ist und während der AK-Kopplung aktiv bleibt, sowie leicht und kostengünstig erhältlich ist [66]. Voraussetzung für die Verwendung der HRP ist, dass die natürlicher Weise im Gewebe vorkommende Endogene Peroxidase, vor Verwendung dieses Enzyms, mittels Wasserstoffperoxid inaktiviert wurde. In Kombination mit HRP lassen sich viele unterschiedliche Chromogene verwenden, so auch das in diesem Versuch eingesetzte 3,3'- Diaminobenzidin (DAB). Das entstehende Enzymprodukt ist gelb-bräunlich im Zytoplasma der Zelle sichtbar.

2.1.2 Färbung von FoxP3

Um Kreuzreaktionen mit dem zuvor verwendeten ABC- System zu reduzieren, wurde zur Färbung von FoxP3 das MACH-3 Mouse Alkalische Phosphatase Polymer Detection System verwendet. Dadurch wurde nicht nur eine Trennung der Systeme, sondern auch der Spezies gewährleistet, die in Einzelfällen ebenfalls zu unerwünschten Wechselwirkungen führen könnte. Wieder wurde übermäßige Hintergrundfärbung durch Verwendung eines Protein Blockers reduziert, dann der Primärantikörper aufgetragen. In diesem Fall handelte es sich um einen Monoklonalen Antikörper, der hochspezifisch FoxP3 spezifische Epitope bindet und in Hybridomzellen der Maus synthetisiert wurde. Danach folgt die MACH-3-Probe mit dem Sekundärantikörper, in diesem Fall ein Mikropolymer, der sich spezifisch gegen Oberflächenstrukturen der Maus richtet und an den als Enzym Alkalische Phosphatase gebunden wurde. Diese setzt in einem letzten Schritt das hinzugefügte Chromogen Real Red um.

Durch diese optimale, zweifache Trennung der beiden verwendeten Färbemethoden konnten Hintergrundfärbungen und unspezifische Kreuzreaktionen, im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen, ausnahmslos verhindert werden.

2.1.3 Färbung von CD8+

Die Färbung der CD8+ Oberflächenstrukturen erfolgte maschinell mit Hilfe der Ventana Benchmark XT von Ventana Medical Systems gemäß dem vorgegebenen Standardprotokoll. Beim Primärantikörper handelte es sich um einen Monoklonalen Antikörper von der Maus. Als System wurde das Standard XT ultraView DAB v3 kit von Ventana verwendet, mit Horseradish Peroxidase als Enzym. Die theoretischen Hintergründe gleichen den für CCL22 beschriebenen Vorgängen und werden aus diesem Grund nicht nochmal wiederholt.

2.2 Versuchsprotokoll Doppelfärbung CCL22/FoxP3

2.2.1 Schneiden der Blöcke

Die Paraffinblöcke wurden auf -20°C abgekühlt und dann am Mikrotom 2 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden daraufhin in Aqua dest aufgefangen und anschließend in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt. Im Anschluss wurden die Schnitte auf die positive Seite eines mit SuperFrost Plus beschichteten Objektträgers aufgezogen und dann bei 50°C über Nacht im Brutschrank getrocknet.

2.2.2 Entparaffinierung

Vor der immunhistochemischen Färbung müssen die Schnitte entparaffiniert und rehydratisiert werden. Fehlerhafte Entfernung von Paraffin aus den Schnittpräparaten kann zu Störungen im Färbemuster der nachfolgenden Immunreaktion führen. Hierfür wurden die Schnitte in Glasschaukeln eingestellt und in absteigender Alkoholreihe durch folgende Reagenzien geführt:



Xylol	30 Minuten
99% Ethanol	5 Minuten
96% Ethanol	5 Minuten
70% Ethanol	5 Minuten
Aqua dest.	5 Minuten

2.2.3 Vorbehandlung

Die Schnitte wurden anschließend in Cuvetten eingestellt, die mit der Arbeitslösung aus Dako Target Retrieval Solution Puffer pH6, Verdünnung 1:10 mit Aqua dest. befüllt wurden. Die Mikrowelle wurde mit Aqua dest gefüllten Cuvetten aufgefüllt, um eine konstante Bestrahlungsdosis zu ermöglichen und der Sidierung des Puffers entgegenzuwirken. Bei 750Watt wurden die Cuvetten nun 2x15 Minuten lang bei 97°-99°C gekocht. In der kurzen Zwischenpause wurden die Cuvetten mit Puffer respektive Aqua dest. wieder aufgefüllt. Mit Hilfe dieses Verfahrens werden hitzeinduziert Oberflächenepitope demaskiert und dadurch die immunhistochemische Färbung verstärkt. Anschließend kühlten die Präparate 20 Minuten bei Raumtemperatur ab. Zum Schluss wurden die Schnitte 2x 5 Minuten mit TRIS Puffer (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)

gespült um den für die immunhistochemische Färbung optimalen pH von 7,5 wieder einzustellen.

2.2.4 Blockierung der endogenen Peroxidase

Die im Gewebe physiologisch vorkommende endogene Peroxidase muss, um eine spätere übermäßige Hintergrundfärbung durch das Horsradish Enzym zu verhindern (siehe 2.1.1. CCL22 Färbung mit der ABC Methode), mittels Wasserstoffperoxid blockiert werden. Hierzu wurden die Schnitte 10 Minuten lang in einer 7,5% wässrigen Wasserstoffperoxidlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie weitere 10 Minuten fließend gewässert, um das Wasserstoffperoxid restlos auszuwaschen. Durch 2x5 minütige Spülung mit TRIS Puffer wurde abschließend der pH wieder auf 7,5 eingestellt.

2.2.5 Immunhistochemische Färbung von CCL22

Zuerst wurde die immunhistochemische Färbung des Chemokins CCL22 vorgenommen. Hierzu wurde das ABC- Elite-Kit von Vector Laboratories verwendet. Die Arbeitslösungen wurden entsprechend den von Vector Laboratories empfohlenen Rezepten angefertigt. Mittels 20 minütiger Inkubation der Schnitte mit dem equinen Blocking Serum, wurden zuerst unspezifische Proteinbindungen aufgesättigt. Das Serum wurde dann einzeln, händisch vom Objektträger abgeklopft und Restbestände abgewischt. Anschließend wurde 100µl des polyklonale Primärantikörper vom Kaninchen in einer Verdünnung von 1:350 für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schnittpräparate aufgetragen. Nach abschließender Spülung mit TRIS Puffer für 2x5 Minuten, folgte die 30 minütige Inkubation mit dem biotiniertem equinen Sekundärantikörper. Eine weitere Spülung mit TRIS Puffer folgte vor der Applikation des Avidin Komplexes. Nach 30 Minuten Inkubation in der feuchten Kammer und einer letzten Spülung mit TRIS Puffer wurde das Chromogen DAB (Diaminobenzidin) von Dako hinzugefügt. Nach 3 Minuten wurde das Chromogen durch 10 minütiges fließendes wässern restlos entfernt.

2.2.6 Immunhistochemische Färbung von FOXP3

Der pH wurde durch TRIS Spülung zunächst wieder auf 7,5 eingestellt. Anschließend folgte die Blockierung von unspezifischen Proteinbindungen mittels des synthetischen Protein Blockers von Dako für 10 Minuten in der feuchten Kammer. Wieder wurde der Überstand abgeklopft und der Überstand von den Objektträgern vorsichtig abgewischt, bevor der monoklonale Primärantikörper

anti-FoxP3 in der Verdünnung 1:180 aufgetragen wurde. Nach 60 Minuten bei Inkubationszeit, bei Raumtemperatur, wurden die Präparate mit TRIS Pufferlösung gespült. Als zweites System wurde nun MACH-3 Mouse AP Polymer Detection von Biocare Medical Systems verwendet. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Als Chromogen wurde Real Red, entnommen aus Real Detection System APAAP, von Dako eingesetzt, mit dem die Präparate 10 Minuten lang gefärbt wurden. Anschließend wurde wiederum 10 Minuten lang fließend gewässert.

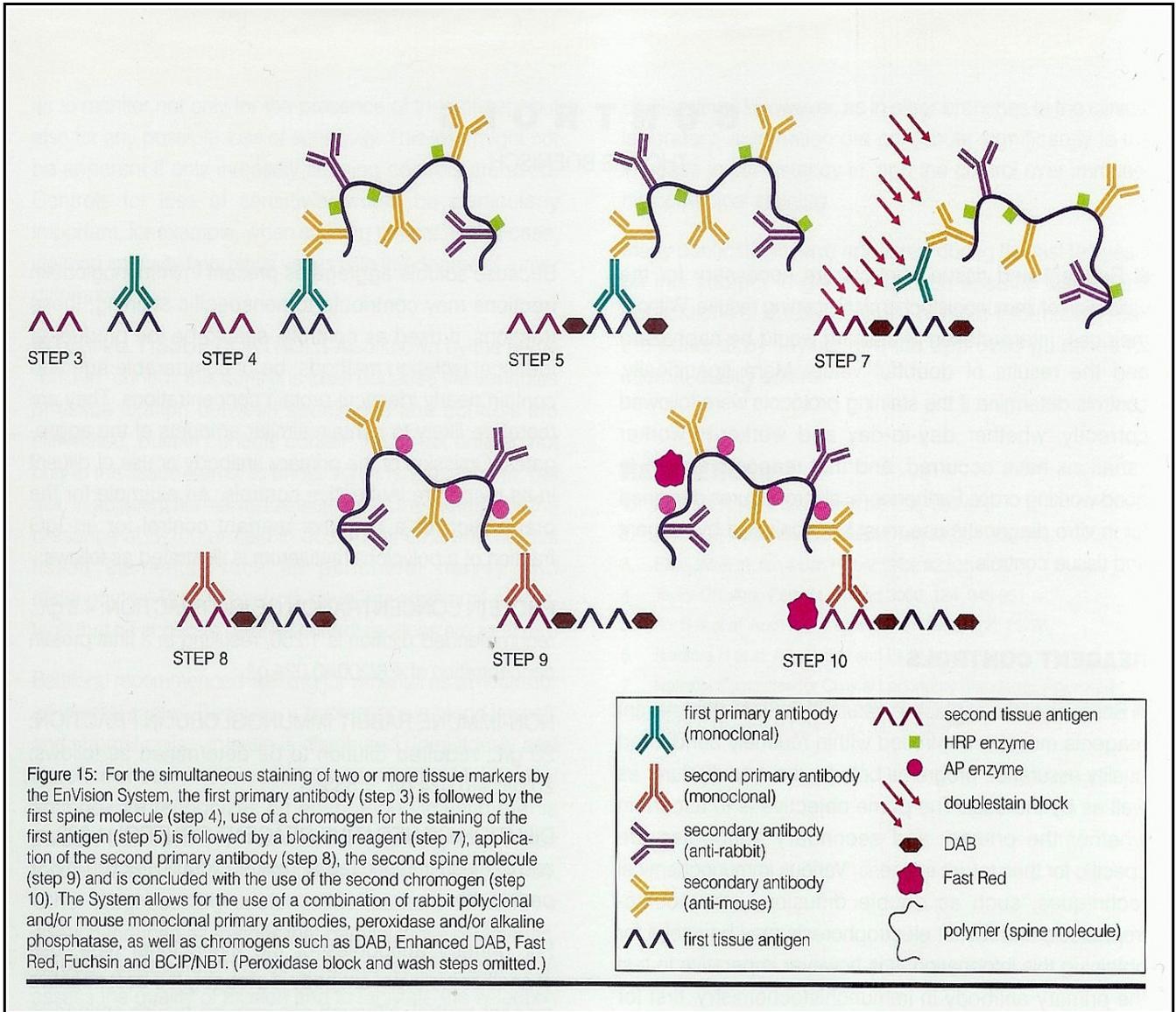
2.2.7 Gegenfärbung mit Hematoxylin

Die Gegenfärbung der Präparate erfolgte nach der Hematoxylin Gill's Formula von Vector für 10 Sekunden.

2.2.8 Eindecken der Schnitte

Als letzten Schritt wurden die Präparate mit Kaisers Glyceringelatine von Merck eingedeckt.

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer immunhistochemischen Doppelfärbung [66] :



2.3 Versuchsprotokoll Einzelfärbung CD8

Die Einzelfärbung der Schnittpräparate für CD8 erfolgte maschinell durch die Ventana XT ultraView DAB v3, BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul. Die einzelnen Schritte werden aus dem Grund hier stark zusammengefasst dargestellt werden.

2.3.1 Entparaffinierung

Erfolgte gemäß dem Ventana Entparaffinierungsprotokoll. Dabei wurden die Schnitte zunächst 4 Minuten lang bis 75°C und anschließend 4 Minuten lang bis 76°C erhitzt.

2.3.2 Vorbehandlung

Die Schnittpräparate wurden mit dem von Ventana bereitgestellten Cell Conditioner 1 (CC1) pH 8,4 zunächst bei 95°C 8 Minuten lang und dann bei 100°C nochmals für 4 Minuten gekocht. Anschließend folgte die 60 minütige Behandlung mit dem mild Cell Conditioner von Ventana. Zusätzlich dazu wurden die Präparate für 4 Minuten bei 37°C mit dem Ventana Inhibitor inkubiert.

2.3.3 Immunhistochemische Färbung CD8

Händisch wurde der Primäre Monoklonale Mouse Antikörper von LAD Vision auf die Schnittpräparate aufgetragen und anschließend für 24 Minuten inkubiert. Die Applikation des Sekundärantikörpers, sowie die HRP (Horseradish Peroxidase) abhängige Umsetzung des Chromogens DAB, erfolgt wiederum maschinell. Hierbei wurde ebenfalls ein Tropfen Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu jedem Schnitt hinzugegeben. Gefärbt wurde anschließend 8 Minuten lang. Unspezifische Hintergrundfärbung wird durch Applikation des ultra Wash Systems von Ventana auf ein Minimum reduziert.

2.3.4 Gegenfärbung mit Hematoxylin

Die Gegenfärbung mit Hematoxylin für 4 Minuten, sowie die Nach-Gegenfärbung mit Bluing Reagenz, wurde abschließend ebenfalls maschinell durchgeführt.

2.3.5 *Eindecken der Schnitte*

Gemäß der für CCL22 und FoxP3 bereits beschriebenen Methode.

2.4 Auswertung

Um einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CD8+ T-Lymphozyten, FoxP3+ Treg-Zellen und dem Chemokin CCL22 mit der Prognose einer Patientin herstellen zu können, wurden die einzelnen Zelltypen unabhängig von einander manuell ausgezählt. Da es für die Bewertung der Zellpopulationen beim immunhistochemischen Präparat dieser Färbung noch kein etabliertes Scoring System gibt, wurde im Rahmen dieser Untersuchung ein eigenes, semiquantitatives System entwickelt, um eine bestmögliche Standardisierung der Auszählung zu gewährleisten. Die Auswertung der Schnitte erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher an einem Axioskop 20 Lichtmikroskop der Firma Zeiss. Hierbei wurde zunächst eine Kohorte von 120 Schnitten hinsichtlich der FoxP3/CCL22 Färbung untersucht. In 100 Gesichtsfeldern wurden bei diesen 120 Präparaten die absoluten Zellzahlen ausgezählt und die Ergebnisse entsprechend der absolut gezählten Werte in vier Kategorien eingeteilt. Die hierfür gewählten Kategorien werden in Tabelle 9 und 10 zusammengefasst:

Tabelle 9: Quantifizierung der FoxP3+ Zellen anhand absoluter Zahlen:

Score	Anzahl
1	0-250 Zellen in 100 Gesichtsfeldern nachweisbar
2	251-500 Zellen in 100 Gesichtsfeldern nachweisbar
3	501-1000 Zellen in 100 Gesichtsfeldern nachweisbar
4	>1001 Zellen in 100 Gesichtsfeldern nachweisbar

Tabelle 10: Quantifizierung der CCL22+ Zellen anhand absoluter Zahlen:

Score	Anzahl
1	0-50 Zellen in 100 Gesichtsfeldern nachweisbar
2	51-100 Zellen in 100 Gesichtsfeldern nachweisbar
3	101-200 Zellen in 100 Gesichtsfeldern nachweisbar
4	>200 Zellen in 100 Gesichtsfeldern nachweisbar

Im Zuge der ausführlichen Zellzählung konnte ein vereinfachtes Auswertungsverfahren entwickelt werden, das auf der Auszählung von 35-40 Gesichtsfeldern basiert. Die hierbei erlangten Durchschnittswerte entsprachen den Kategorien der absoluten Zellzahlen hinreichend um die Ergebnisse beider unterschiedlicher Methoden zusammenzutragen und gleichwertig auswerten zu können. Alle weiteren FoxP3/CCL22 gefärbten Schnittpräparate, sowie alle CD8 Färbungen wurden dementsprechend semiquantitativ ausgewertet.

2.4.1 Anzahl der Zellen

Einen Überblick über die individuellen Scores der einzelnen Zelle bieten Tabellen 11-13:

Tabelle 11: Quantifizierung der Fox P3+ Zellen anhand semiquantitativer Auswertung

Score	Anzahl
1	Wenig Zellen nachweisbar; durchschnittlich <5 Zellen pro Gesichtsfeld
2	Mäßig viele Zellen nachweisbar; durchschnittlich zwischen 5 und 14 Zellen pro Gesichtsfeld nachweisbar
3	Viele Zellen nachweisbar; durchschnittlich zwischen 15 und 25 Zellen pro Gesichtsfeld nachweisbar
4	Sehr viele Zellen nachweisbar; durchschnittlich >25 Zellen pro Gesichtsfeld nachweisbar

Tabelle 12: Quantifizierung der CCL22+ Präparate anhand semiquantitativer Auswertung

Score	Anzahl
1	Wenig Zellen nachweisbar; durchschnittlich <3 Zellen pro Gesichtsfeld
2	Mäßig viele Zellen nachweisbar; durchschnittlich zwischen 3 und 5 Zellen pro Gesichtsfeld nachweisbar
3	Viele Zellen nachweisbar; durchschnittlich zwischen 6 und 8 Zellen pro Gesichtsfeld nachweisbar
4	Sehr viele Zellen nachweisbar; durchschnittlich >8 Zellen pro Gesichtsfeld nachweisbar

Tabelle 13: Quantifizierung der CD8+ Zellen anhand semiquantitativer Auswertung

Score	Anzahl
1	Wenig Zellen nachweisbar; durchschnittlich <5 Zellen pro Gesichtsfeld
2	Mäßig viele Zellen nachweisbar; durchschnittlich zwischen 5 und 14 Zellen pro Gesichtsfeld nachweisbar
3	Viele Zellen nachweisbar; durchschnittlich zwischen 15 und 25 Zellen pro Gesichtsfeld nachweisbar
4	Sehr viele Zellen nachweisbar; durchschnittlich >25 Zellen pro Gesichtsfeld nachweisbar

2.4.2 Verteilungsmuster

Die Verteilung der Zellen im Präparat wurde ebenfalls untersucht. Eine gleichmäßige oder bevorzugt zentrale Verteilung der Zellen im gesamten Präparat den „Score 0“ und das vermehrte Vorkommen eines Zelltyps am Rande des Tumors den „Score 2.“ Tabelle 14-16 gibt einen Überblick über die für das Verteilungsmuster verwendeten Scoring Systeme:

Tabelle 14: Verteilungsmuster der FoxP3+ Zellen

Score	Verteilung
0	Verteilung der FoxP3+ Zellen ist gleichmäßig im Präparat
2	Verteilung der FoxP3+ Zellen ist peripher gehäuft

Tabelle 15: Verteilungsmuster der CCL22+ Zellen

Score	Verteilung
0	Verteilung der CCL22+ Zellen ist gleichmäßig im Präparat
2	Verteilung der CCL22+ Zellen ist peripher gehäuft

Tabelle 16: Verteilungsmuster der CD8+ Zellen

Score	Verteilung
0	Verteilung der CD8+ Zellen ist gleichmäßig im Präparat
2	Verteilung der CD8+ Zellen ist peripher gehäuft

2.4.3 Tumorinfiltration

Von zahlreichen Publikationen ist die genaue Lokalisation von CD8+ T-Lymphozyten, von FoxP3+Treg- Zellen, sowie deren Verhältnis zu einander im Tumorgewebe untersucht worden. Die Infiltration des Tumors durch die einzelnen Zellen scheint von herausragender Bedeutung für die Prognose der Patientin zu sein. Aus diesem Grund wurde bei der Beurteilung der Präparate auf dieses Merkmal besonderes Augenmerk gelegt und ein individueller Score erhoben. Eine Tumorinfiltration lag definitionsgemäß in den Fällen vor, in denen die Zelle von mindestens 3 Tumorzellen umgeben war.

Tabelle 17: Tumorinfiltration der FoxP3+ Zellen in das Tumorgewebe

Score	Tumorinfiltration
0	FoxP3+ Zellen infiltrieren nicht in das Tumorgewebe
1	FoxP3+ Zellen infiltrieren in das Tumorgewebe

Tabelle 18: Tumorinfiltration der CCL22+ Zellen in das Tumorgewebe

Score	Tumorinfiltration
0	CCL22+ Zellen infiltrieren nicht in das Tumorgewebe
1	CCL22+ Zellen infiltrieren in das Tumorgewebe

Tabelle 19: Tumorinfiltration der CD8+ Zellen in das Tumorgewebe

Score	Tumorinfiltration
0	CD8+ Zellen infiltrieren nicht in das Tumorgewebe
1	CD8+ Zellen infiltrieren in das Tumorgewebe

2.5 Sonstiges

Nach wie vor ist umstritten, welche Zellen in der Lage sind FoxP3 zu exprimieren und ob durch Aktivierung einer Zelle die Expression dieses Transkriptionsfaktors ausgelöst werden kann. Von einigen Autoren wurde die Expression von FoxP3 auf Tumorzellen beschrieben. Bei den hier untersuchten Präparaten wurde aus diesem Grund dieser Fragestellung besonderes Augenmerk

gewidmet. Zusätzlich dazu ist auch bislang weitgehend unklar mittels welcher Zellen das Chemokin CCL22 synthetisiert wird. Aus diesem Grund wurden die Präparate separat mittels digitaler Bildverarbeitung daraufhin untersucht, welche Zellentypen auf die immunhistochemische Färbung reagiert haben und ob es zu einer Anfärbung von Tumorzellen gekommen ist. Zur Anpassung von Farbe und Kontrasten wurde das Bildverarbeitungsprogramm Adobe Photoshop verwendet. Digitale Bilder wurden in 20facher, 40facher und 63facher Vergrößerung angefertigt (Axiovert Inverse Microscope, Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.6 Statistische Auswertung

Dokumentation und statistische Auswertung erfolgten durch die Superior Performance Software Systems Statistics Software Version 18 (SPSS for Windows).

Ergebnisse

1 Deskriptive Statistik

In nahezu allen untersuchten Präparaten ließen sich sowohl CD8+ T-Zellen als auch FoxP3+ und CCL22+ Zellen nachweisen. Die Präparate unterschieden sich jedoch, sowohl hinsichtlich der Anzahl eines Zelltyps, als auch hinsichtlich des typischen Verteilungsmusters, erheblich. Tabellen 20-22 geben einen quantitativen Überblick über die Ergebnisse, Abbildungen 2-3 sind Beispiele charakteristischer Funde hinsichtlich der Anzahl, Verteilung und Tumordinfiltration der untersuchten Zellen.

1.1 Anzahl der Zellen

1.1.1 Anzahl CD8+ T-Zellen

Die Anzahl der CD8+ Zellen schwankte zwischen fünf und 25 positiven Zellen pro Gesichtsfeld. Nur in acht Fällen überstieg die Anzahl die durchschnittliche Anzahl von 25 Zellen.

Tabelle 20: Anzahl der CD8+ Zellen

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0-5 CD8 positive Zellen	54	25,7	26,0	26,0
	5-15 CD8 positive Zellen	78	37,1	37,5	63,5
	15-25 CD8 positive Zellen	68	32,4	32,7	96,2
	>25 CD8 positive Zellen	8	3,8	3,8	100,0
	Gesamt	208	99,0	100,0	
Fehlend	Präparat nicht auswertbar	2	1,0		
	Gesamt	210	100,0		

1.1.2 Anzahl FoxP3+ Zellen

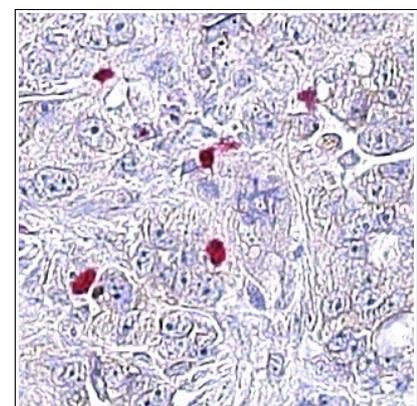
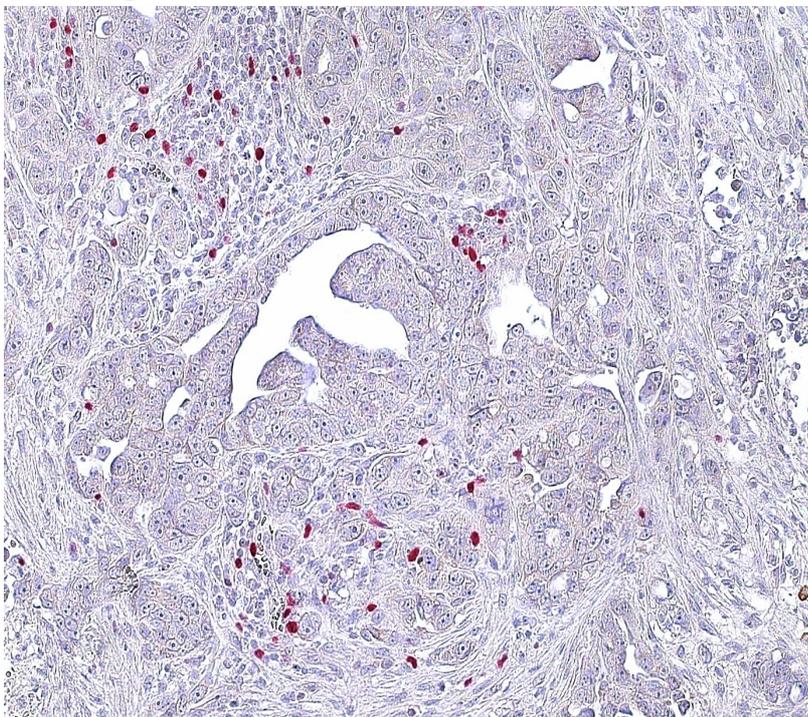
Bei den FoxP3+ Zellen zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster hinsichtlich der Anzahl der Zellen pro Gesichtsfeld wie bei den CD8+ T-Lymphozyten. Immerhin 27 Präparate verzeichneten jedoch mehr als 25 Zellen pro Gesichtsfeld, eine vergleichsweise hohe Anzahl. Abbildung A und B zeigen die charakteristischen dunkelroten Zellen in 40facher Vergrößerung.

Tabelle 21: Anzahl der FoxP3+ Zellen

		Anzahl FoxP3+ Zellen			
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0-5 FoxP3 positive Zellen	65	31,0	32,3	32,3
	5-15 FoxP3 positive Zellen	50	23,8	24,9	57,2
	15-25 FoxP3 positive Zellen	59	28,1	29,4	86,6
	>25 FoxP3 positive Zellen	27	12,9	13,4	100,0
	Gesamt	201	95,7	100,0	
Fehlend	nicht auswertbar	9	4,3		
Gesamt		210	100,0		

Abbildung 2 A

B



A. FoxP3+ Zellen im Präparat (40fach) (# 45)

B. Ausschnitt aus A

1.1.3 Anzahl CCL22+ Zellen

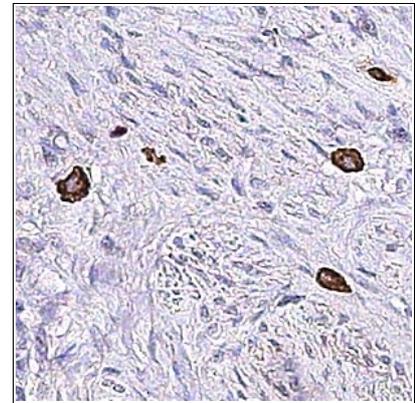
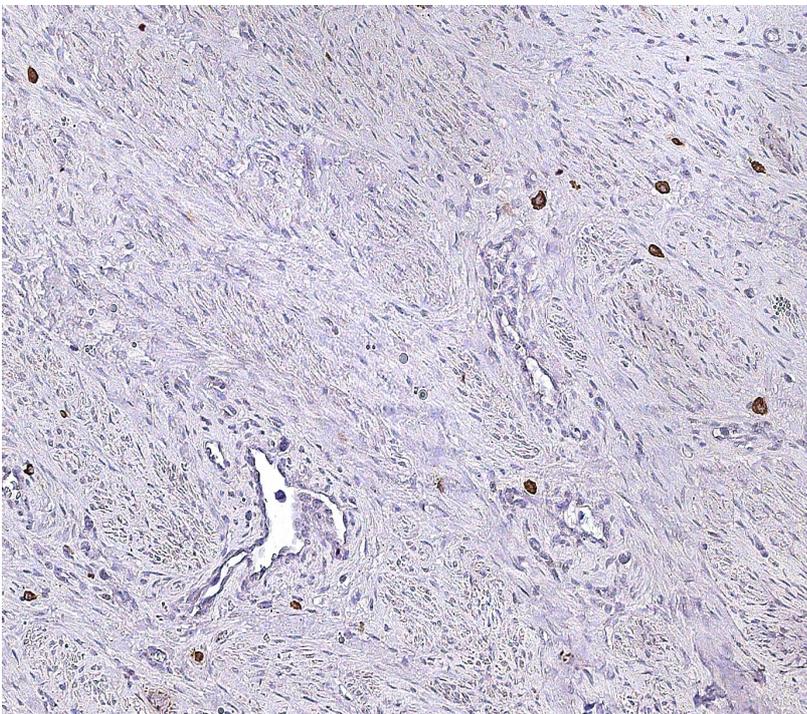
CCL22 positive Zellen sind deutlich seltener aufgetreten. Der überwiegende Anteil, 57% aller Präparate, verzeichnete durchschnittlich keine bis zwei Zellen pro Bildausschnitt. Hierbei fanden sich in nahezu allen Präparaten einige wenige Zellen, im Durchschnitt jedoch war der Anteil der CCL22 positiven Zellen eher gering. Besonders auffällig waren dementsprechend die 12 Präparate, in denen durchschnittlich mehr als 8 CCL22+ Zellen vorzufinden waren.

Tabelle 22: Anzahl CCL22+ Zellen

		Anzahl der CCL22+ Zellen			
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0-2 CCL22 positive Zellen	114	54,3	57,0	57,0
	3-5 CCL22 positive Zellen	44	21,0	22,0	79,0
	6-8 CCL22 positive Zellen	30	14,3	15,0	94,0
	>8 CCL22 positive Zellen	12	5,7	6,0	100,0
	Gesamt	200	95,2	100,0	
Fehlend	nicht auswertbar	10	4,8		
Gesamt		210	100,0		

Abbildung 3A

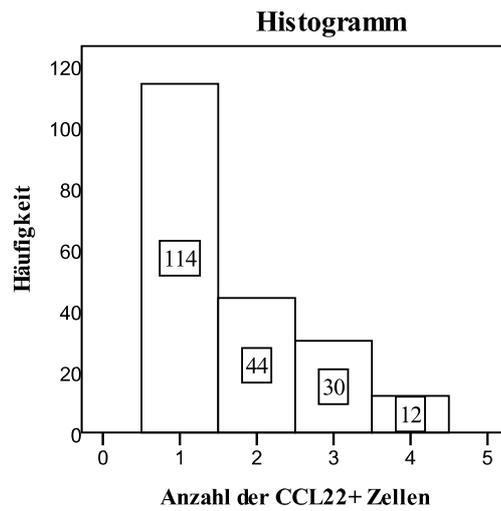
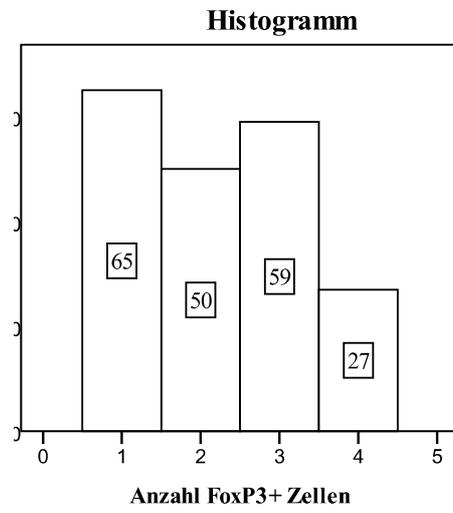
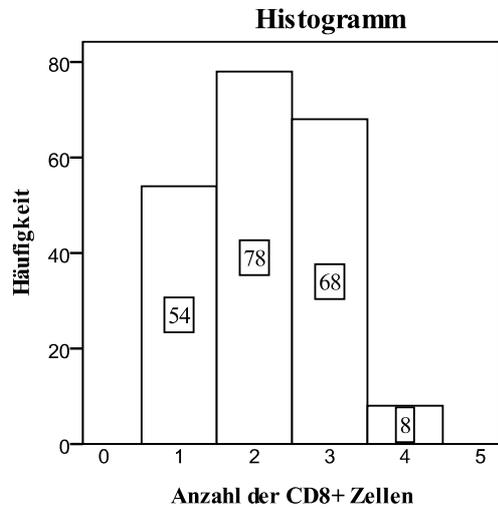
B



A. CCL22+ Zellen (20fach) (#174)

B. Ausschnitt aus A

Histogramme der Anzahlen der CD8+, FoxP3+ und CCL22+ Zellen:



1.2 Verteilungsmuster der Zellen

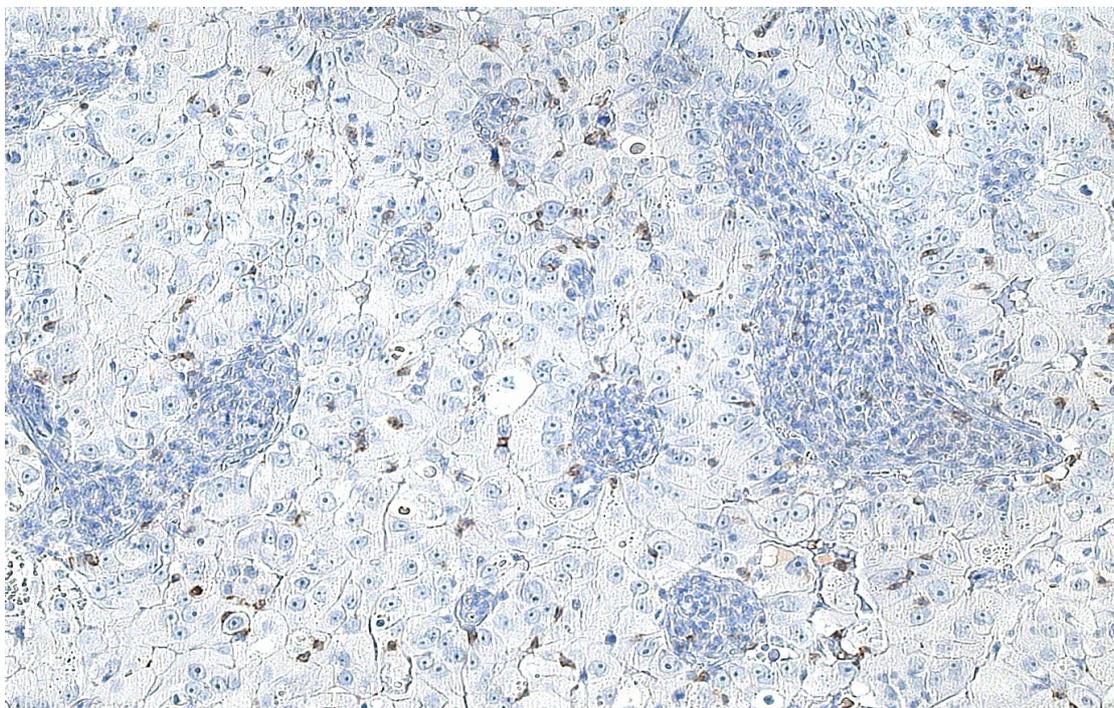
1.2.1 Verteilungsmuster der CD8+ T-Zellen

Die CD8+ T-Zellen waren hinsichtlich ihres Verteilungsmusters im Präparat relativ gleichmäßig verteilt auf die Gruppen „vermehrt peripher verteilt“ und „gleichmäßig bzw. vermehrt zentral gelegen“.

Tabelle 23: Verteilungsmuster CD8+Zellen

Verteilung der CD8+ Zellen					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	zentral>=peripher	96	45,7	46,2	46,2
	zentral<peripher	112	53,3	53,8	100,0
	Gesamt	208	99,0	100,0	
Fehlend	nicht auswertbar	2	1,0		
Gesamt		210	100,0		

Abbildung 4A



A. CD8+ T-Lymphozyten mit gleichmäßiger Verteilung (20fach) (# 29c)

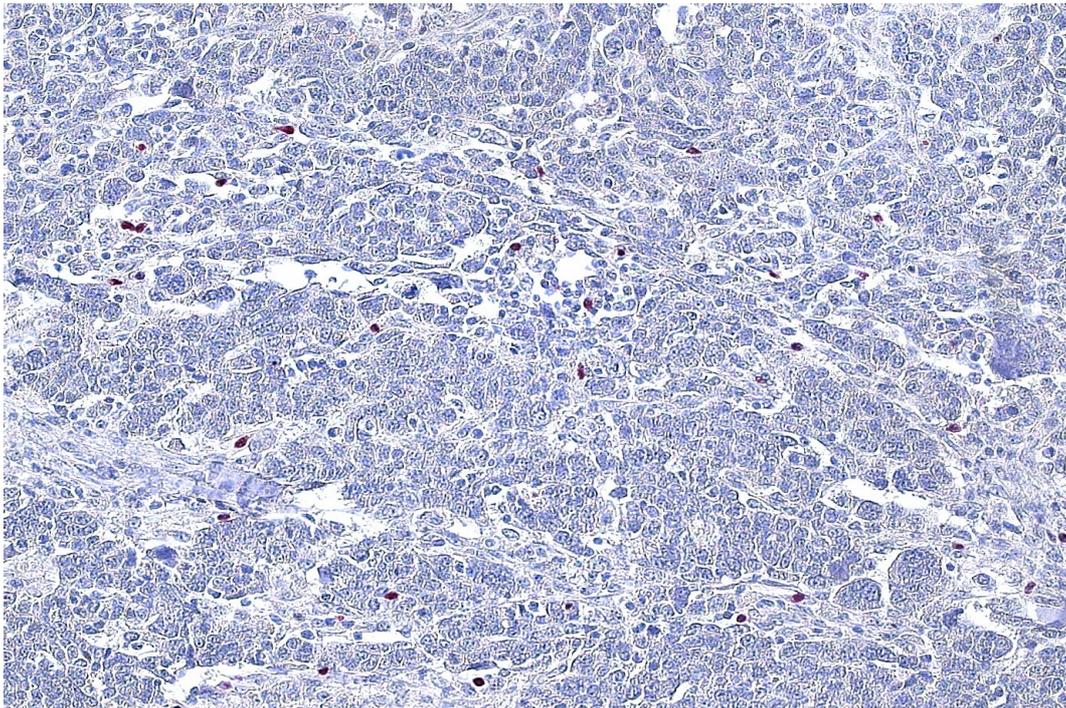
1.2.2 Verteilungsmuster der FoxP3+ Zellen

Bei den FoxP3+ Zellen fanden sich vermehrt homogene Zellverteilungen über das gesamte Präparat verteilt. Seltener sammelten sich die FoxP3+ Zellen lediglich im Stroma am Rand des Präparates.

Tabelle 24: Verteilungsmuster FoxP3+ Zellen

Verteilung FoxP3+ Zellen					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	zentral>=peripher	57	27,1	63,3	63,3
	zentral<peripher	33	15,7	36,7	100,0
	Gesamt	90	42,9	100,0	
Fehlend	nicht auswertbar	120	57,1		
Gesamt		210	100,0		

Abbildung 5A



A. FoxP3+ Zellen gleichmäßig verteilt im Präparat (20fach) (#190)

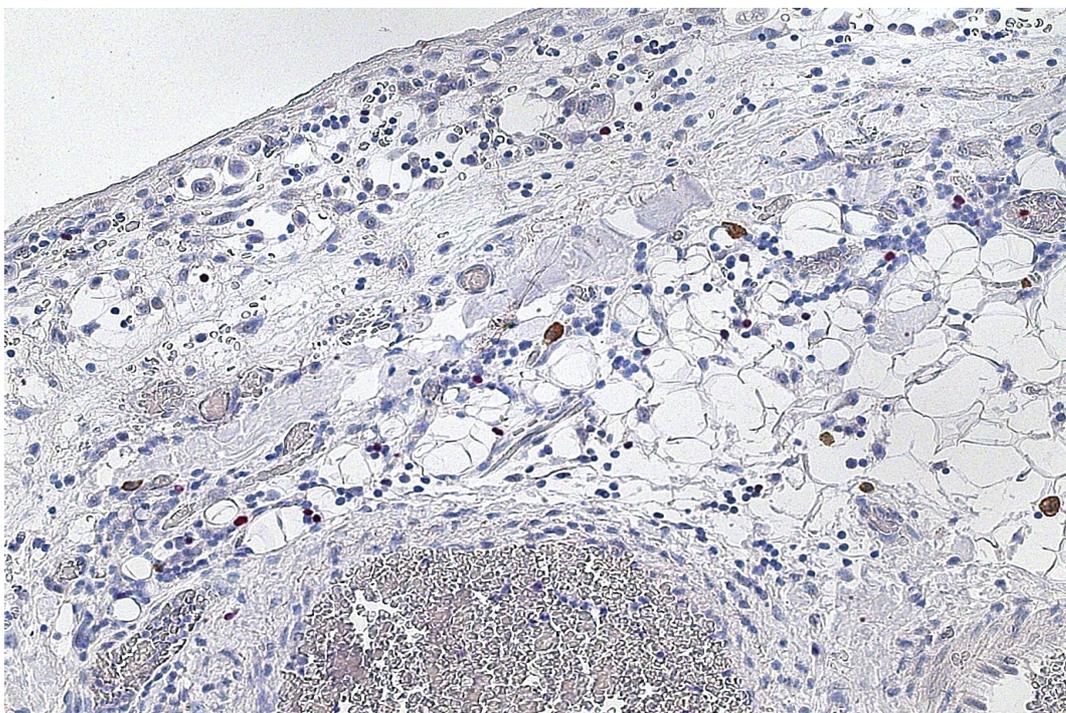
1.2.3 Verteilungsmuster der CCL22+ Zellen

Bei den CCL22+ Zellen zeigte sich eine deutlich häufigere Ansammlung der Zellen im den Tumor umgebenden peripheren Stroma. Seltener ließen sich diese Zellen auch homogen verteilt nachweisen. In keinem Fall kann man von einer überwiegend zentralen Lage der Zellen sprechen.

Tabelle 25: Verteilungsmuster CCL22+Zellen

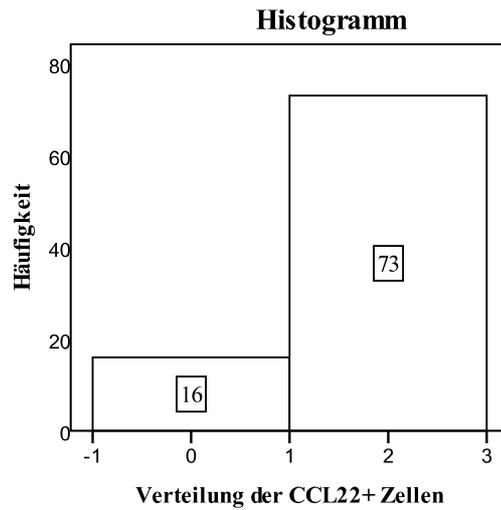
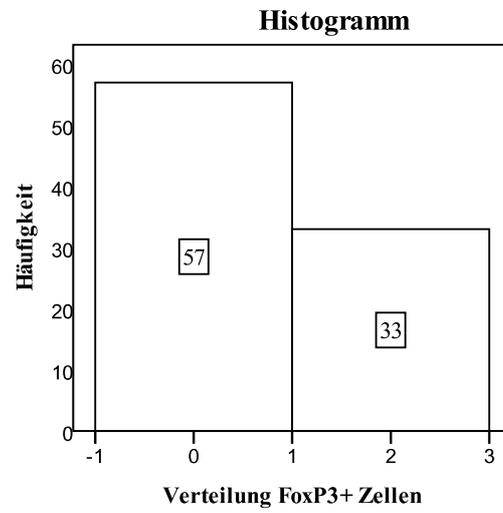
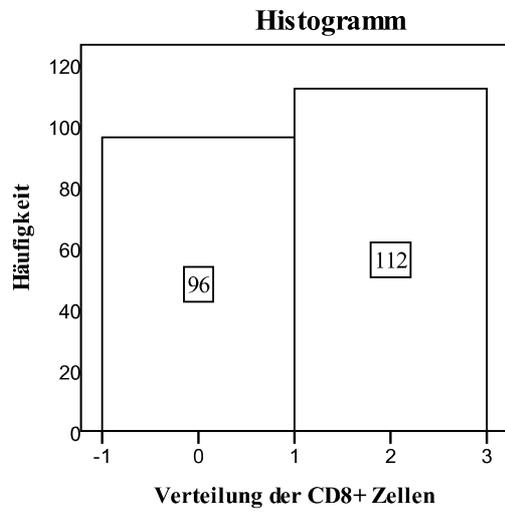
Verteilung der CCL22+ Zellen					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	zentral>=peripher	16	7,6	18,0	18,0
	zentral<peripher	73	34,8	82,0	100,0
	Gesamt	89	42,4	100,0	
Fehlend	nicht auswertbar	121	57,6		
Gesamt		210	100,0		

Abbildung 6A



A. CCL22+ Zellen im peripheren Stroma (20fach) (# 294)

Histogramme der Verteilungsmuster der CD8+, FoxP3+ und CCL22+ Zellen



1.3 Tumorinfiltration der Zellen

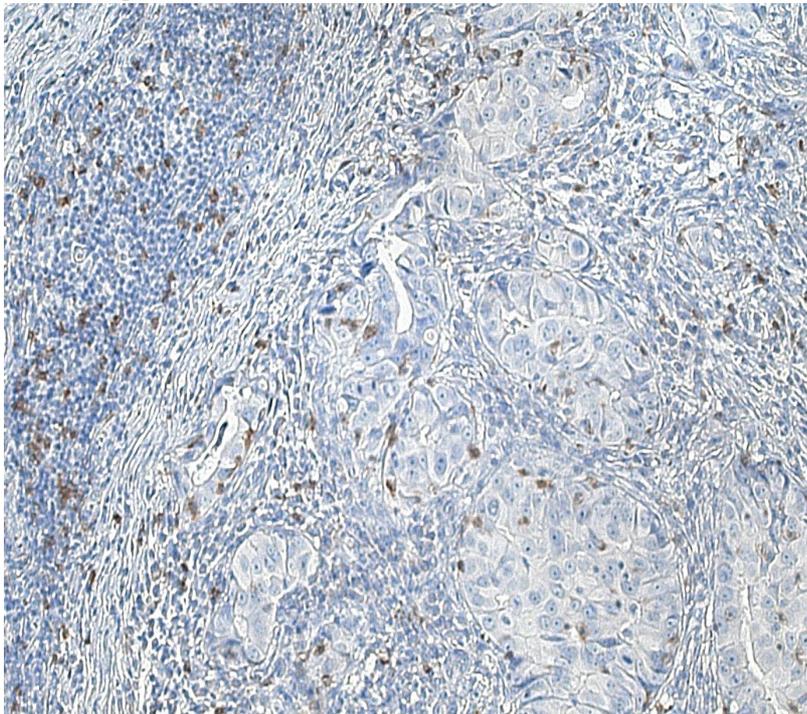
1.3.1 Tumorinfiltration durch CD8+ T-Zellen

In der überwiegenden Anzahl der Präparate ließen sich CD8+ T-Zellen innerhalb des Tumorgewebes nachweisen. Bei immerhin 39,9% der Fälle waren die Zellen jedoch strikt außerhalb des eigentlichen Tumorgewebes gelegen.

Tabelle 26: Tumorinfiltration CD8+Zellen

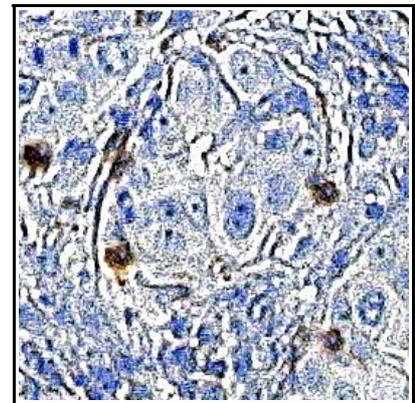
Infiltration der CD8+ Zellen in das Tumorgewebe					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	keine Tumorinfiltration	83	39,5	39,9	39,9
	Tumorinfiltration	125	59,5	60,1	100,0
Gesamt		208	99,0	100,0	
Fehlend	Präparat nicht auswertbar	2	1,0		
Gesamt		210	100,0		

Abbildung 7A



A. Infiltration von CD8+ T-Zellen ins Tumorgewebe (20fach) (#29)

B



B. Ausschnitt von A

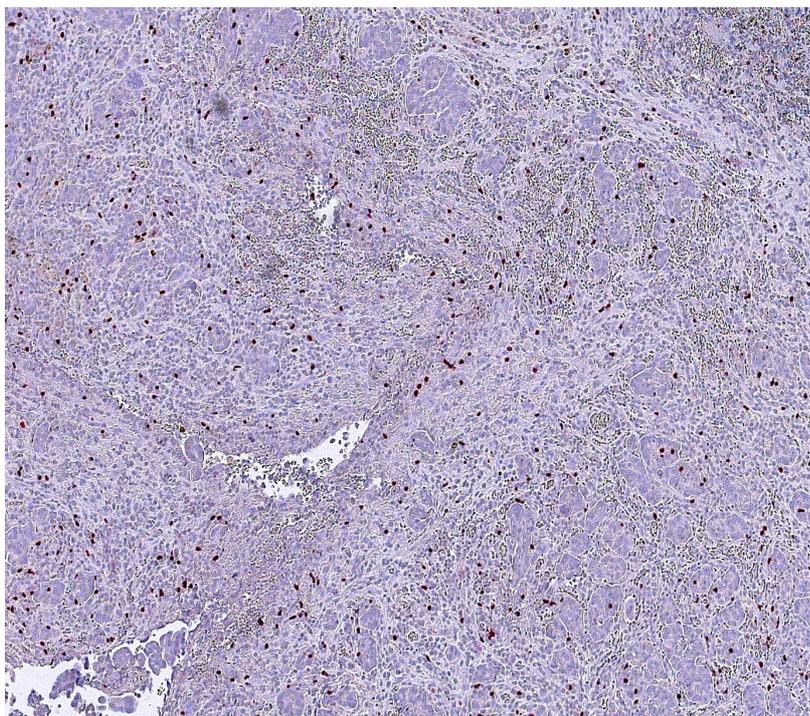
1.3.2 Tumordinfiltration durch FoxP3+ Zellen

Ein völlig anderes Verteilungsmuster konnte bei den FoxP3+ Zellen beobachtet werden. Diese befanden sich in 94,4% der Fälle im Tumorgewebe selbst. In nur 5,6% der Präparate, 5 Präparate insgesamt, waren diese Zellen außerhalb des Tumors zu finden. Bei diesen Präparaten handelte es sich zudem ausschließlich um solche mit einer insgesamt sehr niedrigen Anzahl an FoxP3+ Zellen.

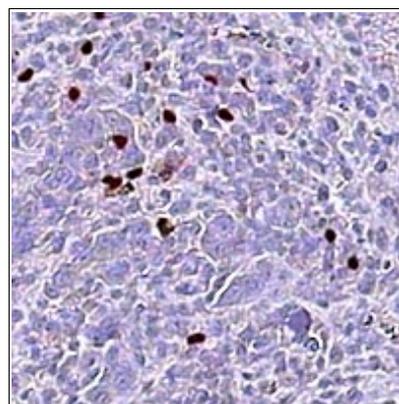
Tabelle 27: Tumordinfiltration FoxP3+ Zellen

Infiltration der FoxP3+ Zellen in das Tumorgewebe					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	keine Tumordinfiltration	5	2,4	5,6	5,6
	Tumordinfiltration	85	40,5	94,4	100,0
	Gesamt	90	42,9	100,0	
Fehlend	nicht auswertbar	120	57,1		
Gesamt		210	100,0		

Abbildung 8A



B



A. Infiltration von FoxP3+ Zellen ins Tumorgewebe in 20facher Vergrößerung (#66)

B. Ausschnitt aus A

1.3.3 Tumorinfiltration durch CCL22+ Zellen

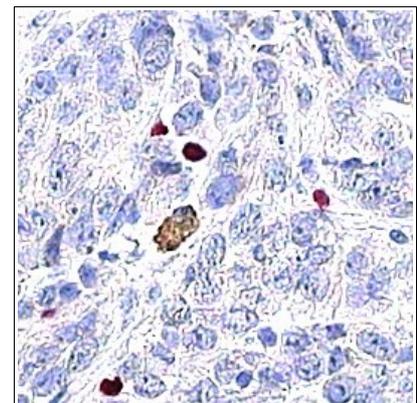
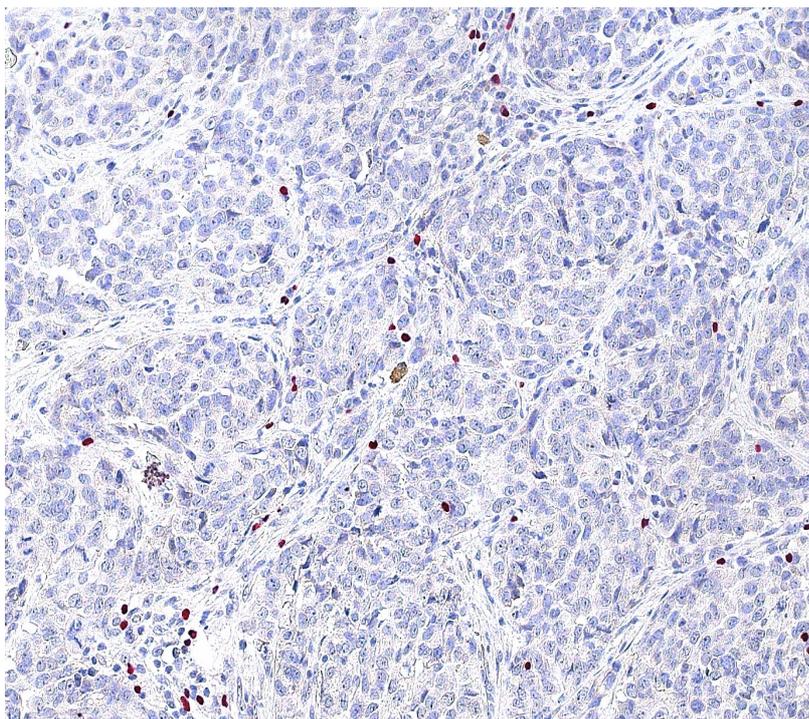
Auch im Fall der CCL22+ Zellen konnten in der Mehrzahl der Fälle (55 von 121) die Zellen innerhalb des Tumors nachgewiesen werden. Dies war jedoch häufig eine lokale Ansammlung im Randbereich des Tumors.

Tabelle 28: Tumorinfiltration CCL22+ Zellen

Infiltration der CCL22+ Zellen					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	keine Tumorinfiltration	34	16,2	38,2	38,2
	Tumorinfiltration	55	26,2	61,8	100,0
	Gesamt	89	42,4	100,0	
Fehlend	nicht auswertbar	121	57,6		
Gesamt		210	100,0		

Abbildung 9A

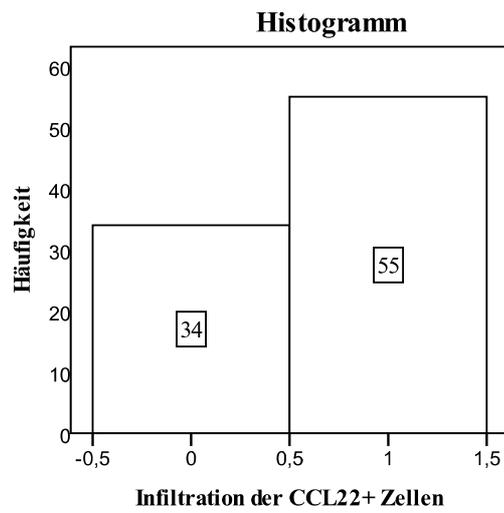
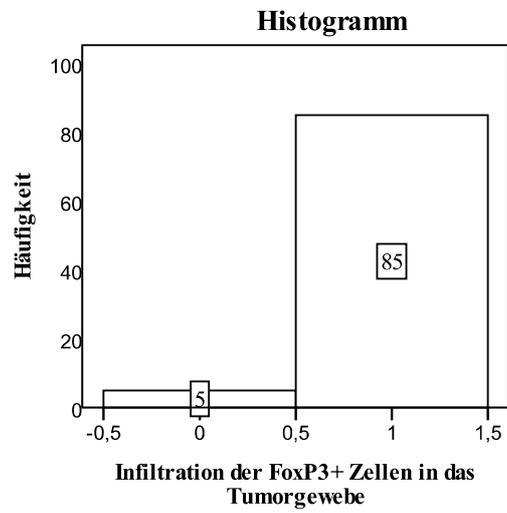
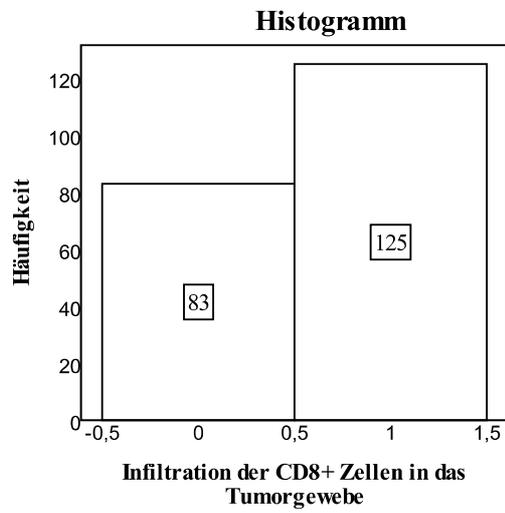
B



A Infiltration von CCL22+ Zellen ins Tumorgewebe in 20facher Vergrößerung

B Ausschnitt aus A

Histogramme zur Tumordinfiltration durch CD8+, FoxP3+ und CCL22+- Zellen



2 Korrelationen CD8+/FoxP3+/CCL22+ Parameter

2.1 CD8+ Zellen

2.1.1 CD8+Zellen: Anzahl

Tabelle 29 fasst die Korrelationen der verschiedenen Zellarten unter einander, sowie den Zusammenhang von CD8+ Zytotoxischen T-Zellen und FoxP3+ Zellen mit dem Nachweis des Chemokins CCL22 zusammen.

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl von CD8+ zytotoxischen Zellen und der Anzahl von FoxP3+ Zellen hergestellt werden (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,285; $p=0,000$; $n=199$). Demnach steigt die Anzahl der CD8+ T-Zellen mit der Anzahl an FoxP3+ Zellen. Auch der Zusammenhang zwischen erhöhter Anzahl an CD8+Zytotoxischen T-Zellen und der Infiltration der CD8+ T-Zellen in das Tumorgewebe war signifikant nachweisbar (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0.625; $p= 0,000$; $n=208$). Je höher die Anzahl an CD8+ T-Zellen demnach insgesamt ist, desto eher infiltrieren diese Zellen auch das Tumorgewebe. Dieser Zusammenhang wurde nochmals, ebenfalls signifikant, durch Testung des Verteilungsmusters untermauert (Korrelationskoeffizient nach Pearson -0,354; $p=0,000$; $n= 208$). Geringe Anzahlen von CD8+ T-Zellen korrelieren demnach mit peripherer Lage, hohe Anzahlen dieser Zellen mit gleichmäßig verteilter bzw. überwiegend zentraler Lage. Des weiteren konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Infiltration von CCL22 in das Tumorgewebe und der Anzahl von CD8+ T-Lymphozyten hergestellt werden (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,279; $p= 0,008$; $n= 89$).

2.1.2 CD8+ Zellen: Verteilung

Über den Zusammenhang zu den beiden weiteren Charakteristika der CD8+ Zellen, Anzahl und Infiltration hinaus (siehe hierzu 3.2.1.1.), konnte ein signifikanter Zusammenhang für die Verteilung der CD8 T- Zellen zur Anzahl der FoxP3+ Zellen nachgewiesen werden (Korrelationskoeffizient nach Pearson= -0,157; $p= 0.026$; $n= 199$). Demnach steigt die Anzahl von FoxP3+ Zellen bei überwiegend zentraler bzw. gleichmäßiger Verteilung von CD8+ T-Zellen an.

2.1.3 CD8+ Zellen: Infiltration

Wie bereits im Abschnitt 3.2.1.1. dargestellt wurde, stehen die Anzahl von CD8+ T-Zellen, deren zentrale Verteilung, sowie ihre Infiltration ins Tumorgewebe in einem signifikanten Zusammenhang zu einander. Darüber hinaus ließ sich jedoch zusätzlich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Infiltration von CD8+ T-Zellen ins Tumorgewebe mit der Anzahl von FoxP3+ Zellen (Korrelationskoeffizient nach Pearson= 0,208; p= 0,003; n=199), sowie deren Infiltration ins Tumorgewebe nachweisen (Korrelationskoeffizient nach Pearson= 0,282; p=0.007; n=90).

2.2 FoxP3+ Zellen

2.2.1 FoxP3+ Zellen: Anzahl

Auf die bereits beschriebenen signifikanten Zusammenhänge, zwischen der Anzahl der nachgewiesenen FoxP3+ Zellen und den Parametern Anzahl, Verteilung und Tumordinfiltration der CD8+ T-Zellen, wird an dieser Stelle nicht noch einmal eingegangen werden. Darüber hinaus ließ sich jedoch auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl von FoxP3+ Zellen und deren Infiltration ins Tumorgewebe nachweisen (Korrelationskoeffizient nach Pearson= 0,339; p= 0,001; n= 90). Je größer die Anzahl an FoxP3+ T-Zellen im Gewebe ist, desto häufiger penetrieren diese Zellen demnach auch das Tumorgewebe.

2.2.2 FoxP3+ Zellen: Verteilung

Hinsichtlich des Einflusses einer Verteilung der FoxP3+ Zellen auf CD8+ T-Zellen oder das Chemokin CCL22 ließ sich kein direkter Zusammenhang feststellen. Jedoch konnte ein signifikantes Ergebnis zwischen dem Verteilungsmuster von FoxP3+ Zellen und dem Verhältnis von CD8+ T-Zellen zu FoxP3+ Zellen hergestellt werden (Korrelationskoeffizient nach Pearson= 0,226; p= 0,032; n=90). Bei deutlich peripherem Verteilungsmuster der FoxP3+ Zellen überwiegen demnach quantitativ CD8+ T-Zellen die FoxP3+ Zellen. Anders formuliert kommt es bei relativ hoher Anzahl an CD8+ T-Zellen zu einer deutlichen peripheren Ansammlung von FoxP3+ Zellen im Präparat bei relativ geringeren CD8+ T-Zell Anzahlen finden sich FoxP3+ Zellen eher zentral im Präparat wieder.

2.2.3 FoxP3+ Zellen: Infiltration

Die Infiltration von FoxP3+ Zellen ins Tumorgewebe steht in signifikantem Zusammenhang zu der Infiltration der CD8+ T-Zellen (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,282; $p= 0,007$; $n=90$), sowie dem Nachweis von CCL22 im Tumorgewebe (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,210; $p= 0,048$; $n= 89$). Hohe Zahlen an CCL22 exprimierenden Zellen im Tumor stehen demnach klar in Verbindung zu steigender Penetration der FoxP3+ Zellen ins Tumorgewebe. Des Weiteren sinkt mit steigenden FoxP3+ Infiltrationsraten der CD8+:FoxP3+ Ratio (Korrelationskoeffizient nach Pearson= -0,232; $p= 0,028$; $n= 90$). Je höher die Anzahl an FoxP3+ Zellen im Verhältnis zu CD8+ T-Zellen ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass diese FoxP3+ Zellen auch das Tumorgewebe infiltrieren. Anders formuliert überwiegen die Zahlen an FoxP3+ Zellen die Anzahl an CD8+ T-Zellen, wenn diese ins Tumorgewebe vorgedrungen sind. Diese Beobachtung steht mit der im vorangestellten Abschnitt hergestellten Beziehung von CD8+ zu FoxP3+ Ratio und Verteilungsmuster der FoxP3+ Zellen im Einklang.

2.3 CCL22+ Zellen

2.3.1 CCL22+ Zellen: Anzahl

Das vermehrte Auftreten von CCL22 exprimierenden Zellen korreliert signifikant mit der Anzahl von CD8+ T- Zellen (Korrelationskoeffizient nach Pearson= 0,196; $p= 0,006$; $n=198$) und damit nur indirekt mit der Anzahl an FoxP3+ Zellen. Je höher die Anzahl der CCL22 exprimierenden Zellen ist, desto höher ist auch die Infiltration dieser Zellen in das Tumorgewebe (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,482; $p= 0,000$; $n=89$). Ebenfalls statistisch signifikant war der Zusammenhang zwischen der Anzahl an CCL22 exprimierenden Zellen mit dem Verhältnis von CD8+ T-Zellen zu FoxP3+ Zellen (Korrelationskoeffizient nach Pearson= 0,167; $p= 0,019$; $n= 198$).

2.3.2 CCL22+ Zellen: Verteilung

Das Verteilungsmuster der Zellen bei denen das Chemokin CCL22 nachgewiesen werden konnte, scheint keine Rolle auf das Vorkommen der anderen Zelltypen zu haben. Festhalten lässt sich jedoch nochmals, dass die weit überwiegende Anzahl dieser Zellen in der Peripherie vorzufinden war, häufig im peritumoralen Stroma nahe Lymph- und Blutgefäßen.

2.3.3 CCL22+ Zellen: Infiltration

Wie schon die Anzahl, so korreliert auch die Tumordinfiltration durch die CCL22 positiven Zellen signifikant mit der Anzahl an CD8+ T-Zellen (Korrelationskoeffizient nach Pearson= 0,279; $p= 0,008$; $n= 89$).

Tabelle 29: Korrelationsanalyse Übersicht

		Korrelationen								
		Anzahl der CD8+ Zellen	Verteilung der CD8+ Zellen	Infiltration der CD8+ Zellen in das Tumorgewebe	Anzahl FoxP3+ Zellen	Verteilung FoxP3+ Zellen	Infiltration der FoxP3+ Zellen in das Tumorgewebe	Anzahl der CCL22+ Zellen	Verteilung der CCL22+ Zellen	Infiltration der CCL22+ Zellen
Anzahl der CD8+ Zellen	Korrelation nach Pearson	1	-,354**	,625**	,285**	,066	,191	,196**	,000	,279**
	Signifikanz (2-seitig)		,000	,000	,000	,538	,071	,006	,997	,008
Verteilung der CD8+ Zellen	N	208	208	208	199	90	90	198	89	89
	Korrelation nach Pearson	-,354**	1	-,262**	-,157*	,052	-,140	-,061	-,043	-,205
	Signifikanz (2-seitig)	,000		,000	,026	,625	,188	,396	,691	,054
Infiltration der CD8+ Zellen in das Tumorgewebe	N	208	208	208	199	90	90	198	89	89
	Korrelation nach Pearson	,625**	-,262**	1	,208**	-,093	,282**	,089	,024	,140
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000		,003	,384	,007	,213	,825	,190
Anzahl FoxP3+ Zellen	N	208	208	208	199	90	90	198	89	89
	Korrelation nach Pearson	,285**	-,157*	,208**	1	-,123	,339**	,053	,059	,183
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,026	,003		,249	,001	,455	,586	,086
Verteilung FoxP3+ Zellen	N	199	199	199	201	90	90	200	89	89
	Korrelation nach Pearson	,066	,052	-,093	-,123	1	-,117	-,039	-,004	-,067
	Signifikanz (2-seitig)	,538	,625	,384	,249		,270	,716	,970	,535
	N	90	90	90	90	90	90	89	89	89

Korrelationen

		Anzahl der CD8+ Zellen	Verteilung der CD8+ Zellen	Infiltration der CD8+ Zellen in das Tumorgewebe	Anzahl FoxP3+ Zellen	Verteilung FoxP3+ Zellen	Infiltration der FoxP3+ Zellen in das Tumorgewebe	Anzahl der CCL22+ Zellen	Verteilung der CCL22+ Zellen	Infiltration der CCL22+ Zellen
Infiltration der FoxP3+ Zellen in das Tumorgewebe	Korrelation nach Pearson	,191	-,140	,282**	,339**	-,117	1	,059	,013	,210*
	Signifikanz (2-seitig)	,071	,188	,007	,001	,270		,583	,905	,048
	N	90	90	90	90	90	90	89	89	89
Anzahl der CCL22+ Zellen	Korrelation nach Pearson	,196**	-,061	,089	,053	-,039	,059	1	-,025	,482**
	Signifikanz (2-seitig)	,006	,396	,213	,455	,716	,583		,816	,000
	N	198	198	198	200	89	89	200	89	89
Verteilung der CCL22+ Zellen	Korrelation nach Pearson	,000	-,043	,024	,059	-,004	,013	-,025	1	-,187
	Signifikanz (2-seitig)	,997	,691	,825	,586	,970	,905	,816		,079
	N	89	89	89	89	89	89	89	89	89
Infiltration der CCL22+ Zellen	Korrelation nach Pearson	,279**	-,205	,140	,183	-,067	,210*	,482**	-,187	1
	Signifikanz (2-seitig)	,008	,054	,190	,086	,535	,048	,000	,079	
	N	89	89	89	89	89	89	89	89	89

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

2.4 Korrelation der FoxP3+ Zelle, CD8+T-Zellen und CCL22 Zellen mit Überlebenszeit
Tumorgrading und histologischem Subtyp

2.4.1 Korrelationsverhalten hinsichtlich der Anzahl

Einen ersten Überblick über mögliche Korrelation der Anzahl einer bestimmten Zellzahl auf gängige Prognosefaktoren ergibt sich aus der bivariaten Korrelationsanalyse. Auf einen möglichen Einfluss hin untersucht wurden hierbei die Faktoren: Alter, Grading, Histologie, OP-Radikalität, primäre Therapiemaßnahmen, Gesamtanzahl an Tumoren, sowie Anzahl an Erst- und Zweittumoren. Die signifikanten Ergebnisse werden in Tabelle 30 dargestellt.

Es zeigte sich, dass eine hohe Anzahl an FoxP3+ Zellen mit einem höheren Grading signifikant korreliert (Korrelationskoeffizient nach Pearson =0,205; p= 0,004; n=194).

Darüber hinaus war zu sehen, dass ein hoher CD8+:FoxP3+ Ratio signifikant mit einem niedrigeren Grading assoziiert werden kann (Korrelationskoeffizient nach Pearson= -0,228; p=0,001; n=192).

Tabelle 30: Korrelationen bekannter Prognosefaktoren

		Überlebenszeit t in Monaten	Grading	Histologie	Anzahl der CD8+ Zellen	Anzahl FoxP3+ Zellen	Anzahl der CCL22+ Zellen	CD8+ : FoxP3+
Überlebenszeit in Monaten	Korrelation nach Pearson	1	-,238**	,045	,051	,067	,107	-,027
	Signifikanz (2- seitig)		,001	,519	,463	,345	,132	,707
Grading	N	210	203	210	208	201	200	199
	Korrelation nach Pearson	-,238**	1	,044	-,066	,205**	-,119	-,228**
	Signifikanz (2- seitig)	,001		,537	,354	,004	,099	,001
Histologie	N	203	203	203	201	194	193	192
	Korrelation nach Pearson	,045	,044	1	-,011	,036	,025	-,066
	Signifikanz (2- seitig)	,519	,537		,873	,610	,723	,356
N		210	203	210	208	201	200	199

Tabelle 30: Korrelationen bekannter Prognosefaktoren

		Überlebenszeit t in Monaten	Grading	Histologie	Anzahl der CD8+ Zellen	Anzahl FoxP3+ Zellen	Anzahl der CCL22+ Zellen	CD8+ : FoxP3+
Anzahl der CD8+ Zellen	Korrelation nach Pearson	,051	-,066	-,011	1	,285**	,196**	,388**
	Signifikanz (2- seitig)	,463	,354	,873		,000	,006	,000
	N	208	201	208	208	199	198	199
Anzahl FoxP3+ Zellen	Korrelation nach Pearson	,067	,205**	,036	,285**	1	,053	-,661**
	Signifikanz (2- seitig)	,345	,004	,610	,000		,455	,000
	N	201	194	201	199	201	200	199
Anzahl der CCL22+ Zellen	Korrelation nach Pearson	,107	-,119	,025	,196**	,053	1	,110
	Signifikanz (2- seitig)	,132	,099	,723	,006	,455		,122
	N	200	193	200	198	200	200	198
CD8+ : FoxP3+	Korrelation nach Pearson	-,027	-,228**	-,066	,388**	-,661**	,110	1
	Signifikanz (2- seitig)	,707	,001	,356	,000	,000	,122	
N		199	192	199	199	199	198	199

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

**Anmerkung: Da die Aussagekraft der Korrelationsanalyse hinsichtlich der Überlebenszeit nur sehr eingeschränkt beurteilbar ist, erfolgt im Anschluss daran die ausführliche Überlebenszeitanalyse mittels des Cox- Proprtional Hazard Model und Kaplan-Meier Kurven. Die Korrelationsanalyse dient hierbei lediglich als explorativer Anhaltspunkt für mögliche Zusammenhänge.*

2.4.2 Korrelationsverhalten hinsichtlich Verteilungsmuster

Hinsichtlich des Verteilungsmusters der Zelltypen wurde zwischen einer vorwiegend im Stroma der Peripherie gelegenen Verteilung und einer gleichmäßigen Verteilung der Zellen im gesamten Präparat unterschieden. Diese Unterscheidung zeigt für FoxP3+ Zellen einen möglichen Zusammenhang zu dem in Monaten gemessenen Überleben der Patientinnen (Korrelationskoeffizient nach Pearson = - 0, 283; p= 0,007; n=90).

Eine weitere Signifikanz fand sich darüber hinaus für den möglichen Zusammenhang zwischen der CD8+ T-Zell Verteilung und dem Grading (Korrelationskoeffizient nach Pearson = 0,144; p= 0,041; n=201). Eine stark periphere Verteilung dieses Zelltyps würde demnach mit einem hohen Grading in Verbindung stehen. Eine eher zentrale Verteilung dieser Zellen demnach zu einem eher niedrigeren Grading.

Tabelle 31: Korrelationen bekannter Prognosefaktoren

		Überlebenszeit in Monaten	Grading	Histologie	Verteilung der CD8+ Zellen	Verteilung FoxP3+ Zellen	Verteilung der CCL22+ Zellen
Überlebenszeit in Monaten	Korrelation nach Pearson	1	-,238**	,045	-,093	-,283**	-,079
	Signifikanz (2-seitig)		,001	,519	,181	,007	,463
Grading	N	210	203	210	208	90	89
	Korrelation nach Pearson	-,238**	1	,044	,144*	-,093	,127
	Signifikanz (2-seitig)	,001		,537	,041	,396	,247
Histologie	N	203	203	203	201	86	85
	Korrelation nach Pearson	,045	,044	1	,027	-,013	-,074
	Signifikanz (2-seitig)	,519	,537		,697	,905	,489
Verteilung der CD8+ Zellen	N	210	203	210	208	90	89
	Korrelation nach Pearson	-,093	,144*	,027	1	,052	-,043
	Signifikanz (2-seitig)	,181	,041	,697		,625	,691
Verteilung FoxP3+ Zellen	N	208	201	208	208	90	89
	Korrelation nach Pearson	-,283**	-,093	-,013	,052	1	-,004
	Signifikanz (2-seitig)	,007	,396	,905	,625		,970
Verteilung der CCL22+ Zellen	N	90	86	90	90	90	89
	Korrelation nach Pearson	-,079	,127	-,074	-,043	-,004	1
	Signifikanz (2-seitig)	,463	,247	,489	,691	,970	
	N	89	85	89	89	89	89

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

* . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

2.4.3 Korrelationsverhalten hinsichtlich Tumordinfiltration

Die eigentliche Infiltration des Tumors durch CCL22+ Zellen steht in signifikantem Zusammenhang zum gemessenen Überleben in Monaten (Korrelationskoeffizient nach Pearson=0,287; p= 0,006; n=89).

Tabelle 32: Korrelationen bekannter Prognosefaktoren

		Überlebenszeit in Monaten	Grading	Histologie	Infiltration der CD8+ Zellen in das Tumorgewebe	Infiltration der CCL22+ Zellen	Infiltration der FoxP3+ Zellen in das Tumorgewebe
Überlebenszeit in Monaten	Korrelation nach Pearson	1	-,238**	,045	,064	,287**	,057
	Signifikanz (2-seitig)		,001	,519	,356	,006	,596
Grading	N	210	203	210	208	89	90
	Korrelation nach Pearson	-,238**	1	,044	-,012	-,191	,009
	Signifikanz (2-seitig)	,001		,537	,867	,079	,936
Histologie	N	203	203	203	201	85	86
	Korrelation nach Pearson	,045	,044	1	,046	,147	,045
	Signifikanz (2-seitig)	,519	,537		,506	,168	,672
Infiltration der CD8+ Zellen in das Tumorgewebe	N	210	203	210	208	89	90
	Korrelation nach Pearson	,064	-,012	,046	1	,140	,282**
	Signifikanz (2-seitig)	,356	,867	,506		,190	,007
Infiltration der CCL22+ Zellen	N	208	201	208	208	89	90
	Korrelation nach Pearson	,287**	-,191	,147	,140	1	,210*
	Signifikanz (2-seitig)	,006	,079	,168	,190		,048
Infiltration der FoxP3+ Zellen in das Tumorgewebe	N	89	85	89	89	89	89
	Korrelation nach Pearson	,057	,009	,045	,282**	,210*	1
	Signifikanz (2-seitig)	,596	,936	,672	,007	,048	
	N	90	86	90	90	89	90

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

2.5 Korrelationsverhalten anderer gängiger Prognosevariablen

Um den Einfluss bekannter Prognosefaktoren auf das Überleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom an diesem Patientinnenkollektiv abschätzen zu können, wurden diese zunächst hinsichtlich ihrer Korrelationen untersucht. Wie zu erwarten war, zeigte sich eine signifikante negative Korrelation des Gradings (Korrelationskoeffizient nach Pearson = $-0,238$; $p=0,001$; $n=203$), sowie des Alters bei Diagnosestellung (Korrelationskoeffizient nach Pearson = $-0,237$; $p=0,001$; $n=210$). Als therapeutische Maßnahme hat lediglich die OP-Radikalität einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen erzielen können (Korrelationskoeffizient nach Pearson = $-0,185$; $p=0,007$; $n=209$), weitere therapeutische Maßnahmen, im Sinne einer durchgeführten Strahlen oder Chemotherapie, erzielten keinerlei signifikant unterschiedliche Überlebenszeiten.

Die Untersuchung bezüglich der Histologie der Präparate ergab kein signifikantes Ergebnis. Um einen möglichen untergründigen Effekt des histologischen Typs, im Sinne eines Confounders, auf die anderen Variablen ausschließen zu können, wurden alle bislang genannten Korrelationen zusätzlich nochmals ausschließlich für Tumoren der einzelnen histologischen Typen errechnet. Auch hierbei zeigten sich keinerlei signifikante Abweichungen oder charakteristischen Verteilungsmuster. Auf Grund der niedrigen Fallzahlen innerhalb der einzelnen histologischen Gruppen kann ein möglicher Unterschied jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden.

Tabelle 33: Korrelationen bekannter Prognosefaktoren unter einander

		Überlebenszeit in Monaten	Grading	Alter bei Diagnose	OPRadikalität	PrimärTherapie	Histologie
Überlebenszeit in Monaten	Korrelation nach Pearson	1	-,238**	-,237**	-,185**	,110	,045
	Signifikanz (2-seitig)		,001	,001	,007	,112	,519
Grading	N	210	203	210	209	209	210
	Korrelation nach Pearson	-,238**	1	,176*	,014	,054	,044
	Signifikanz (2-seitig)	,001		,012	,848	,444	,537
Alter bei Diagnose	N	203	203	203	202	202	203
	Korrelation nach Pearson	-,237**	,176*	1	,076	-,211**	-,084
	Signifikanz (2-seitig)	,001	,012		,276	,002	,228
OPRadikalität	N	210	203	210	209	209	210
	Korrelation nach Pearson	-,185**	,014	,076	1	,302**	-,051
	Signifikanz (2-seitig)	,007	,848	,276		,000	,461
PrimärTherapie	N	209	202	209	209	209	209
	Korrelation nach Pearson	,110	,054	-,211**	,302**	1	-,030
	Signifikanz (2-seitig)	,112	,444	,002	,000		,665
Histologie	N	209	202	209	209	209	209
	Korrelation nach Pearson	,045	,044	-,084	-,051	-,030	1
	Signifikanz (2-seitig)	,519	,537	,228	,461	,665	
	N	210	203	210	209	209	210

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

3 Überlebenszeitanalyse: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell

Um die, mittels der Korrelationsanalyse identifizierten, wichtigen Prognosefaktoren auf die Gesamtüberlebenszeit der Patientin zu berücksichtigen, wurden für diese Größen einzelne Cox Proportional Hazard Regressionsmodelle aufgestellt. Diese bemessen den Einfluss der identifizierten Zellparameter unter Berücksichtigung der Faktoren „Alter bei Diagnosestellung“ „Grading“ und „OP-Radikalität.“ Nur so ist es möglich eine Aussage über den additiven Wert eines einzelnen Faktors unter Berücksichtigung der jeweils anderen Einflussvariablen zu treffen .

3.1 Adjustierung nach Alter

Das aufgestellte Cox Proportional Hazard Modell bestätigte die im Zuge der positive Korrelation aufgestellte Hypothese, dass das Alter einen entscheidenden Einfluss auf die Überlebenszeit hat, was intuitiv nachvollziehbar ist. Das aufgestellte Modell konnte diesen Zusammenhang stark signifikant darstellen ($p=0,000$; Hazard Ratio=1,034; $n= 198$).

Nach alters-entsprechender Adjustierung, zeigte sich kein Hinweis auf einen direkten Zusammenhang zwischen Überlebenszeit der Patientinnen mit der Anzahl an FoxP3+, CD8+ oder CCL22+ Zellen.

Tabelle 34: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell zu Alter und Anzahl

Variablen in der Gleichung						
	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
Alter	,034	,008	16,240	1	,000	1,034
CD8Anzahl	-,045	,115	,149	1	,699	,956
FoxAnzahl	-,033	,088	,143	1	,705	,967
CCL22Anzahl	-,126	,100	1,606	1	,205	,881

Auch für das Verhältnis von CD8+ T-Zellen zu FoxP3+ Zellen ließ sich, nach Adjustierung für das Alter der Patientinnen, kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patientinnen nachweisen ($p=0,870$).

Tabelle 35: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell zu Alter und CD8+:FoxP3+ Ratio

Variablen in der Gleichung						
	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
Alter	,035	,008	16,973	1	,000	1,035
RatioFoxCd8	-,024	,148	,027	1	,870	,976

Die Lage der Zellen im Gewebe ist jedoch, auch nach Adjustierung hinsichtlich des Alters, noch ein entscheidender Faktor für die Überlebenszeit einer Patientin. Sowohl für die Lage von CD8+ T-Zellen, als auch für die der FoxP3+ Zellen, ließ sich ein signifikanter Einfluss berechnen (p=0,001; Hazard Ratio= 1,622 / p= 0,013; Hazard Ratio= 1,448).

Tabelle 36: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell zu Alter und Verteilung

Variablen in der Gleichung						
	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
Alter	,039	,013	9,241	1	,002	1,040
CD8Verteilung	,483	,147	10,804	1	,001	1,622
FoxVerteilung	,370	,148	6,233	1	,013	1,448
CCL22Verteilung	,239	,181	1,755	1	,185	1,270

Die Infiltration der Zellen ins Tumorgewebe hat bereits im Zuge der Analyse der Korrelationen einen deutlichen Hinweis auf einen Zusammenhang des CCL22 Nachweises im Tumorgewebe aufgezeigt. Dieser Zusammenhang wird nach Adjustierung hinsichtlich der Einflussgröße „Alter der Patientin“ noch deutlich stärker (B= - 0,778; p=0,005; Hazard Ratio=0,459; n= 89).

Tabelle 37: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell zu Alter und Tumordinfiltration

Variablen in der Gleichung						
	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
Alter	,029	,013	5,233	1	,022	1,030
CD8Tumorf	-,378	,340	1,241	1	,265	,685
FoxTumorf	,318	,612	,270	1	,603	1,374
CCL22Tumorf	-,778	,279	7,768	1	,005	,459

3.2 Adjustierung nach Grading

Die Bedeutung des Gradings als Einflussvariable auf das Gesamtüberleben wurde im Modell stark signifikant bestätigt (B= 0,647; p=0,000; n= 208). Unter Berücksichtigung dieser starken Einflussgröße war die Anzahl der einzelnen Zellen weiterhin nicht signifikant.

Tabelle 38: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell zu Grading und Anzahl

Variablen in der Gleichung						
	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
Grading	,647	,177	13,340	1	,000	1,909
CD8Anzahl	,011	,119	,008	1	,929	1,011
FoxAnzahl	-,158	,093	2,895	1	,089	,854
CCL22Anzahl	-,017	,102	,029	1	,865	,983

Auch nach Bereinigung der Daten hinsichtlich des Gradings, blieb die Verteilung der CD8+ T-Zellen, sowie der FoxP3+ Zellen signifikant.

Tabelle 39: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell zu Grading und Verteilung

Variablen in der Gleichung						
	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
Grading	,474	,248	3,648	1	,056	1,607
CD8Verteilung	,327	,149	4,834	1	,028	1,387
FoxVerteilung	,361	,149	5,901	1	,015	1,435
CCL22Verteilung	,130	,180	,519	1	,471	1,139

Auch für die scheinbar entscheidende Tumorerinfiltration von CCL22 positiven Zellen konnte wiederum ein signifikantes Ergebnis berechnet werden (B= - 0,712; n= 89; p= 0,020). Demnach hält auch dieser Effekt der Adjustierung für den Faktor Grading stand.

Tabelle 40: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell zu Grading und Tumorerinfiltration

Variablen in der Gleichung						
	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
Grading	,338	,254	1,768	1	,184	1,402
CD8Tumorinf	-,024	,384	,004	1	,950	,976
FoxTumorinf	-,975	,678	2,069	1	,150	,377
CCL22Tumorinf	-,712	,306	5,423	1	,020	,491

3.3 Adjustierung für den Faktor OP- Radikalität

Der bereits vermutete Zusammenhang zwischen OP- Radikalität und Überlebenszeit wurde im Cox Modell wiederum als signifikant bestätigt (B=0.225; n= 197; p= 0,009). Auch nach Adjustierung für diesen Faktor änderte sich an den bereits vermuteten Zusammenhängen jedoch nichts.

Tabelle 41: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell zu OP-Radikalität und Anzahl

Variablen in der Gleichung						
	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
OPRadikalität	,225	,086	6,826	1	,009	1,252
CD8Anzahl	-,039	,111	,121	1	,728	,962
FoxAnzahl	-,064	,089	,521	1	,470	,938
CCL22Anzahl	-,126	,101	1,551	1	,213	,882

Tabelle 42: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell zu OP-Radikalität und Verteilung

Variablen in der Gleichung						
	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
OPRadikalität	,078	,130	,366	1	,545	1,082
CD8Verteilung	,398	,140	8,096	1	,004	1,489
FoxVerteilung	,285	,154	3,418	1	,064	1,330
CCL22Verteilung	,191	,178	1,150	1	,283	1,211

Tabelle 43: Cox Proportional Hazard Regressionsmodell zu OP-Radikalität und Tumorerinfiltration

Variablen in der Gleichung						
	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
OPRadikalität	,114	,126	,821	1	,365	1,121
CD8Tumorerinf	-,274	,342	,643	1	,423	,760
FoxTumorerinf	,248	,614	,164	1	,686	1,282
CCL22Tumorerinf	-,852	,278	9,395	1	,002	,427

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels des Cox Proportional Hazard Regressionsmodell, auch unter Berücksichtigung der möglichen intervenierenden Variablen Alter, Grading und OP-Radikalität, ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Überleben der Patientinnen und folgenden Parametern nachgewiesen werden konnte:

- Verteilungsmuster der CD8+ T-Zellen
- Verteilungsmuster der FoxP3+ Zellen
- Tumorerinfiltration durch CCL22+ Zellen

4 Überlebenszeitanalyse mittels Kaplan- Meier- Kurven und Logrank Test

4.1 CD8+ Zellen

4.1.1 Einfluss der CD8+ T-Zell Anzahl auf das Überleben

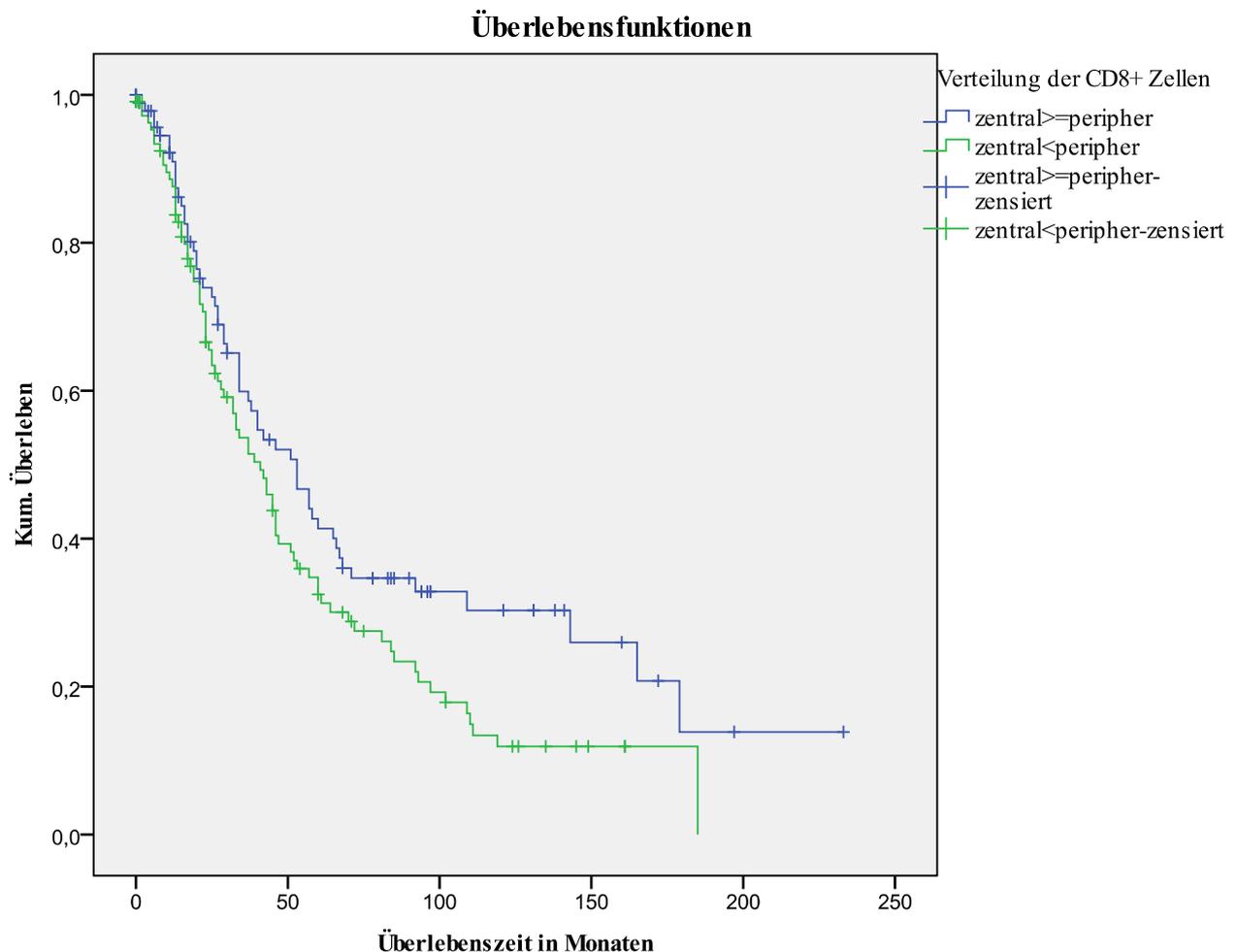
Wie sowohl die Berechnung der Korrelation, wie auch das Cox Proportional Hazard Model bereits vermuten ließen, hat sich auch im Kaplan-Meier Test, sowie im Logrank Test auf Unterschiede der Überlebenskurven, kein signifikantes Ergebnis hinsichtlich der Anzahl der CD8+ T-Zellen im Präparat und dem Überleben der Patientin gezeigt ($p= 0,609$; Chi-Quadrat= 1,829; FG=3).

4.1.2 Einfluss des CD8+ T-Zell Verteilungsmusters auf das Überleben

Die bislang signifikante Verbindung zwischen dem Verteilungsmuster der CD8+ T-Zellen und dem Überleben der Patientin konnte auch im Kaplan-Meier Test, sowie im Logrank Test bestätigt werden ($p= 0,049$; Chi-Quadrat= 3,868; FG=1)

Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,868	1	,049



4.1.3 Einfluss der CD8+ T-Zell Tumorinfiltration auf das Überleben

Es konnte keine Signifikanz für einen Zusammenhang zwischen der CD8+ Tumorinfiltration und dem Überleben der Patientinnen hergestellt werden ($p=0,423$; Chi-Quadrat=0,643; FG=1).

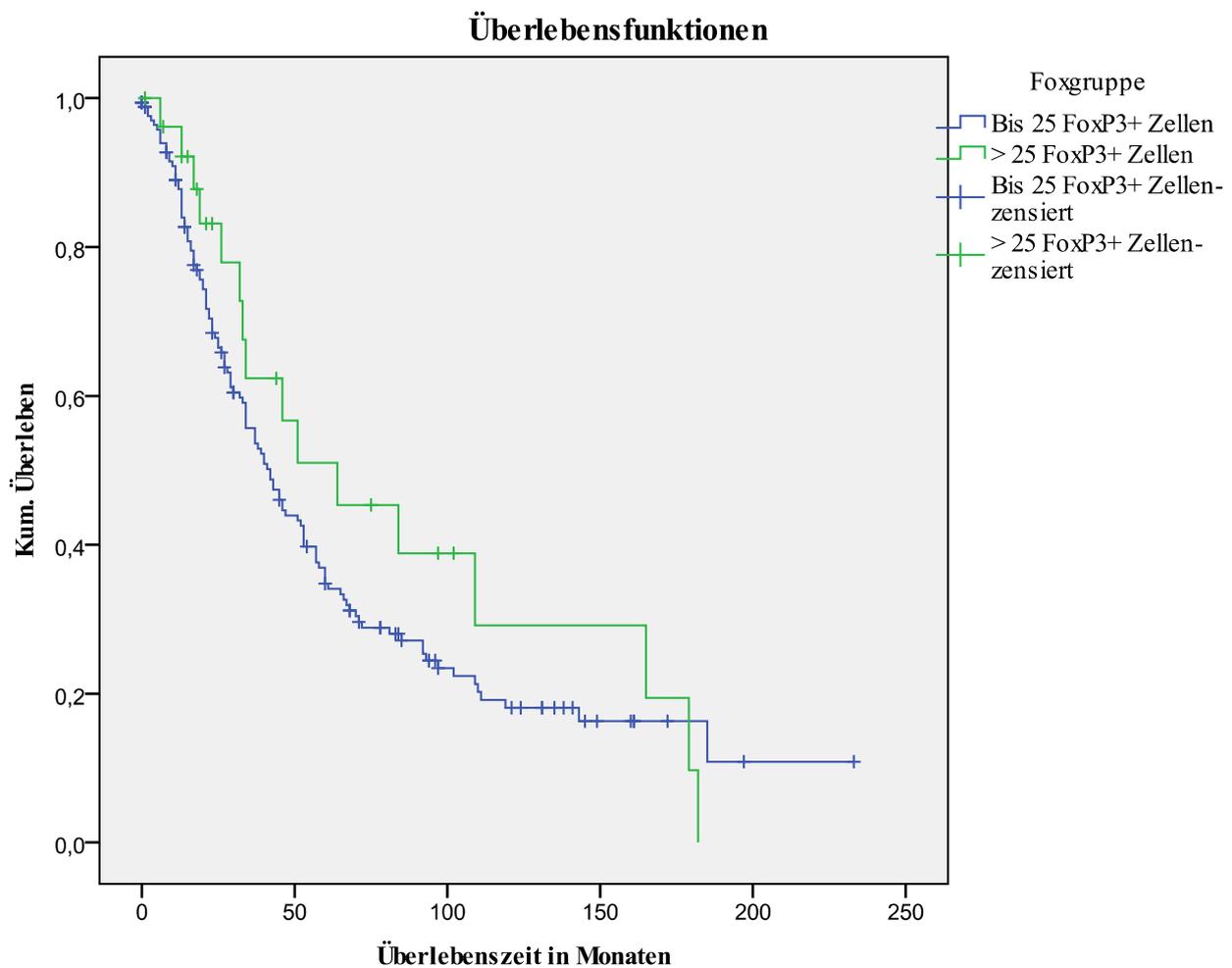
4.2 FoxP3+ Zellen

4.2.1 Einfluss der FoxP3+ Zell Anzahl auf das Überleben

Die Anzahl an FoxP3+ Zellen ist im Logrank Test nicht signifikant in Hinblick auf die Überlebenszeit in Monaten einer Patientin mit Ovarialkarzinom ($p=0,330$; Chi-Quadrat= 9,51; FG1). Die Abbildung der Kaplan Meier Kurve gibt jedoch auch in für die im Rahmen dieser Studie untersuchten Patientinnen durchaus einen Hinweis darauf, dass ein Zusammenhang besteht, wengleich dieser statistisch nicht signifikant nachweisbar ist.

Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,951	1	,330

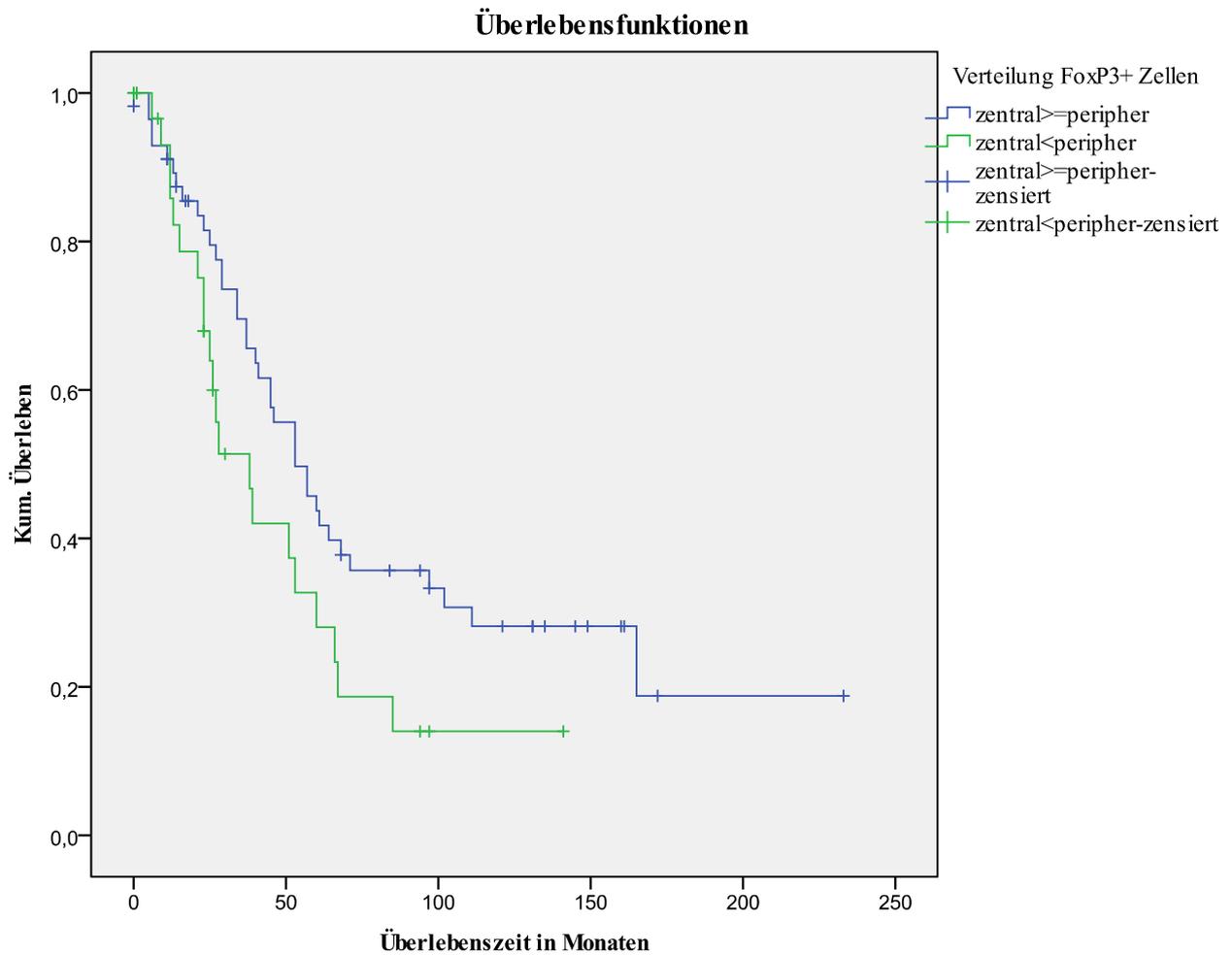


4.2.2 Einfluss des FoxP3+ Verteilungsmusters auf das Überleben

Sowohl die Berechnung der Korrelationen, als auch das Cox- Regressionsmodell haben bereits einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Verteilungsmuster der FoxP3+ Zellen zum Überleben herstellen können. Dieses Ergebnis wird durch ein signifikantes Ergebnis im Logrank Test wiederum bestärkt ($p=0,056$; Chi-Quadrat=3,641; FG=1).

Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,641	1	,056



4.2.3 Einfluss der FoxP3+ Zell Tumordinfiltration auf das Überleben

Auch im Kaplan-Meier Modell, sowie im Log-Rank Test auf Unterschiede der Überlebenszeitkurven konnte für den Nachweis einer Tumordinfiltration durch FoxP3+ Zellen kein signifikantes Ergebnis erzielt werden ($p=0,668$; Chi-Quadrat=0,184; FG= 1).

4.3 CCL22+Zellen

4.3.1 Einfluss der CCL22+ Zell Anzahl auf das Überleben

Die Anzahl der CCL22+ Zellen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit der Patientinnen erbracht ($p=0,274$; Chi-Quadrat 3,885; FG=3).

4.3.2 Einfluss der CCL22+ Zell Verteilung auf das Überleben

Für die Verteilung der CCL22+ Zellen innerhalb des Präparates konnte kein signifikanter Zusammenhang zum Überleben mittels Logrank Test errechnet werden ($p=0,515$; Chi-Quadrat=0,423; FG=1).

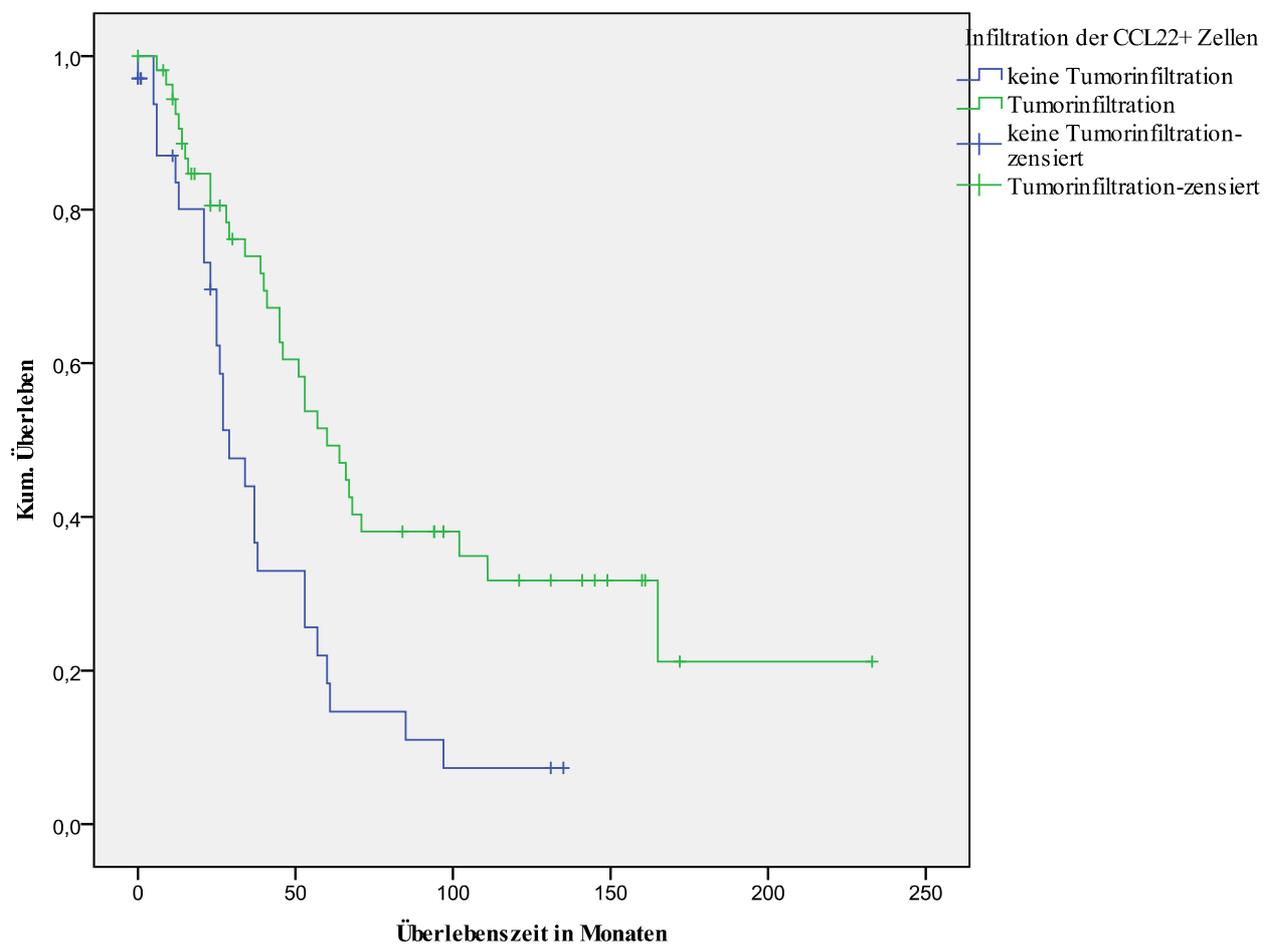
4.3.3 Einfluss der CCL22+ Zell Tumordinfiltration auf das Überleben

Das bei weitem eindeutigste Ergebnis, hinsichtlich des Einflusses eines einzelnen Faktors auf das Überleben einer Patientin, hat die CCL22+ Zell Infiltration ins Tumorgewebe erbracht ($p= 0,001$; Chi-Quadrat=10,291; FG=1). Wie schon in den vorherigen Tests, ist dieser Zusammenhang auch mittels Kaplan-Meier Kurve sowie Logrank Test signifikant nachweisbar.

Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	10,291	1	,001

Überlebensfunktionen



5 Expression von FoxP3 und CCL22 auf Tumorzellen

Die Präparate wurden alle hinsichtlich des Zelltyps untersucht, der FoxP3 und CCL22 exprimierte. Zur Expression von FoxP3 kam es ausschließlich bei Zellen des Lymphozytären Phänotyps. Fraglich positive Präparate wurden gesammelt und nochmals, in einem völlig unabhängigen Experiment, immunhistochemisch gefärbt. Es kam zu keiner eindeutigen Expression von FoxP3 auf Tumorzellen.

Auch die Expression von CCL22 auf Tumorzellen wurde nicht beobachtet. Anfänglich war diese Annahme bei einigen Präparaten getroffen worden. Eine genaue Untersuchung der betroffenen Präparate ergab jedoch, dass genau diese Präparate im Zuge der Aufbereitung, zur Reinigung von von störenden Kalkablagerungen, zusätzlich mit Trichloressigsäure behandelt worden waren. Diese zusätzliche Belastung auf das Gewebe führte mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu dieser falsch-positiven Anfärbung von Tumorzellen. Einen immunhistochemisch eindeutigen Nachweis von CCL22 fand sich ausschließlich im Zytoplasma von Makrophagen.

Diskussion

Tumorleiden des Ovars sind eine der führenden Todesursachen der gynäkologischen Tumorerkrankungen. Die Überlebenszeit der Patientinnen, die an diesem Tumor erkranken, ist trotz identischem FIGO Stadium und gleicher Therapie sehr unterschiedlich. Ein Zusammenhang zwischen Überlebensdauer und der individuellen immunologischen Reaktion einer Patientin ist hierfür ein möglicher Erklärungsansatz. Auf der Oberfläche von Tumoren werden Tumorspezifische Antigene exprimiert, die vom Immunsystem erkannt werden können. Dennoch lässt sich eine gezielt gegen den Tumor gerichtete Immunreaktion und spontane Tumorremission nur sehr selten nachweisen [68]. Mutmaßlich entstehen im Laufe eines Lebens in jedem Organismus häufig Tumore, die jedoch auf Grund einer funktionierenden Immunabwehr nie zu Tage treten. Die Manifestation eines Tumors stellt vor diesem Hintergrund, bildlich gesprochen, das Versagen des Immunsystems dar. Welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen, welche Zellen in dem Prozess als Hauptakteure fungieren und in wie weit der Tumor selbst Einfluss auf das Immunsystem ausübt, ist derzeit Thema einer Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten. Einige Arbeiten haben sich dabei bereits der Tumorimmunologie des Ovarialkarzinoms im Speziellen zugewandt. So beschrieb Zhang et al. bereits 2003 in dem Artikel *Intratumoral T- Cells, Recurrence and Survival in Epithelial Ovarian Cancer* [69] eindrücklich den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Immunzellen im Tumorgewebe und der Prognose von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. An 186 Tumorproben führte er eine immunhistochemische Analyse der im Tumorgewebe auftretenden Zellen durch. Patientinnen, in deren Tumorgewebe CD3+ Tumor infiltrierende T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten, hatten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 38.0% im Vergleich zu 4,5% bei Patientinnen mit T-Zell freiem Tumorgewebe ($P < 0.001$).

Zwei Jahre nach der Veröffentlichung von Zhang et al., zum Zusammenhang von CD3+ T-Zell Tumordinfiltration und 5-Jahres-Überlebensrate beim Ovarialkarzinom, wiederholte Sato et al. den Versuch an 117 Patientinnen [59]. Er konnte die Ergebnisse von Zhang et al., bezüglich der Assoziation zwischen CD3+ T-Zellen und Gesamtüberleben, nicht bestätigen. Vielmehr zeigte sich, dass zur Vorhersage der Sterblichkeit einer Patientin, eine genauere Differenzierung der CD3+ T-Zell-Populationen nötig ist. Es konnte gezeigt werden, dass nur die Patientinnen mit einer signifikant erhöhten Überlebensrate assoziiert werden konnten, deren Tumorgewebe von spezialisierten CD3+CD8+ T-Zellen infiltriert wurde. Das Verhältnis dieser CD3+CD8+ Effektor

Zellen zu CD3+CD4+ T-Zellen im Tumorgewebe, so Sato et al., ist der entscheidende prognostische Marker für das Überleben der Patientin.

Curiel et al. gelang es diese CD4+ T-Zellen weiter zu spezifizieren. Er konnte nachweisen, dass die T-Zellen mit Treg-Zell Funktion, durch Nachweis des Forkhead Box Protein 3 Transkriptionsfaktors (FoxP3), differenziert werden können. Diese Tumor Treg-Zellen befanden sich bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom signifikant häufiger im ovariellen Gewebe, als im Gewebe gesunder Kontrollen. Darüber hinaus ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CD4+CD25+FoxP3+ Treg-Zellen im Tumorgewebe und dem Überleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom beobachten [57]. Curiel et al. zeigte, in vitro und in vivo, dass eine erhöhte Anzahl an CD4+CD25+FoxP3+ Treg-Zellen die tumorspezifische Immunreaktion unterdrückt und mit Tumorwachstum und verringerter Überlebenschance assoziiert ist. Schließlich zeigte er auch, dass es bei einigen Patientinnen zu einer selektiven Anreicherung von CD4+CD25+FoxP3+ Treg-Zellen im Tumorgewebe kam, die zusätzlich zu FoxP3 auch den CCR4 Rezeptor exprimierten. Auch wurde, das zum CCR4 Rezeptor zugehörige Chemokin CCL22, mittels Real-time PCR, im Tumorgewebe nachgewiesen.

Wie diese kurze Einführung deutlich macht gibt es bei der Erforschung der Tumorummunologie des Ovarialkarzinoms zwei grundsätzliche Schwierigkeiten hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Studien. Erstens entwickeln sich die verwendeten Marker und Methoden im Zuge der Zeit weiter, was einen Vergleich zwischen neuen und älteren Studien erschwert. Zweitens verhindert die Einführung von immer neuer Definitionen, beispielsweise für die Lage oder Tumordinfiltration der Immunzellen, den Vergleich von zeitnah veröffentlichten Arbeiten untereinander. Auch werden Annahmen, die für Tumorzellen einer Art, oder eines bestimmten histologischen Typs getroffen wurden, häufig achtlos auf Tumore einer vollkommen anderen Art übertragen. Diese Umstände führen dazu, dass Ergebnisse oft nicht reproduzierbar sind, und sich führende Wissenschaftler gegenseitig widersprechen. Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, die von verschiedenen Forschungsgruppen am häufigsten untersuchten Kriterien mit einander zu vergleichen, um die Wichtigsten, unter den vielen bekannten signifikanten Faktoren, zu identifizieren.

1 CD8+, FoxP3+, CCL22+ Zell Anzahl, Lage und Tumorinfiltration

Auf der Grundlage der vorangegangenen wissenschaftlichen Arbeiten, wurden hier die Tumoren von 210 Patientinnen mit Ovarialkarzinom im FIGO Stadium III, mittels immunhistochemischer Verfahren, hinsichtlich ihres immunologischen Status untersucht. Aufbauend auf die durch Curiel et al. hergestellten und seit dem vielfach bestätigten Zusammenhänge, wurden die T-Lymphozyten und Treg-Zellen mit Hilfe der Oberflächenmarker CD8 und FoxP3 von einander unterschieden. Auch wurden alle Präparate auf das Vorkommen und die Lage von CCL22 hin untersucht.

In allen Präparaten wurden sowohl CD8+, als auch FoxP3+ Zellen nachgewiesen. Die Anzahl der CD8+ T-Zellen korrelierte signifikant mit der Anzahl der vorhandenen FoxP3+ Zellen ($p=0,000$; $n=199$). Dies wurde bereits von anderen Autoren berichtet und deutet auf eine Abhängigkeit der Zellen zu einander, oder Interaktion unter einander, hin [57, 69]. Die Ansammlung der CD8+ und FoxP3+ Zellen, in unmittelbarer Proximität zu einander, wurde bereits von Curiel et al. beschrieben. Da die immunhistochemische Färbung für CD8 und FoxP3 an unabhängigen Gewebeschnitten durchgeführt wurde, ist es im Rahmen dieser Untersuchung nicht möglich gewesen deren Lage zu einander am Präparat direkt nachzuvollziehen. Der statistisch signifikante Zusammenhang zwischen der Verteilung von FoxP3+ Zellen zur Verteilung der CD8+ T-Zellen deutet jedoch stark darauf hin, dass die Zellen in unmittelbarer Nähe zu einander vorkommen und mit einander interagieren ($p=0,0026$; $n=199$). Auch die Korrelation des Parameters „Infiltration in das Tumorgewebe“ zwischen CD8+ Zellen und FoxP3+ Zellen spricht dafür, dass es zwischen beiden Zellen zu einer abhängigen Interaktion kommt.

Im Vergleich zum peripheren Blut, zu den Tumor umgebende Lymphknoten, sowie zum lymphatischen Gewebe der Milz fanden sich, auch in einer Mehrzahl vergleichbarer Studien, im Tumorgewebe deutlich mehr CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen [57, 60, 63] [43, 46]. Nur einzelne Studien unterstützen diese These nicht und sprechen sich für eine insgesamt erhöhte Anzahl von Treg Zellen im Körper von Tumorpatienten aus [70]. Ropponen et al. beschrieben für Patienten mit Kolonkarzinom bereits im Jahr 1997 eine vermehrte Ansammlung von nicht weiter spezifizierten Lymphozyten in lymphozytären Clustern am Rand des Tumorgewebes [71]. Ebelt et al. sowie Gobert et al. haben für das Prostatakarzinom, beziehungsweise das Mammakarzinom, eine ähnliche Ansammlung der FoxP3 Zellen in lymphozytären Ansammlungen in der Peripherie der Tumore beobachtet [63, 72]. Auch Ahmadzadeh et al. untersuchten Tumore von Melanompatienten hinsichtlich der genauen Lokalisation der Zellen im Tumorgewebe und im peripheren Stroma. Es

zeigte sich dort, dass Treg-Zellen vermehrt zwischen den Tumorzellen lokalisiert waren, wohingegen sich die Effektorzellen im umgebenden, peritumoralen Bindegewebe sammelten[46]. Dieses Muster ließ sich an den hier, hinsichtlich der Lage der FoxP3+ Zellen untersuchten 210 Präparaten, teilweise auch für das Ovarialkarzinom bestätigen. Die relative Häufigkeit der Tumordinfiltration ist bei FoxP3+ Zellen größer als bei CD8+ Zellen (60,1% respektive 94,4%). Dennoch steht die Tumordinfiltration der beiden Zelltypen deutlich mit einander im Zusammenhang ($p=0,007$, $n=90$). Bei Infiltration der Treg-Zellen ins Tumorgewebe finden sich dort mit hoher Wahrscheinlichkeit auch CD8+ Zellen. Bei erhöhter Anzahl an CD8+ Zellen befinden sich diese auch häufiger im Tumorgewebe und seltener in der Peripherie. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass es einer bestimmten Anzahl von CD8+ Zellen bedarf, damit diese tatsächlich in das Tumorgewebe vorstoßen.

Auf die Frage hin, durch welchen Mechanismus die Zellen ihren Weg ins Tumorgewebe finden, bietet der Nachweis von CCL22 einen möglichen Anhaltspunkt: Wird der Tumor durch CCL22+ Zellen infiltriert, steigt auch die Anzahl an FoxP3+ Zellen und CD8+ Zellen im Tumorgewebe an ($p=0,048$ bzw $p=0,008$). Diese Feststellung bestätigt die These, dass dem Chemokin CCL22 im Zuge der Chemotaxis beim Ovarialkarzinom eine entscheidende Rolle zukommt[57]. Die Grundlage für diese Annahme beruht auf dem von Tang et al. publizierte Paper zu CCL22, in welchem diesem Chemokin eine zentrale Funktion im Zuge der, von Dendritischen Zellen initiierten Zellmigration von aktivierten T-Zellen, zugeschrieben wird [64]. Curiel et al., sowie Hirahara et al. demonstrierten, dass auch Treg-Zellen den CCR4 Rezeptor exprimieren können, den Transmembranrezeptor, dem das Chemokin CCL22 zuzuordnen ist [73]. Darüber konnte gezeigt werden, dass Treg Zellen, entsprechend ihrer Liganden CCL22 und CCL17 bzw. CCL20, ein viel potenteres Migrationsverhalten aufweisen, als die im Vergleich betrachteten T-Effektorzellen [73]. Dieser Zusammenhang wurde für Treg-Zellen beim Magenkarzinom bestätigt [60]. Auf der Suche nach den CCL22 produzierenden Zellen, konnte durch Lee et al. gezeigt werden, dass sowohl im Tumorgewebe befindliche Makrophagen, als auch Tumorzellen selber, das Chemokine CCL22 produzieren können [74].

Hinsichtlich der Lage des Chemokins CCL22 und der Immunzellen gibt es bisher kaum Veröffentlichungen. Beim Mammakarzinom fanden Gobert et al. peritumoral Lymphozyteninfiltrate mit einer Anhäufung von CCL22, in denen CCR4 exprimierende CD4+CD25+FoxP3+ Treg-Zellen durch Dendritische Zellen aktiviert wurden. Interessanter Weise korrelierte das Auftreten von FoxP3+ Treg-Zellen mit CCL22 hier nur in den peritumoralen, peripheren

Lymphozytenanhäufungen nicht jedoch im Tumorgewebe [63]. In den 210 Präparaten, die in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurden, konnte zwischen der Infiltration von CCL22 und FoxP3 ins Tumorgewebe jedoch ein signifikantes Ergebnis ($p=0,048$; $n=89$) errechnet werden, für das Verteilungsmuster der Zellen in der Peripherie hingegen nicht ($p=0,970$; $n=89$). Ebenfalls korrelierte die Anzahl von CCL22+ Zellen direkt positiv mit der CD8+ Zell Anzahl, nicht mit der Anzahl an FoxP3+ Zellen ($p=0,006$, $n=198$). Die Infiltration ins Tumorgewebe von CCL22+ Zellen stand hingegen nur mit der Infiltration der FoxP3+ Zellen signifikant in Zusammenhang. Eine mögliche Erklärung für diese Zusammenhänge bietet die Berücksichtigung der zeitlichen Abfolge der Zellmigration. Auf der Grundlage der hier erhobenen Daten ist die Annahme möglich, dass es zunächst zu einer Ansammlung von Dendritischen Zellen kommt, die mit einer CD8+ T-Zell Reaktion einhergeht. Diese würden durch einen noch unbekanntem Mechanismus ihrerseits angeregt CCL22 zu produzieren, welches wiederum die Migration der Treg-Zellen ins Tumorgewebe aktivieren würde (siehe hierzu auch Anhang 4).

2 CD8+, FoxP3+ und CCL22+ Zellen und gängige Prognosefaktoren

CD4+CD25+FoxP3+ Treg-Zellen häufen sich im Tumorgewebe bei schlechtem Grading vermehrt an [71]. Dieser Zusammenhang konnte auch an unseren Präparaten beobachtet werden ($p=0,004$; $n=194$). Die Anzahl an FoxP3+ Zellen steht demzufolge in direktem positiven Zusammenhang mit der Malignität des Tumors. Je mehr Treg-Zellen sich im Tumorgewebe befinden, desto schlechter differenziert wird dieser Tumor sein. Diese Theorie wird von der negativen Korrelation zwischen dem CD8+zu FoxP3+ Ratio und dem Grading unterstützt (Pearson Korrelationskoeffizient $-0,228$, $p=0,0001$; $n=192$). In dem Moment wo die FoxP3+ Zellen den Anteil der CD8+ T-Zellen übersteigen, ist dies mit der Enddifferenzierung des Tumors assoziiert (siehe hierzu auch Anhang 5). So lange die CD8+ T-Zellen im Präparat überwiegen, ist der Tumor, dem Grading gemäß, als weniger gefährlich anzusehen. Diese Theorie wird durch zahlreiche ähnliche Ergebnisse vergleichbarer Studien gestützt [75-76] [77-78]. Ein Zusammenhang fand sich auch für die Ansammlung von CD8+ Zellen und dem Grading ($p=0,041$). Mit peripherer Lage der CD8+ T-Zellen stieg die Gradingklasse an, was wiederum darauf hinweist, dass die CD8+ T-Zellen nur dann effektiv die Enddifferenzierung des Tumors verhindern können, wenn sie in die unmittelbare Nähe der Tumorzellen vordringen können. Von Naito et al. wurden sehr ähnliche Ergebnisse für Präparate

von Kolonkarzinompatienten berichtet. Hier war die Infiltration der CD8+ T-Zellen ins Tumorgewebe signifikant mit dem Grading assoziiert [79]. Diese Zusammenhänge werfen die schwierige Frage auf, ob schlecht differenzierte Karzinome, beispielsweise durch eine höhere Anzahl an exprimierten Tumorspezifischen Antigenen, allgemein zu einer stärkeren Reaktion des Immunsystems führen, oder ob der durch Treg- Zellen vermittelte Schutz des Tumors diese Enddifferenzierung erst zulässt.

Die von Clarke et al. beschriebenen immunologischen Unterschiede, zwischen den einzelnen histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms, waren nicht signifikant nachweisbar [77]. Hierbei sei jedoch auf die unterschiedliche Größe der jeweiligen Untergruppen hingewiesen. Eine Folgeuntersuchung mit Rekrutierung größerer Gruppennzahlen, zur Evaluation von Unterschieden zwischen den histologischen Klassen, wäre sicherlich sinnvoll.

3 Prognosefaktoren mit Einfluss auf das Überleben

Die in den Leitlinien zur Therapie des Ovarialkarzinoms und vom Robert-Koch-Institut getroffene Annahme, dass das Alter der Patientin bei Diagnosestellung, Grading und OP-Radikalität überaus bedeutende Faktoren für die Überlebenszeit der Patientinnen mit Ovarialkarzinom sind, wird durch die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt ($p=0,001$; $n=210$ bzw. $p=0,001$ $n=209$ bzw. $p=0,007$ $n=209$) [2, 4]. Die fehlende Korrelation zwischen der angewandten primären Therapie - Chemotherapie, Radiotherapie oder kombinierte Radiochemotherapie - und dem Überleben ist bedauerlich, überrascht aber nicht, angesichts der Tatsache, dass Patientinnen meist erst in einem späten Stadium diagnostiziert werden und viele Tumore nur sehr schlecht auf eine Chemotherapie ansprechen [16]. Um eine signifikant unterschiedliche Überlebenszeit, oder einen Unterschied im Ansprechen auf eine Therapie zwischen den einzelnen histologischen Typen nachweisen zu können, waren die Vergleichsgruppen zu klein. Dieser Zusammenhang war zuvor von Clarke et al., für das Ovarialkarzinom, berichtet worden [43]. Um mögliche Störeffekte, die durch den histologischen Typ bedingt sein könnten auszuschließen, wurden alle errechneten Tests zusätzlich unter Ausschluss aller Nicht-Serösen Karzinome durchgeführt (Daten nicht angegeben). Da kein bedeutender Unterschied zwischen den einzelnen histologischen Gruppen festgestellt werden konnte, wurden die Karzinome anschließend unabhängig von ihrer histologischen Klassifikation in alle Berechnungen miteinbezogen.

4 CD8+, FoxP3+ CCL22+ Zellen und deren Einfluss auf das Überleben

4.1 Anzahl der Zellen

Von der Mehrzahl der Autoren ist der negative Einfluss einer hohen Anzahl an FoxP3+ Zellen auf das Überleben von Tumorpatienten beschrieben worden [57, 80] [48, 58]. Ein direkter, signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl einer der drei untersuchten Zellmarker und dem Überleben kann durch die hier gemessenen Daten nicht wiedergegeben werden. Einzig der Blick auf die Kaplan-Meier Kurve, zur Anzahl von FoxP3+ Zellen, deutet auf diesen Zusammenhang hin. Auch das Verhältnis von CD8+ Zellen zu FoxP3+ Zellen, das von einigen Autoren als unabhängiger Prognosefaktor identifiziert wurde, hatte keinen messbaren, signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit. Es gilt jedoch beim Vergleich von Studiendaten zu berücksichtigen, dass nahezu kein Autor bislang eine Untersuchung der genauen Lage der Zellen, sowie deren Tumordinfiltration vorgenommen hat, sondern in der Regel lediglich deren relatives Vorkommen im Gewebe gemessen wurde. Häufig wurde darüber hinaus nicht genau differenziert, von welcher Zellpopulation FoxP3 überhaupt exprimiert wurde. Einige Veröffentlichungen der letzten Jahre deuten jedoch stark darauf hin, dass gerade diese Aspekte, bei der Beurteilung eines Präparates, hinsichtlich der Prognose eines Patienten, von entscheidender Bedeutung sind [63, 79] [72, 78].

4.2 Verteilungsmuster der Zellen

Die Vermutung, dass die Lage der Immunzellen für die Prognose einer Patientin von entscheidender Bedeutung ist, wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Zwischen den Variablen „Lage der CD8+ T-Zellen“ und „Überlebenszeit in Monaten“ konnte eine hohe Signifikanz, sowohl im Kaplan Meier Model und Log-Rank Test, als auch in der Cox Regression, nach Adjustierung für bekannte Prognosefaktoren, bestätigt werden (Kaplan Meier: Chi-Quadrat 3,868, $p=0,049$; Cox Regression $p=0,001$; $p=0,028$; $p=0,004$). Je gleichmäßiger sich demnach die CD8+ Zellen im Präparat verteilen, ein Umstand der wiederum stark mit der Anzahl der CD8+ Zellen korreliert, desto effektiver kann das Tumorstadium eingedämmt werden und desto länger wird die Patientin überleben. Diese Beobachtung wird von zahlreichen Arbeiten gestützt, die jedoch häufig nur die Anzahl der CD8+T-Zellen im gesamten Präparat, nicht jedoch deren genaue Lage, festgehalten haben [59, 77] [81]. Naito et al., sowie Galon et al. untersuchten jedoch 131 bzw. 480 Präparate von

Patienten mit Kolonkarzinom auch hinsichtlich der Verteilung von Immunzellen [78-79]. Naito et al. konnte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Tumordinfiltration von CD8+ T-Zellen zum Überleben der Patienten feststellen. Diese Überlegung stimmt mit den im Rahmen dieser Studie bestätigten, signifikanten Korrelationen überein. Dass ein direkter Einfluss der Tumordinfiltration von CD8+T-Zellen auf das Überleben nicht statistisch signifikant dargestellt wurde, ist mit der starken Korrelation zwischen den Parametern „Anzahl“, „Tumordinfiltration“ und „Lage“ von CD8+ Zellen zu erklären. Um den einzelnen Einfluss jedes Parameters zweifelsfrei belegen zu können, würde es sehr viel größerer Stichproben bedürfen, da die Überschneidungsmenge der Parameter unter einander relativ groß ist. In der von Galon publizierte Studie fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl von CD8+ T-Zellen, CD3+ T-Zellen, sowie CD45RO+ Gedächtniszellen zum Überleben. Die Gegenüberstellung von zentraler Ansammlung versus marginaler Ansammlung der Zellen in der Umgebung des Tumors ergab, dass eine hohe Anzahl der Zellen in beiden Kompartimenten zur besten Prognose führte. Diese Beobachtung stimmt mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Zusammenhängen überein. Ein hoher Anteil der im Tumor befindlichen Effektor T-Zellen im Verhältnis zu marginal gelegenen Effektor T-Zellen, war der bei weitem sicherste Prognosefaktor und den histologischen Prognosefaktoren der UICC-TNM Klassifikation, laut Galon, bei Weitem überlegen.

Auch die Berechnung der Korrelation zwischen dem Überleben und der Lage der FoxP3+ Zellen wies einen signifikanten Zusammenhang auf (Pearsons Korrelationskoeffizient: -0,283; $p=0,007$; $n=90$), der auch bei multivariater Adjustierung mittels des Cox Regression Models für die Faktoren „Grading“, „OP-Radikalität“ und „Alter bei Diagnosestellung“ aufrecht erhalten werden konnte ($p=0,013$; $p=0,015$; $p=0,064$) ($p=0,056$). Die Daten der Kaplan-Meier Methode deuten darauf hin, dass die Überlebenszeit mit der Ansammlung von FoxP3+ Zellen in der Peripherie sinkt. Die im ganzen Präparat verteilte Ansammlung von Treg-Zellen führt zu einer verlängerten Überlebenszeit. Eine vergleichbare Studie, die ebenfalls die Lage der FoxP3+ Zellen untersucht hat, ist die kürzlich erschienene Arbeit von Gobert et al. zum Überleben von Patientinnen mit Mammakarzinom. Darin kommen die Autoren ebenfalls eindeutig zu dem Ergebnis, dass die Ansammlung von Treg-Zellen in peripheren Lymphfollikeln, mit schlechter Prognose und verringerter Überlebenszeit einhergeht [63, 82] . Auch beim Prostatakarzinom ist die Ansammlung der FoxP3+ Zellen in peripheren Lymphfollikeln berichtet worden [72]. Mutmaßlich kommt es in diesen peripheren Lymphozytenansammlungen zu einem Kontakt zwischen Treg- Zellen und Dendritischen Zellen, im Zuge dessen die Treg-Zellen aktiviert werden (siehe hierzu auch Anhänge 4 und 5). Im Tumor

befindliche Treg- Zellen sind, Gobert et al. zu Folge, hingegen noch nicht aktiviert und aus diesem Grund auch nicht in der Lage CD8+ T-Effektor Zellen zu inhibieren . Diese Überlegung fügt sich in den Kontext einer umfangreichen Grundsatzdiskussion hinsichtlich des Ursprungs und der Funktionalität von Treg-Zellen in vivo an. Dem momentanen wissenschaftlichen Verständnis zu Folge, kommt es durch eine Vielzahl an unterschiedlichen, interzellulären Mechanismen zwischen Tumorzellen, Dendritischen Zellen und Effektor-T-Zellen erst zur Konversion von funktionsunfähigen Treg-Zellen zu aktivierten CD4+CD25+FoxP3+ Zellen [79, 83] (siehe hierzu auch Anhang 2). Dendritischer Zellkontakt mittels des Cytotoxic T- lymphocyte- associated antigen 4 Rezeptors (CTLA-4) [84-85], TFG- β [42, 49] [45, 86] [83], sowie IL-2 [87-88] [42] sind als wichtige Faktoren der Treg-Zell Aktivierung identifiziert worden. Die genauen Zusammenhänge sind jedoch komplex und bislang nur unvollständig erforscht. Die Beantwortung der Frage, ob es sich bei allen markierten FoxP3+ Zellen tatsächlich um funktionsfähige Treg- Zellen handelt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Um abschließend die Theorie einer peripheren Aktivierung von Treg-Zellen durch Dendritische Zellen in Lymphfollikeln bestätigen zu können, sollte in einem nächsten Schritt neben dem Vorhandensein, auch die Aktivität der Treg- Zellen gemessen werden. Es muss abschließend festgehalten werden, dass allein die Anzahl der FoxP3+ Zellen nicht als der einzelne, entscheidende Prognosefaktor angesehen werden darf. Übereinstimmend mit den hier erlangten Ergebnissen ist auch die Tumordinfiltration der Immunzellen, nicht als der alleinige, entscheidende Faktor für das Überleben anzusehen. Wie schon in der von Gobert et al. vorgelegten Studie gefordert wurde, sprechen auch die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass eine Reevaluation der Tumore auf die Lage der Immunzellen im Gewebe hin erfolgen muss.

4.3 Infiltration der Zellen ins Tumorgewebe

Das bei weitem deutlichste Ergebnis erbrachte der Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit und der Tumordinfiltration durch CCL22+ Zellen (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,287; $p=0,006$; $n=89$). Die Bedeutung dieses Faktors wuchs im Zuge der Adjustierung für andere Prognosefaktoren, mit Hilfe des Cox Proportional Hazard Models, sogar noch an. Die Infiltration des Tumorgewebes durch CCL22+ Zellen ist somit der wichtigste Prognosefaktor für Patientinnen mit Ovarialkarzinom, hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit nach Diagnosestellung. Patientinnen, deren Tumore durch CCL22+ Zellen infiltriert werden, haben eine signifikant höhere

Überlebenschance, als solche deren Tumorgewebe nicht infiltriert wird. Dieses erstaunliche Ergebnis wirft hinsichtlich der Bedeutung der Chemokine für die Tumorentwicklung viele Fragen auf. In wie weit werden auch CD8⁺ T-Zellen durch CCL22 direkt, oder indirekt durch eine allgemeine Immunstimulation, zum Tumor hin angezogen? Ist das gehäufte Vorkommen von Dendritischen Zellen mit einer verbesserten Tumor-Antigen Präsentation gegenüber CD8⁺ T-Zellen verbunden? Stimulieren Dendritische Zellen CD4⁺ T-Helferzellen, die dann ihrerseits CD8⁺ T-Effektor Zellen gegen das Tumorgewebe zu aktivieren vermögen? Bekannt ist, dass Dendritische Zellen mit Treg-Zellen kooperieren können und zu deren Aktivierung beitragen (siehe hierzu auch Anhang 5) - können Dendritische Zellen Treg-Zell Aktivität auch inhibieren? Die Mehrzahl der bislang veröffentlichten Paper haben nur das Auftreten von CCL22 im Tumorgewebe beschrieben, jedoch weder die Lage noch die Tumordinfiltration der Zellen, vielmehr den Einfluss der Zellen auf das Überleben untersucht[57]. Die herausragende Bedeutung dieses Faktors auf die Überlebenszeit, wurde durch multivariate Regression und mittels der Kaplan Meier Methode durch diese Arbeit jedoch klar belegt. Vor dem Hintergrund der Entwicklung einer Immuntherapie oder eines Impfstoffes, der auf der Inaktivierung von CCL22 oder des CCR4 Rezeptors beruht, gewinnt diese Beobachtung zusätzlich an Bedeutung [61, 89]. Es ist daher zwingend notwendig die Funktion und den Einfluss von CCL22⁺ Zellen näher zu erforschen, um die aufgezeigten Fragestellungen zufriedenstellend beantworten zu können.

5 Expression von CCL22 und FoxP3 durch das Tumorgewebe

Die Vielfalt der Mechanismen, mit denen das Tumorgewebe das Immunsystem zu unterwandern versucht, wird durch die vielen zu diesem Thema veröffentlichten Arbeiten stetig ergänzt. Ging man in früheren Überlegungen noch davon aus, dass Immunzellen schlichtweg nicht in der Lage seien den Tumor überhaupt zu detektieren [50], so wissen wir heute, dass Tumore durch aktive Toleranzinduktionsmechanismen in der Lage sind, das Immunsystem geschickt zu täuschen. Auch eine mögliche Produktion des Chemokins CCL22 durch Tumorzellen ist im Zuge dieser Überlegungen vermutet worden [57, 63]. Bei allen Patientinnen, die im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit auf CCL22 hin untersucht wurden, konnte das Chemokin ausschließlich im Zytoplasma von Zellen des Dendritischen Phänotyps gefunden werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den von Vulcano, Tang, und Mizukami vorgestellten Arbeiten [64-65] [60]. Es zeigte sich kein Anhalt dafür, dass auch Tumorzellen CCL22 produzieren, was den Beobachtungen anderer Autoren widerspricht [57, 63]. Anfänglich war diese Annahme bei drei Präparaten getroffen worden. Eine genaue Untersuchung der betroffenen Präparate ergab jedoch, dass diese drei Präparate im Zuge der Aufbereitung, zusätzlich mit Trichloressigsäure behandelt worden waren. Diese erhöhte Belastung des Gewebes führte zu einer falsch-positiven Anfärbung von Tumorzellen. Von einigen Autoren wurde die Expression von FoxP3 durch Tumorzellen beobachtet. Auch diese Beobachtung konnte im Rahmen dieser Studie nicht bestätigt werden. Es kam bei keinem Präparat zu einer eindeutigen FoxP3 Tumoranfärbung. Dieses Ergebnis wurde auch von Zhang et al. 2010 erhoben: bei 27 Patientinnen mit Ovarialkarzinom konnte mittels immunhistochemischer Analyse keine/geringe Mengen an FoxP3+ Expression durch Tumorzellen ermittelt werden. Dieses Ergebnis wurde mittels Real Time PCR bestätigt [90]. Hinz et al. hingegen haben 2007 die Expression von FoxP3 auf den Tumorzellen des duktales Pankreaskarzinoms beschrieben [54]. Dies ermöglichte es den Tumorzellen, so Hinz, Treg-Zell ähnliche Funktionen, im Sinne eines Tumorescapemechanismus, auszuüben. Daraufhin untersuchte Karanikas et al. Tumoren der Lunge, des Colons, der Mamma, des Blutbildenden Systems, sowie Melanome hinsichtlich deren FoxP3 Ausdrucks [53]. In allen Tumoren ließen sich spezifische mRNA Spiegel feststellen und auch eine immunhistochemische Analyse bestätigte, die von Hinz et al. veröffentlichten Beobachtungen. Zu dem gleichen Ergebnis kam kürzlich auch Ebert et al., der ebenfalls FoxP3 Expression auf Melanomzellen, mittels der Immunhistochemie, nachwies [55]. Angesichts dieser sehr unterschiedlichen Ergebnisse gilt es nun wiederum die genaue Funktion von FoxP3 im Rahmen der

Tumorimmunologie zu definieren. Jüngste Entwicklungen untersuchen dahingehend eine mögliche Suppressorfunktion von FoxP3 im Tumorgewebe. In zwei Studien von Zuo et al. am Mammakarzinom wird FoxP3 als Repressor des HER2/ERBB2, sowie des SKP2 Onkogens beschrieben [91-92]. Zhang et al. konnten bei den wenigen Epithelzellen des Ovars bei denen FoxP3 hochreguliert war, fast ausschließlich Epithelzellen von gesunden Probanden, einen ähnlichen antiproliferativen Effekt feststellen. Epithelzellen mit FoxP3 Expression konnten Zellproliferation inhibieren, Zellmigration verringern und Zellinvasion verhindern [90]. Unabhängig davon, ob Tumorzellen selber in der Lage sind, mittels FoxP3 oder CCL22 Expression, immunoregulatorische Funktionen auszuüben oder nicht, eröffnen die Beobachtungen der Autoren die Diskussion darüber, ob FoxP3 als ein für Treg-Zellen spezifischer Marker angesehen werden darf (siehe hierzu auch den Abschnitt „Kritische Randbemerkung“).

Unumstritten ist, dass Tumorzellen offensichtlich im Stande sind, auch eigenständig, ohne die Protektion durch CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen, durch Produktion von TGF- β und IL-10, CD8+ Effektor T-Zellen zu unterdrücken [36, 49, 57]. Liu et al. konnten 2007 den Nachweis erbringen, dass Tumorzellen darüber hinaus, durch Produktion von sehr hohen TGF- β Spiegel, aktiv die Transformation von naiven CD4+CD25- T-Zellen zu CD4+CD25+FoxP3+ Treg-Zellen initiieren können [49]. Beim Tumorenancement, nutzt der Tumor die IL-10 Produktion für das eigene Wachstum. Makrophagen werden ihrerseits durch IL-10 Ausschüttung zur Produktion von IL-10, TGF- β und VEGF angeregt. Dadurch unterdrücken sie einerseits zytotoxische T-Zellen, sowie natürliche Killerzellen und stimulieren andererseits die Gefäßeinsprossung in den Tumor mittels VEGF [36] (siehe hierzu auch Anhang 4 und 5).

Auch durch die Expression des Fas-Liganden auf der Oberfläche von Tumorzellen, kann, wie Rabinowich et al. eindeutig nachweisen konnten, die direkte Apoptoseinduktion bei T-Zellen induziert werden [93]. Spiegelbildlich hierzu sind loss-of-function Mutationen der Apoptoserezeptoren, gene silencing proapoptotischer Gene und Induktion antiapoptotischer Proteine bei Tumorzellen selbst beschrieben worden, die einen direkten T-Zell vermittelten zytolytischen Angriff untergraben können [36]. Es ist dementsprechend, selbst bei erhaltener Effektorzellantwort, nicht immer möglich für eine Effektorzelle die Apoptose einer Tumorzelle zu erreichen, wenn diese sich entsprechend gewappnet hat. Um die beim Ovarialkarzinom entscheidenden Tumorescapemechanismen zu identifizieren, sollten Tumore möglichst auf alle der oben benannten Optionen hin getestet werden. Die Identifizierung der Schlüsselmechanismen könnte interessante Hinweise für mögliche Immuntherapeutika erbringen.

Kritische Randbemerkung

Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen auf der vielfach bestätigten Annahme, dass FoxP3 als spezifischer Marker zur Treg-Zell Differenzierung verwendet werden kann. Wie bereits in der Einleitung hinreichend dargelegt wurde, entspricht diese Annahme dem momentanen Stand der wissenschaftlichen Forschung. Dennoch soll an dieser Stelle kurz auf einige Untersuchungen hingewiesen werden, die Zweifel an der Exklusivität von FoxP3 für Treg-Zellen geäußert haben [94]. So ist FoxP3 diesen Studien zu Folge lediglich der Stabilisator der Treg-Zell Funktion. Einmal eingeschaltet würden Zellen, die das FoxP3 Gen aktiviert haben als Suppressorzellen aktiv, es sei aber anders herum nicht konstitutiv, dass eine Zelle von Anfang an durch FoxP3 Expression zur Suppressorzelle wird [95]. Welche Mechanismen lösen jedoch die Expression von FoxP3 aus, welche schalten sie aus? Wieder sind die Faktoren IL-2 und TGF- β , sowie IL-7 und IL-15 in den Vordergrund der Überlegungen gerückt [42, 95]. Das Zusammenspiel mit dem Transkriptionsfaktor NFAT bei der Regulation von FoxP3 wurde ebenfalls untersucht [96], die genauen Zusammenhänge konnten bislang jedoch noch nicht eindeutig herausgearbeitet werden.

Auch gibt es neben den FoxP3+ Treg-Zellen scheinbar noch viele weitere Immunzellen, die in der Lage sind Treg-Zell ähnliche Funktion auszuüben, die jedoch kein FoxP3 auf ihre Oberfläche exprimieren [51, 97] [42]. Wie groß ist deren Einfluss auf die Tumorgenese? Wie kann man sie identifizieren oder, um es in Shevach's Worten zu sagen: durch welche „Geschmackssorte“ werde sie charakterisiert [97]?

Zusammenfassend lässt sich demnach festhalten, dass obwohl FoxP3+ als reproduzierbarer, gut abgrenzbarer und wissenschaftlich fundierter Oberflächenmarker für Treg-Zellen angesehen werden kann, der Einfluss von anderen Treg-Zell Untergruppen [42, 97] durch diesen Oberflächenmarker nicht dargestellt wird. Auch gibt es Hinweise darauf, dass FoxP3 zusätzlich noch in vielen weiteren immunologischen relevanten Prozessen eine Rolle spielt und neben der Induktion von Treg-Zellen auch an inhibitorischen Prozessen in manchen Tumoren beteiligt sein könnte [42, 90-92].

6 Ausblick - Entwicklung einer Tumor- Immunotherapie

Die im Rahmen dieser Studie erlangten Erkenntnisse sind nicht in der Lage eine direkte therapeutische Konsequenz zu offerieren. Dennoch fügen sie sich in einen großen Gesamtkomplex an wissenschaftlichen Bemühungen ein, der darauf abzielt in Zukunft gezielte immunotherapeutische Maßnahmen zur Therapie von Ovarialkarzinomen entwickeln zu können. Die bislang zu diesem Thema erschienenen Arbeiten verfolgen viele verschiedene Ansätze, deren Darlegung sicherlich den Rahmen dieses Ausblicks übersteigen würden. Dennoch sei an dieser Stelle ein Blick auf die mögliche therapeutische Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse gewagt.

6.1 CTLA4 Blockade

Im Zuge der T-Zell Aktivierung ist einer der entscheidenden Schritte, der zwischen Dendritischen Zellen (B7- Familie), sowie T-Zellen (CD28- Rezeptorfamilie) stattfindende B7-1/B7-2:CD28/CTLA4 Aktivierungspfad, der letztlich zur Expression der IL2R α Kette (CD25+) des IL2 Rezeptors führt (siehe hierzu auch Anhang 1). Nur bei Ausbildung dieses Rezeptors ist der T-Zell Klon im Stande sich zu replizieren. Hierbei ist wichtig anzumerken, dass Dendritische Zellen, im Rahmen dieses kostimulatorischen Dialogs, sowohl aktivierende als auch hemmende Signale auf die T-Zelle ausüben können. Der CTLA4 Rezeptor ist hierbei der entscheidende negative Regulationsmechanismus, durch den Dendritische Zellen, eine überschießende T-Zell Aktivierung verhindern können. Somit kooperieren Dendritische Zellen mit Treg-Zellen hinsichtlich der Hemmung der CD8⁺ T-Zellen; potentiell auch im Falle einer gegen das Tumorgewebe gerichteten Immunreaktion. Die Blockade des CTLA4 Rezeptors kann somit als potentiellen Angriffspunkt einer onkologischen Immuntherapie genutzt werden, wie Queszada et al. jüngst nachweisen konnten [98].

6.2 B7-H1 Rezeptor Blockade

Es ist sehr wahrscheinlich, dass Tumoren, Dendritische Zellen und Treg-Zellen in der Lage sind, durch Überexpression des B7-H1 Rezeptors, selbst aktiv die T- Zell Aktivierung zu verhindern und dadurch eine Immunantwort des Körpers einzudämmen [84, 99] [72]. Tumoren sind weiterhin in

der Lage, durch Expression des B7-H1 Rezeptors, sowie durch Aktivierung dieses Rezeptors auf Dendritischen Zellen, die Apoptose von T-Zellen direkt zu triggern [50-51]. Die Blockade des B7-H4 Rezeptors führt, laut einer Studie von Kryczek et al., sowie einer Arbeit von Zou et al., zu einer deutlichen Steigerung der CD8+ Zell Zahlen sowie zur Tumorregression [50-51].

6.3 CD4+ Stimulation

Bei ihrer Aktivierung, muss die CD8+ T-Zelle durch zwei Signale stimuliert werden (siehe hierzu auch Anhang 1). Beim Fehlen einer Infektion sind CD8+ T-Zellen demnach auf die Stimulation durch CD4+T-Helferzellen angewiesen [100]. Dudley et al. beschrieben bereits 2002 die Übertragung von in vitro geklonter, gegen Tumor Antigene gerichteter CD4+ T- Helfer Zellen auf Patienten mit metastasiertem Melanom und darauffolgender Tumorregression [101]. Wong et al. konnten in einer Arbeit aus dem Jahre 2008 [102] zeigen, wie es durch in vitro gegen Tumorantigene gerichtete CD4+ T-Zellen möglich ist, die Anzahl von CD8+ T-Zellen im Tumorgewebe zu erhöhen. In einer kürzlich erschienenen Arbeit gelang es nun auch Xie et al., mittels in vitro aktivierter CD4+ T-Zellen, eine Tumorregression bei Melanompatienten nachzuweisen [103]. Quezada verfolgte einen ähnlichen Ansatz, bei dem die CD4+ T-Zellen jedoch nicht im Vorfeld in vitro vorbehandelt werden mussten. Er konnte am Mausmodell nachweisen, dass der Transfer von naiven CD4+ T-Zellen, bei lymphopenischen Empfängern, zu einer T-Zell Expansion mit anschließender Tumorregression führt [98].

6.4 VEGF Rezeptor Blockade

Vielversprechend ist auch der Angriffspunkt am Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) Rezeptor. Dieser wird häufig von Tumorzellen exprimiert, die dadurch in der Lage sind, eine Gefäßeinsprossung ins Tumorgewebe zu bewirken und die Versorgung des Tumors zu sichern. Zusätzlich dazu wird durch VEGF auch die Aktivierung von Dendritischen Zellen und deren Antigenpräsentation gehemmt [50]. Dieser Zusammenhang wurde auch schon in einem von Zhang et al. veröffentlichten Paper zum Ovarialkarzinom klar nachgewiesen [69]. Leider blieb bisher die therapeutische Blockade des VEGF Faktors beim Ovarialkarzinom ohne herausragenden Erfolg.

6.5 *INF- Gamma*

Interferon γ (INF- γ), wird von CD8+ T-Zellen produziert und ist an der Unterdrückung der Treg-Zell Funktion maßgeblich beteiligt (siehe hierzu auch Anhang 3). Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen an INF- γ , beispielsweise durch lokale Applikation in Tumornähe, zu einer Unterdrückung der Treg-Zell Funktion und folglich einer verbesserten Tumorcarence führt [104].

6.6 *Anti- CD4+ Antikörper/ Eliminationstherapie mit Denileukin difitox (ONTAK)*

Die direkte, lokale anti-Treg Therapie mittels eines anti-CD4- Antikörpers führte bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen zu einem Anstieg der Infiltration des Tumors durch CD8+ T-Zellen, zu einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ , TNF- β und IL-6, sowie zur Tumorelimination [105]. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangte auch die Forschungsgruppe von Barnett et al., sowie Mahnke et al., die, durch die Verwendung des Medikaments ONTAK bei Melanompatienten, eine Reduktion der Treg- Zell Anzahl und eine Erhöhung der CD8+ T- Effektorzellzahl erreichen konnten [48, 106]. Bislang umstritten ist jedoch in wie weit es zu systemischen Nebenwirkungen auf Grund des generalisierten CD4+ Funktionsverlust mit Ausfall aller weiteren, neben den Treg-Zellen bestehenden T-Helferzell- Populationen kommt. In mit Diphtheria Toxin behandelten Mäusen kam es zwar zur spezifischen Elimination von FoxP3+ Treg-Zellen, diese entwickelten daraufhin jedoch tödliche Autoimmunerkrankungen [107].

6.7 *TNF- Beta und IL-10 Blockade*

Ein großer Teil der Forschungsarbeit hat sich in den letzten Jahren auf die Blockade, der für Treg-Zellen typischen Stoffe TNF- β und IL-10 konzentriert. Die Blockade von IL-10 und TGF- β führte auch bei lokaler Applikation in direkter Nähe zum fortgeschrittenen Tumor, zu einer Umkehr der durch CD4+CD25+FoxP3+ Treg-Zellen induzierten Suppression von CD8+ zytotoxischen T-Zellen. [52, 75-76, 105-106]. Darüber hinaus zeigte sich, dass die verbliebenen CD8+ T-Zellen im Stande waren ein Anti-Tumorgedächtnis auszubilden [94, 105]. Interessanter Weise scheint dieses Tumorgedächtnis kreuzreaktiv auch für Tumoren anderen Ursprungs sensibilisiert zu werden [108].

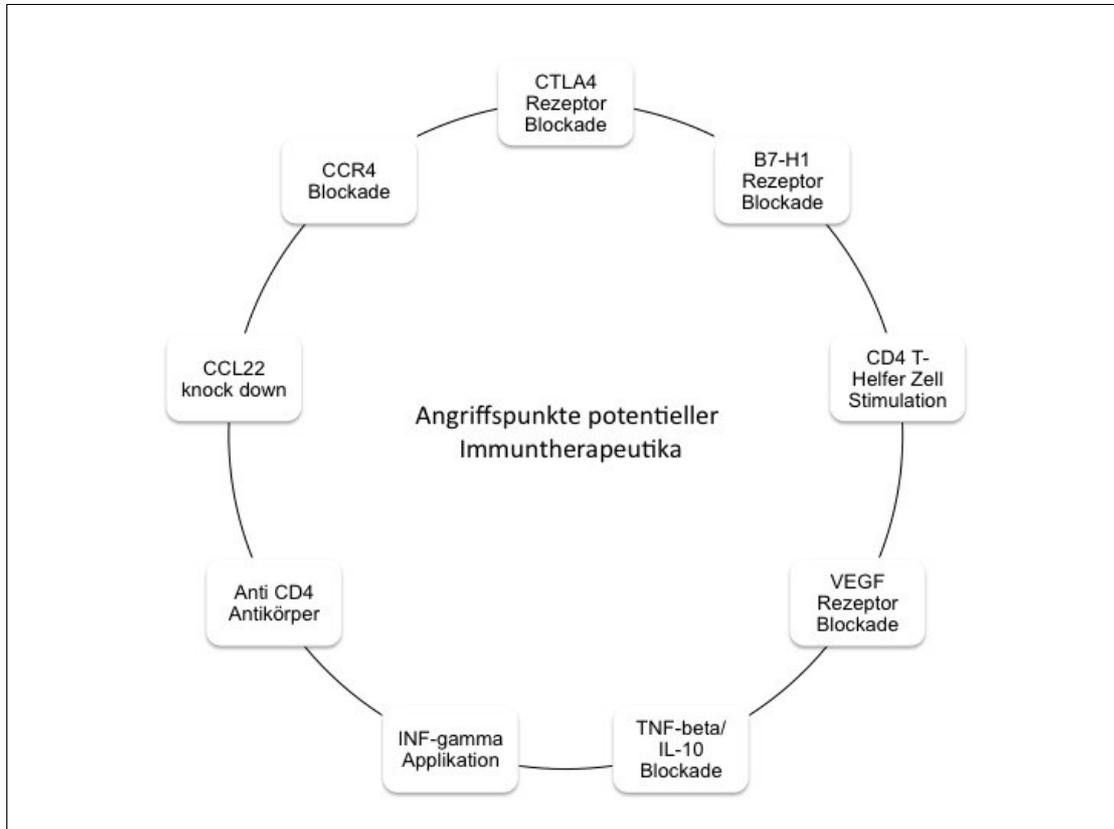
6.8 *Anti CCR4 Antikörper*

Der CCR4 Rezeptor wird vermehrt auf Treg- Zellen exprimiert und spielt im Zuge der Chemotaxis, des CCL22 vermittelten „Trafficking“ der Treg Zellen zum Tumor hin eine entscheidende Rolle [63, 74]. Durch die Applikation von Anti-CCR4 Antikörpern, konnten Treg-Zellen und Tumorzellen, die durch Expression des CCR4 Rezeptors Treg-ähnliche Funktionen aufwiesen, bei Lymphom und Leukämiepatienten eliminiert werden, sowie der suppressive Effekt auf das Immunsystem aufgehoben werden [61].

6.9 *CCL22 „knock-down“*

Die herausragende Bedeutung des Chemokins CCL22 für die Entwicklung des Ovarialkarzinoms und damit letztlich auch für das Überleben der Patientin, wurde in dieser und in vielem weiteren Arbeiten ausführlich dargelegt. Kang et al. konnten nun Anfang des Jahres 2010, erstmals, einen „targeted knock down“ der Chemokine CCL22 und CCL17 erzwingen. Zunächst wiesen sie nochmals nach, dass diese Chemokine maßgeblich an der Rekrutierung von CD4+, CD8+ und CD4+CD25+FoxP3+ Zellen beteiligt sind. Am Mausmodell konnte dann, durch die Injektion von siRNA, sowohl die absolute Anzahl von Treg-Zellen, als auch der CD4+ zu CD8+ Ratio reduziert werden, wohingegen die CD8+ T-Zellen vermehrt den Tumor infiltrierten [89]. Diese Aussicht auf eine mögliche Strategie zur Entwicklung einer Impfung oder Tumor Immunotherapie, weckt, in Anbetracht der hier vorgelegten Ergebnisse, Hoffnung darauf, dass die wirkungsvolle Bekämpfung des Ovarialkarzinoms endlich in greifbare Nähe rückt.

Abbildung 10: Angriffspunkte potentieller Immuntherapeutika



Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom steht an fünfter Stelle der Inzidenzen aller bösartiger Neubildungen der Frauen, nach Brust-, Darm-, Lungen- und Gebärmutterkörperkrebs. Laut Schätzungen des Robert-Koch-Instituts wurden in Deutschland, allein im Jahr 2006, 9.670 Neuerkrankungen verzeichnet. Es ist die tödlichste Tumorerkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane. Bislang konnte noch kein effektives Screeningverfahren entwickelt werden und die Diagnosestellung erfolgt daher meist erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Die Heilungschancen liegen im FIGO Stadium III bereits bei unter 10%. Auffällig ist jedoch, dass einige wenige Patientinnen, trotz Diagnosestellung im fortgeschrittenen Krankheitsstadium und identischer angewandter therapeutischer Maßnahmen, deutlich länger überleben als die Vergleichsgruppe.

Bereits Ende der 90er Jahre wurden Tumore dahingehend untersucht, ob das Immunsystem Einfluss auf das Tumorwachstum und letztlich das Überleben eines Patienten nimmt. Im Zuge dieser Untersuchungen konnten stetig neue, mögliche Einflussfaktoren identifiziert werden und wurden neue, präzisere Methoden zur Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen entwickelt. Es zeigte sich, dass das Immunsystem sehr wohl im Stande ist Tumoren zu erkennen und mittels zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen zu bekämpfen, es jedoch bei manchen Patienten einen bislang unbekanntem Mechanismus geben muss, der diese Reaktion unterdrückt. Endlich gelang es eine CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zell Untergruppe zu isolieren, kurz Treg-Zellen genannt, die eine inhibitorische Funktion auf das Immunsystem ausüben kann und dadurch eine effektive Tumorabwehr durch das Immunsystem unterbindet. Neben der Expression des Forkhead Box Protein 3 Transkriptionsfaktors (FoxP3) sind die Treg-Zellen auch durch die Expression des CCR4 Rezeptors charakterisiert. Dieser Rezeptor ist für das Chemokin CCL22 spezifisch, das möglicherweise, als Botenstoff, von Makrophagen und dem Tumorgewebe ausgeschüttet wird und die Treg-Zell Migration zum Tumorgewebe hin reguliert.

Ziel diese Arbeit war es, anhand eines großen Patientenkollektivs, einen möglichen Einfluss der CD8⁺ T-Effektorzellen und Treg-Zellen bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom im FIGO Stadium III nachzuweisen. Darüber hinaus wurden die Präparate hinsichtlich des Verteilungsmusters und der Tumordinfiltration der Treg-Zellen, der CD8⁺ Effektor Zellen und des Chemokins CCL22

untersucht. Neben der Untersuchung der Überlebenszeit, wurde auch der Einfluss auf gängige Prognosefaktoren wie Grading und histologischen Typ quantifiziert. Letztlich wurden die Präparate noch hinsichtlich der Expression von CCL22 und FoxP3 auf Tumorzellen beurteilt.

FoxP3+ Zellen waren relativ viel häufiger im Tumorgewebe vorzufinden als CD8+ Zellen. Beide Zellarten waren teilweise peripher, sowie teilweise gleichmäßig verteilt im Präparat aufzufinden. CCL22+ Zellen sammelten sich hingegen bevorzugt im peripheren Stroma, häufig in unmittelbarer Nähe zu Lymphfollikeln, an. Der Zusammenhang zwischen der Ansammlung von FoxP3+ Zellen, sowie CD8+ T-Zell Ansammlung im Tumorgewebe und CCL22+ Zellen konnte bestätigt werden. Auch war die absolute Anzahl der einzelnen Zellen entscheidend für deren Infiltration ins Tumorgewebe. Ein Zusammenhang zwischen dem Verhältnis von CD8+ Zellen zu FoxP3+ Zellen zum Grading wurde nachgewiesen (CD8:FoxP3-Ratio). Auch die Ansammlung der CD8+ T-Zellen in der Peripherie war mit einer höheren Gradingklasse assoziiert. Als weitere, prognostisch wichtige Faktoren wurden das Alter bei Diagnosestellung, sowie die OP-Radikalität identifiziert. Zwischen der Verteilung der FoxP3+ Zellen, sowie der CD8+ T-Effektor Zellen und dem Überleben konnte ein signifikantes Ergebnis errechnet werden, das auch der multivariaten Cox Regression stand hielt. Eine Ansammlung der Zellen in der Peripherie des Präparates führt demnach zu einer geringeren gegen das Tumorgewebe gerichteten Immunreaktion, ungehindertem Tumorwachstum und verringerten Überlebenszeit. Diese herausragende Bedeutung der genauen Lage der Immunzellen im Präparat wurde bislang erst von sehr wenigen Autoren beschrieben. Die reine Auswertung der Anzahl einer Zellpopulation erscheint, angesichts der vorliegenden Ergebnisse, weniger präzise Aussagen zuzulassen, als die exakte Differenzierung der Präparate hinsichtlich des Verteilungsmusters der Zellen. Erstaunlich deutlich war der direkte Zusammenhang zwischen CCL22 Ansammlung im Tumorgewebe zum Überleben nachweisbar. Patientinnen, deren Tumorgewebe nicht durch CCL22+ Zellen infiltriert wird, haben signifikant schlechtere Überlebenschancen als jene, in deren Gewebe dieser Nachweis positiv ausfällt. Dieser Fund spricht dafür, dass dem Chemokin CCL22 eine weitaus bedeutendere Funktion im Rahmen der Tumorimmunologie zufällt, als bislang angenommen wurde. Der Einfluss, den CCL22 im Rahmen der Tumorimmunologie spielt, beschränkt sich scheinbar nicht auf die Treg-Zellen. Entscheidend ist auch, dass ein allgemeingültiges Vorgehen bei Tumoren unterschiedlichen Ursprungs kritisch beurteilt werden muss, da die Untersuchungen verschiedenartiger Gewebepreparate zu konträren Ergebnissen geführt hat. So konnte beim Ovarialkarzinom weder eine CCL22, noch eine FoxP3+ Expression durch Tumorzellen festgestellt werden, die jedoch für andere Gewebetypen berichtet

Zusammenfassung

wurden. Angesichts der in jüngster Zeit erstmals durchgeführten therapeutischen Intervention mit Stoffen, die sich gegen das Chemokin CCL22 und den CCR4 Rezeptor richten, ist der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Zusammenhang zwischen CCL22 und dem Überleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom als besonders bedeutend anzusehen.

Anhang

1 Einführung in die T-Zell Entwicklung

Die, zur Unterscheidung immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen, etablierte Nomenklatur des Cluster of Differentiation ist logisch strukturiert; dennoch besteht ob der Vielzahl an Rezeptoren und Differenzierungsmöglichkeiten häufig Verwirrung beim Leser und auch in der Fachliteratur. Die von Autoren aus Praktikabilität verwendeten Abkürzungen erleichtern zwar den Lesefluss, sind jedoch nicht standardisiert und mannigfaltig formuliert. Aus diesem Grund bemüht sich der folgende Absatz darum, einen kurzen Rückblick über die T-Zell Entwicklung und einen überschaubaren Überblick, über die am häufigsten verwendete Abkürzungen, zu geben.

Die unterschiedlichen Reife- und Differenzierungsgrade der Thymozyten lassen sich anhand der T-Zell spezifischen Oberflächenmarker CD4+, CD8+ und CD3+, sowie des T-Zell-Rezeptors (TCR) nachvollziehen. Im Zuge der Reifung der T-Zellen im Thymus werden, erst durch Positivselektion und anschließend durch Negativselektion, die T-Zellen selektioniert, welche einen funktionierenden T-Zell Rezeptor ausgebildet haben und mit MHCI oder MHCII eine Bindung eingehen, ohne dabei mit hoher Affinität auf Selbst- Antigene zu reagieren. Als naive T-Zellen, mit den Oberflächenstrukturen CD3+CD4+ $\alpha\beta$ TCR oder CD3+CD8+ $\alpha\beta$ TCR, verlassen sie den Thymus um im Körper durch Antigenkontakt aktiviert zu werden. Neben diesen zwei großen T-Zell Klassen werden noch drei weitere Subtypen von T-Zellen aus dem Thymus entlassen: die Gruppe der CD4-CD8- $\gamma\delta$ TCR Zellen, sowie die regulatorischen CD3+CD4+CD25+ bzw. seltener CD3+CD8+CD25+ natürlichen regulatorischen T-Zellen (nTreg) [36, 39] .

Entwicklung der CD3+CD8+ $\alpha\beta$ TCR Zelle

Die CD3+CD8+ $\alpha\beta$ TCR Zelle, im Rahmen dieser Arbeit kurz CD8+ T-Zelle genannt, benötigt in der Entwicklung zur zytotoxischen T-Zelle zwei Signale. Zunächst wieder die Antigenpräsentation mittels eines MHCI- Klasse Komplexes. Im weiteren Verlauf folgt eine indirekte Kostimulation, beispielsweise durch Dendritische Zellen oder durch T-Helferzellen[36]. Erst dann kommt es zur Expression der IL2R α Kette (CD25+), die zum Aufbau des IL2 Rezeptors und zur klonalen Expansion führt. Es ist wichtig festzuhalten, dass in Abwesenheit von Infektionen eine CD8+ Aktivierung nur mit Hilfe von aktivierten CD4+ T-Helferzellen möglich ist. Dieser Umstand ist

momentan Gegenstand laufender Forschungsbemühungen, da er die Möglichkeit eröffnet, aktiv gegen den Tumor gerichtete CD4⁺ T-Helferzellen zur CD8⁺ Aktivierung zu nutzen [101-102] [103].

Entwicklung der CD3⁺CD4⁺ αβTCR Zelle und CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ Zelle

Im Zuge ihrer Aktivierung entwickeln sich aus den naiven CD4⁺ T-Zellen, nach dem von Bretscher und Cohn bereits 1970 veröffentlichten „Zwei Signal Model“ [35], im kostimulatorischen Dialog mit Antigen Präsentierenden Zellen (APC), aktivierte T- Helferzellen. Zunächst erfolgt die Antigenpräsentation durch die APC mittels des MHCII -Klasse Moleküls. Anschließend treten APC und T-Zelle in den sogenannten „kostimulatorischen Dialog“ ein. Einer der hierfür bislang am besten nachvollzogenen Interaktion ist, der zwischen dendritischen Zellen (B7- Familie), sowie T-Zellen (CD28- Rezeptorfamilie) stattfindende B7-1/B-7:CD28/CTLA4 Aktivierungspfad, der letztlich zur Expression der IL2Rα Kette (CD25⁺) des IL2 Rezeptors führt. Die klonale Expansion der T-Zelle basiert auf der Expression dieses entscheidenden IL2 Rezeptors. Viele der bislang verfolgten therapeutischen Ansätze basieren auf der Beeinflussung dieser entscheidenden Zellinteraktion.

Je nach Muster der Oberflächenrezeptoren und sezernierten Zytokine, lassen sich die CD4⁺ T-Helferzellen in vier weitere Klassen unterteilen, denen unterschiedliche Aufgaben im Rahmen der Immunreaktion zukommen. So werden T- Helferzellen 1 durch den Transkriptionsfaktor Tbet charakterisiert, sezernieren Interferon γ (INF γ) und spielen bei der Aktivierung von Makrophagen eine tragende Rolle. T-Helferzellen 2 wiederum exprimieren den für sie spezifischen Transkriptionsfaktor GATA-3, sezernieren unter anderem IL-4, IL-5 und IL-10 und spielen bei der Aktivierung von B-Zellen eine tragende Rolle. T-Helferzellen 17 sind nach dem für sie charakteristischen IL-17 benannt, welches im Rahmen der Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten von Bedeutung ist. Schließlich die CD4⁺CD25⁺ exprimierende T-Zellen, welche die hauptsächliche Masse der Treg-Zellen darstellen und durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert sind (iTreg). Neuere Studien belegen den Zusammenhang der Entstehung von iTreg aus naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch Stimulation des T-Zell- Rezeptors mit TGF-β [42, 45] [49, 86] . Bezüglich der Funktionsfähigkeit dieser, in der Peripherie aktivierten, iTreg herrschen noch unterschiedliche Meinungen. Während eine Reihe von Studien deren Funktion als Suppressorzellen belegen [42, 97] , zweifeln andere daran ob alle CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ bzw. CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen auch tatsächlich als Treg-Zellen fungieren können [47] . Erstaunlicher Weise konnte auch bei einer sehr geringen Anzahl von CD4⁺CD25-

bzw. CD8+CD25- Zellen der Transkriptionsfaktor FoxP3 nachgewiesen werden [37, 42] . Ob diese Zellen auch in der Lage sind suppressive Immunreaktionen zu modulieren und demzufolge den Treg-Zellen zugeordnet werden dürfen, wird unterschiedlich bewertet. So beobachtete Fontenot et al.[88] ursprünglich Treg-spezifische Eigenschaften an dieser Subpopulation, was von zwei kürzlich erschienen Arbeiten von Ahmadzadeh et al. [46], sowie von Kryczek et al. bestätigt wurde [109]. Morgan et al. [110] sowie Kmiecik et al. [47] hingegen konnten bei dieser Subpopulation keinerlei suppressive Eigenschaften belegen.

Abbildung 11: Die T-Zell Entwicklung

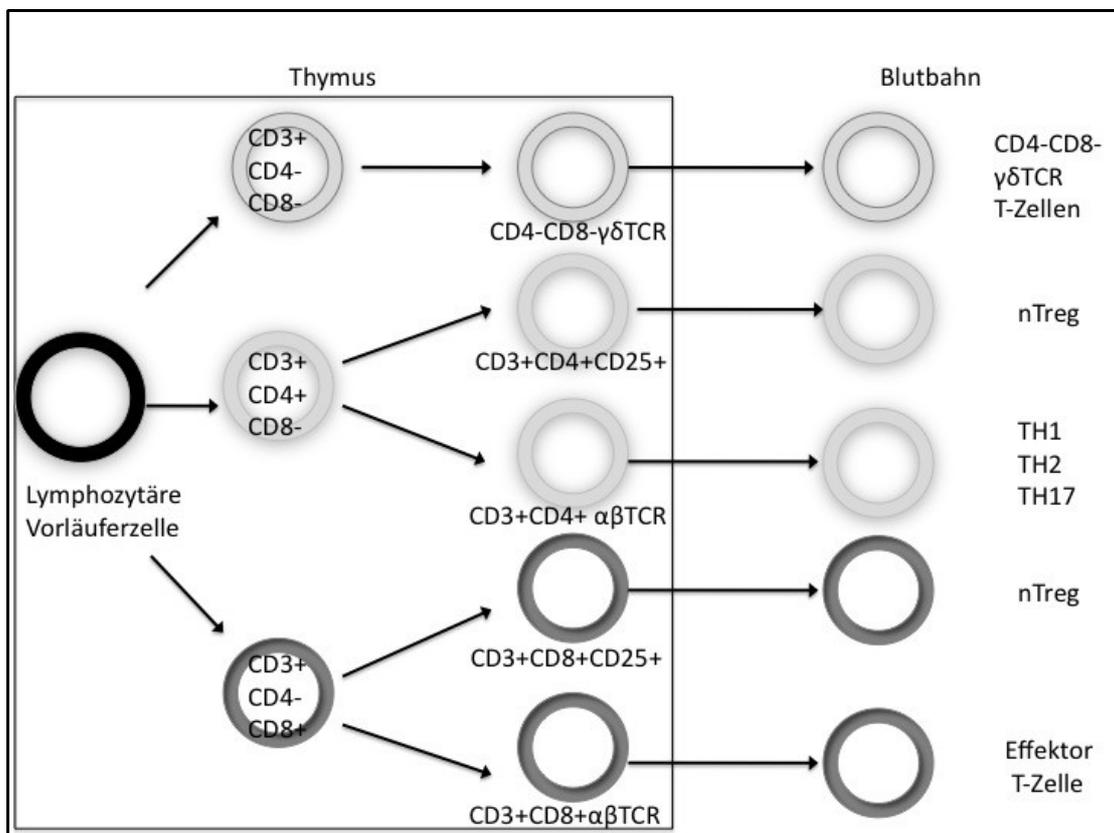
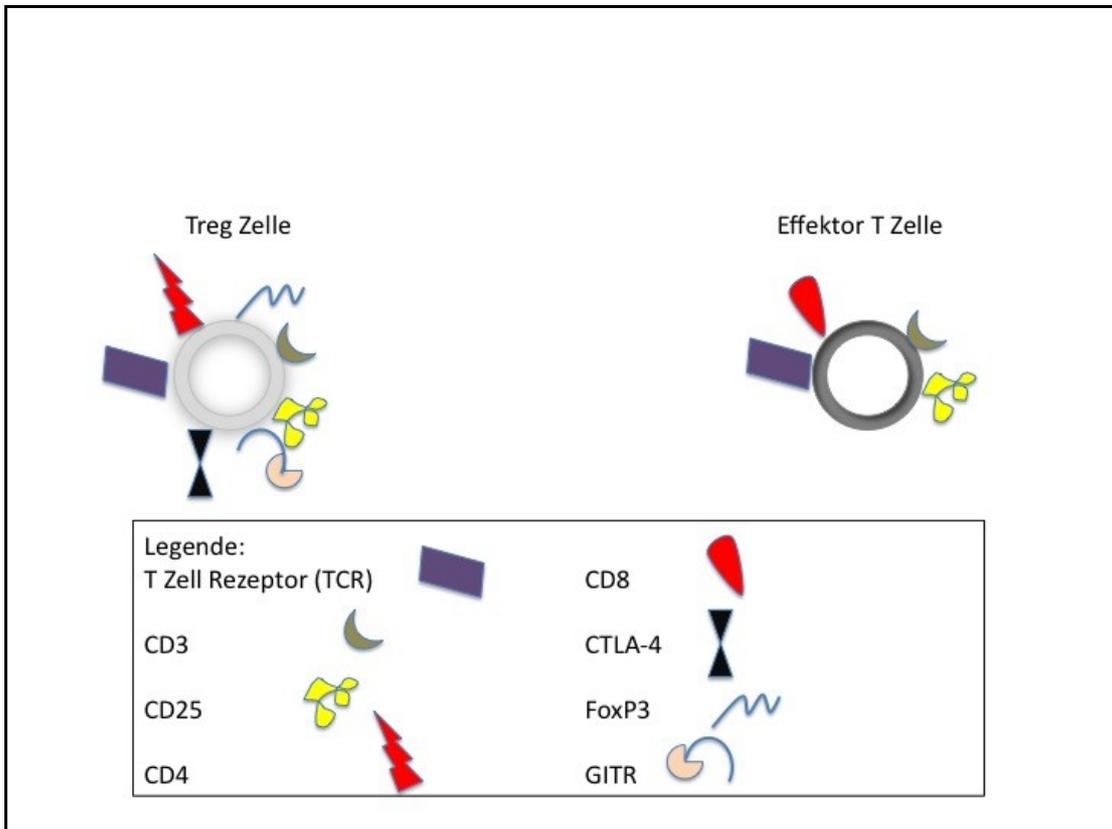


Abbildung 12: T-Effektor Zelle und Treg-Zell Rezeptoren



2 Funktionsmechanismen der Treg -Zellen

Im Zuge der durchgeführten Untersuchungen stellte sich die Frage nach den Funktionsmechanismen der Treg-Zellen. Da eine ausführliche Erläuterung dieser Mechanismen sicherlich den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, die Interpretation der hier vorgelegten Ergebnisse jedoch ein grundsätzliches Verständnis der Treg-Zell Funktion erfordern, folgt an dieser Stelle eine Übersicht über die bisherigen Erkenntnisse über die Methoden der Treg-Zellen.

Über die genauen Mechanismen mit denen Treg-Zellen die Funktion des Immunsystems hemmen, ist noch wenig Genaues bekannt. Es wird jedoch übereinstimmend vermutet, dass Treg-Zellen, durch gezielte Manipulation des immunologischen Milieus, eine aktiv gegen Tumorzellen gerichtete Immunreaktion unterdrücken können [42, 94] [46, 105]. Auf der einen Seite spielen hierbei die löslichen Faktoren IL-10, TGF- β und IL-2 eine Rolle, auf der anderen Seite lassen sich auch für die zellgebundenen Liganden CTLA4 und LAG3 ein Einfluss auf die T-Zell Proliferation nachweisen [36, 39].

IL-10, TGF-Beta, IL-2

Die Freisetzung der löslichen Faktoren Interleukin 10 (IL-10) und TGF- β (Tumor Growth Faktor Beta) gehört zu den am intensivsten erforschten Funktionsmechanismen der Treg-Zelle. IL-10 inhibiert die Aktivierung von Makrophagen. Außerdem wird die Differenzierung von CD4⁺ Zellen zu T-Helfer-Zellen inhibiert [39, 42] [80]. TGF- β unterdrückt direkt die Proliferation von T- und B-Zellen [39]. Zudem stellt das Vorhandensein von TGF- β eine Voraussetzung dafür da, dass Treg-Zellen weiterhin FoxP3 exprimieren [42]. Treg-Zellen sind mittels TGF- β , sowie IL-10 scheinbar auch in der Lage sich die Funktion von Dendritischen Zellen zu Nutze zu machen [83]. Dendritische Zellen können dann beispielsweise auch naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu aktiven CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen konvertieren[84]. Im Mausmodell konnte bereits der direkte Nachweis einer TGF- β induzierten Umwandlung von CD4⁺CD25⁻ zu iTreg erbracht werden, dieser Nachweis steht jedoch bei menschlichen T-Zellen noch aus [42, 49]. Interleukin-2 (IL-2) scheint ein weiterer Mechanismus zu sein, der die Treg-Zell Differenzierung reguliert und durch Rückkopplung mittels Dendritischer Zellen zur Aktivierung des FoxP3 in der Peripherie befindlicher naiver CD4⁺CD25⁻ T-Zellen führt [87]. Es konnte gezeigt werden, dass IL-2 hierbei, kein notwendiger Induktionsmechanismus der Treg- Zell Differenzierung, sondern vielmehr ein

Verstärkungsmechanismus der FoxP3 Induktion ist [42, 88]. Die durch Antigene vermittelte Stimulation von Effektor-T-Zellen, führt zu deren IL-2 Produktion, welches dann zur Aktivierung von FoxP3 bei naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen führt, die dann Rückkoppelnd als iTreg die Effektor-T-Zellen unterdrücken können [42].

CTLA4, LAG3 und weitere Mechanismen

Neben diesen komplexen Interaktionen von löslichen Treg-Zell Faktoren sind auch membranständige Rezeptoren Gegenstand momentaner wissenschaftlicher Diskussion. Auch hierbei ist die Interaktion zwischen Dendritischen Zellen und Treg- Zellen essentiell. So spielt das mit zytotoxischen T-Lymphozyten assoziierte Protein 4 (CTLA4) nicht nur in der Kontrolle der Aktivierung von naiven CD4⁺ Zellen eine entscheidende Rolle [94]. Weiterhin wird vermutet, dass Treg-Zellen via des CTLA4/CD80/CD86 Rezeptorpfades in der Lage sind Dendritische Zellen so zu konditionieren, dass diese Tryptophan/Kynurenin ausschüteten, welches wiederum als proapoptotisches Signal zur Unterdrückung der T- Effektor-Zellpopulation beiträgt [85, 95] . Zusätzlich dazu wird der CTLA4 Rezeptor auch benötigt, um die TGF- β - abhängige FoxP3 Expression zu vermitteln [42].

Das lymphocyte activation gene (LAG3) soll ebenfalls ein Mechanismus sein durch den, MHCII abhängig, Dendritische Zellen zu Nutzen der Treg Population umfunktioniert werden können [36]. Noch sind die genauen Mechanismen der Beeinflussung zwischen Treg-Zellen und Dendritischen Zellen jedoch weitestgehend unklar.

Neben diesen etablierten Mechanismen spielen noch viele andere, bislang wenig verstandene, Faktoren eine Rolle in dem komplexen Gefüge von Kontrolle und Stimulation, so zum Beispiel auch UV Lichteinstrahlung und Geschlechtshormone [42]. Cao et al. untersuchten als weiteren Mechanismus der Treg-Zell abhängigen Immunsupprimierung Granzym B und Perforin. Sie wiesen nach, dass Treg- Zellen in der Lage sind Perforin und auch Granzym B abhängig CD8⁺ T-Zellen und Natürliche Killer (NK-Zellen) zu vernichten und dadurch Tumorcarence zu verhindern [111]. Treg- Zellen werden hierzu durch einen noch unbekanntem Mechanismus vom Tumorgewebe aktiviert. Die Herausforderung der momentanen wissenschaftlichen Arbeit liegt darin, den wichtigsten Mechanismus zu identifizieren um gezielte therapeutische Intervention zu ermöglichen.

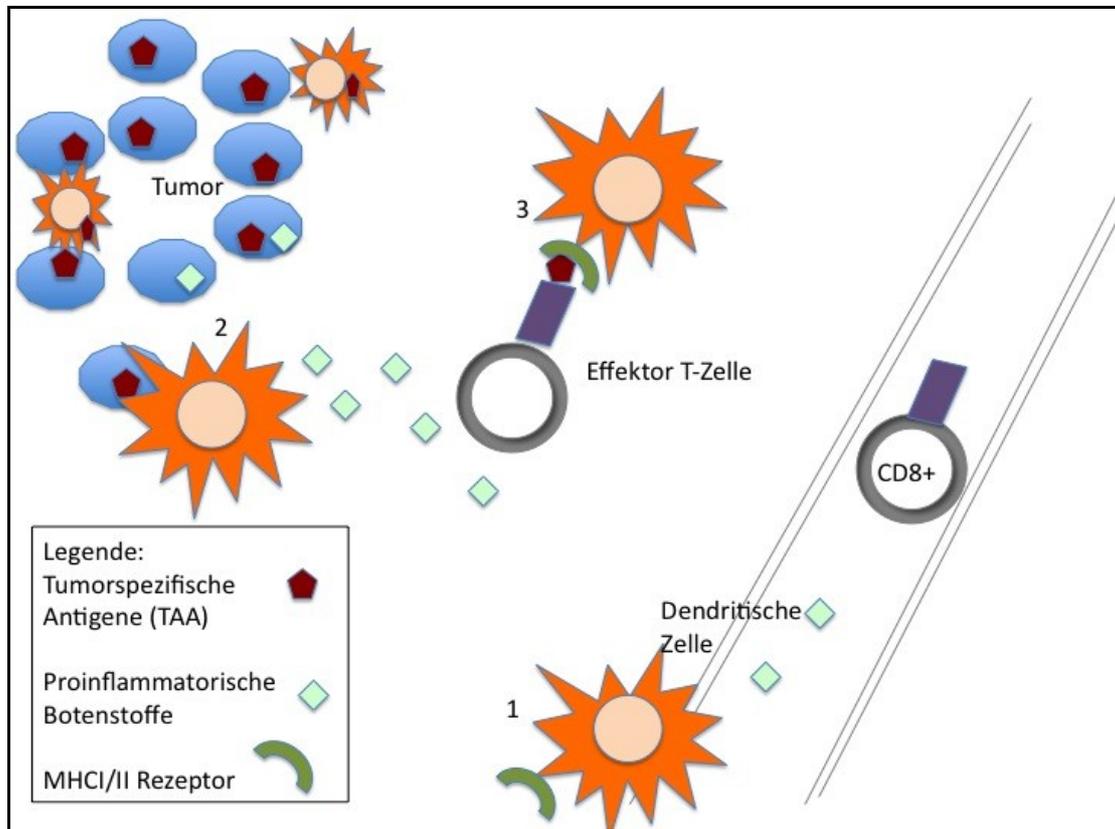
3 Funktionsmechanismen der CD8+ T-Zellen

Parallel zur Frage der Funktionsweise der Treg- Zellen, wird im anschließenden kurzen Absatz die Funktionsweise der CD8+ T-Zellen im Rahmen einer Tumorerkrankung dargelegt werden.

Kommt es im Zuge des Tumorwachstums zu einer deutlichen Entzündungsreaktion, greift das Konzept der Bystander Aktivierung. Die Infektion zerstört hierbei auch körpereigenes Gewebe, Antigene werden im Körper gestreut und veranlassen die Einwanderung von Dendritischen Zellen, sowie Natürlichen Killerzellen ins Tumorgewebe. Durch Zerstörung von körpereigenem Gewebe werden auch gewebespezifische Selbstantigene freigesetzt, die unter normalen Umständen nicht auftreten würden [36]. Dendritische Zellen phagozytieren diese Gewebereste und präsentieren sie naiven T- Zellen mittels MHC I/MHC II Molekülen, die sich so zu autoaggressiven T-Zellen weiterentwickeln. Gorelik und Flavell [52] zeigten, dass die MHC I vermittelte Präsentation von tumorassoziierten Antigenen zur Destruktion von Tumorzellen durch CD8+ T-Zellen führt. Die Zerstörung von Zellen durch CD8+ Zytotoxische Zellen folgt entweder dem Fas-FasL, oder dem durch Exozytose von Granzymen/Perforinen gesteuerten Pathway. Es Bedarf zur Aktivierung der CD8+ naiven T-Zellen, neben der Präsentation von Antigenen, einer massiven Stimulation der Toll-Like Rezeptoren von Dendritischen Zellen [39]. Es stellt sich die Frage danach, welche Adjuvantien gleichzeitig freigesetzt werden müssen, damit es tatsächlich zu einer solchen Aktivierung von autoreaktiven CD8+ Zellen kommt. Möglicherweise ist die im Zuge der Infektion auftretende Aktivierung von Natürlichen Killerzellen, die dann ihrerseits die Dendritischen Zellen stimulieren, essentiell. Dies würde auch das Fehlen einer hinreichenden Immunreaktion bei Patienten mit langsamer Tumorgenese, ohne Infektionsgeschehen, erklären [50]. Es wird unabhängig von diesen, durch Dendritische Zellen vermittelten Aktivierungswegen davon ausgegangen, dass allein die erhöhte Expression von Proteinen auf der Oberfläche von Tumoren, die Wahrscheinlichkeit der Reaktion einer naiven T-Zelle auf dieses Antigen erhöht [36]. Entgegengesetzt zu dieser These kommt es, mutmaßlich im Zuge der Tumorentwicklung, in manchen Fällen zu solch massiven Veränderungen, dass die Erkennung des pathologischen Gewebes durch das Immunsystem gar nicht mehr möglich ist (Ignoranz) [36]. Gerade diese Tumore werden nicht frühzeitig erkannt und eliminiert und können unbemerkt im Körper heranwachsen.

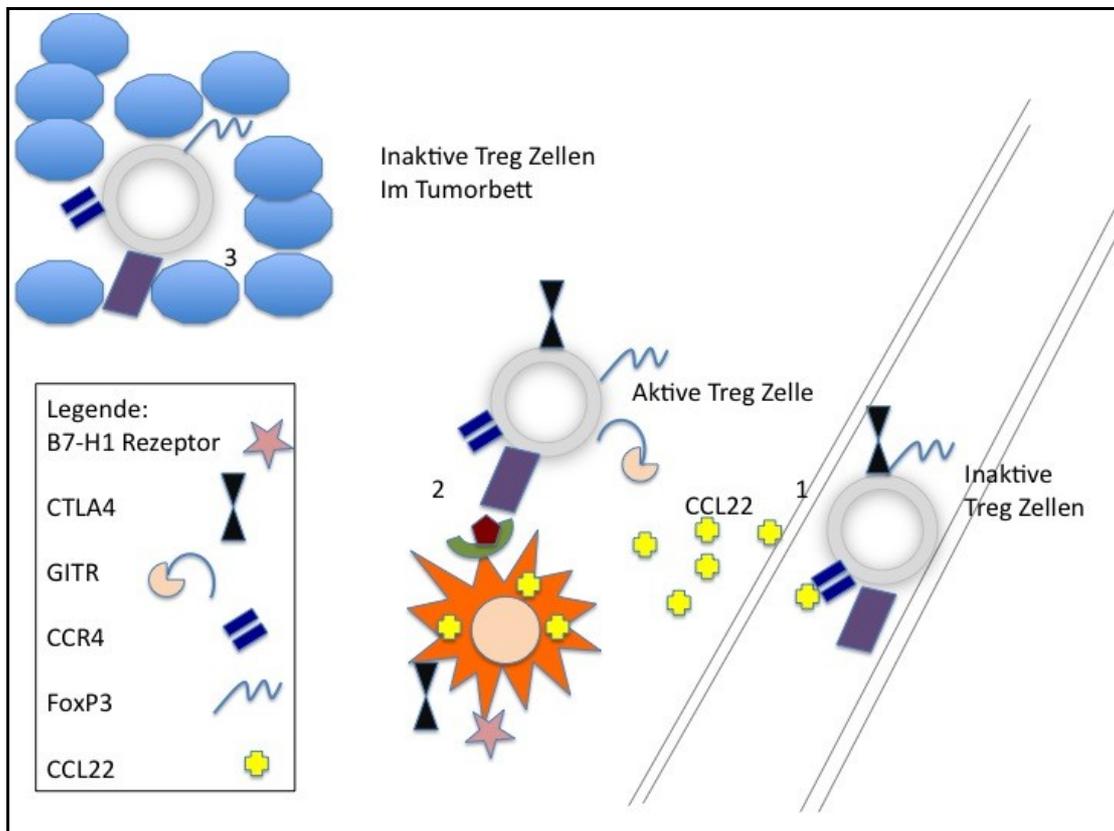
4 Schematische Darstellung der intrazellulären Kommunikation im Tumor: Migration, Aktivierung, Blockade

Abbildung 13: Migration der Effektor-T-Zellen und Dendritischen Zellen zum Tumor



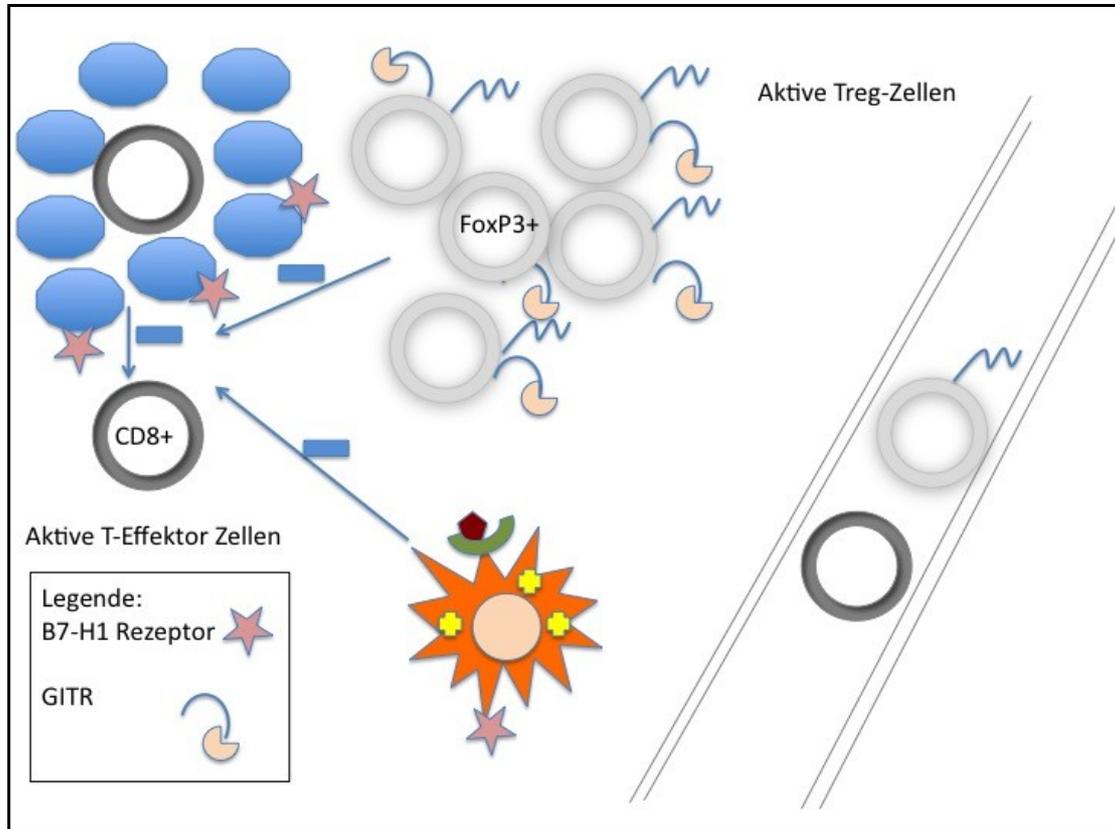
1. Antigenpräsentierende, Dendritische Zellen und Effektor T-Zellen wandern, durch inflammatorische Botenstoffe, T-Helfer-Zellen oder Natürliche Killerzellen induziert, in das Tumorgewebe ein.
2. Antigenpräsentierende Zellen phagozytieren Tumorreste (TAA) die sie auf MHC I bzw. MHC II Rezeptoren präsentieren können.
3. Effektor-T-Zelle und Antigenpräsentierende Zelle treten mittels T-Zell-Rezeptor (TCR) und MHC I Rezeptor in einen kostimulatorischen Dialog ein.

Abbildung 14: Treg-Zell Aktivierung



1. Dendritische Zellen schütten CCL22 ins Blut aus. Naive FoxP3+Treg-Zellen exprimieren den für CCL22 spezifischen CCR4 Rezeptor und wandern ins Tumorbett ein.
2. Mittels des MHCII-Rezeptors präsentiert die Dendritische Zelle der naiven Treg-Zelle das Tumorspezifische Antigen in lymphozytären Ansammlungen am Rand des Tumorbettes. Die Treg-Zelle wird im kostimulatorischen Dialog, mit Hilfe der Rezeptoren CTLA4/ B7H1, aktiviert und exprimiert nun auch den GIT-Rezeptor.
3. Im Tumorbett befinden sich weitere, jedoch inaktive FoxP3+Treg- Zellen.

Abbildung 15: Treg-Zellen und Dendritische Zellen unterdrücken die gegen Tumorzellen gerichtete Immunantwort



Die aktivierten Treg Zellen treten in lymphozytären Ansammlungen am Rand des Tumorbettes in die klonale Expansion ein. Durch Produktion von TNF- β , IL-10 und IL-2 sowie durch Expression des B7-H1 Rezeptors wird die Effektor-T-Zell Antwort unterdrückt. Gleichzeitig wird auf diese Weise das Tumorstadium, die Aktivierung von nTreg-Zellen und iTreg, sowie die pathologische Funktion der Dendritischen Zellen stimuliert.

5 Schematische Darstellung der einzelnen Zellfunktionen

Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Dendritischen Zellen, Tumorzellen, Effektor T-Zellen und Treg-Zelle im Tumormilieu.

Abbildung 16: Funktionsmechanismen Dendritische Zelle

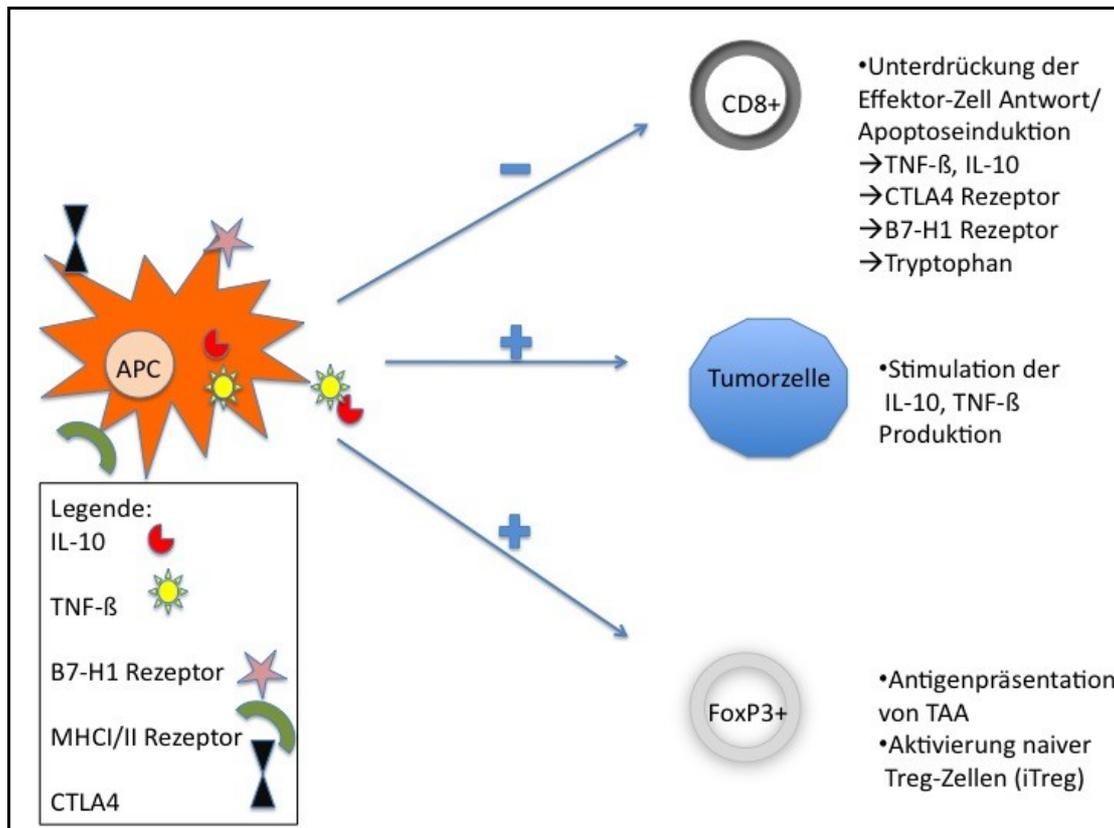


Abbildung 17: Funktionsmechanismen Tumor Zelle

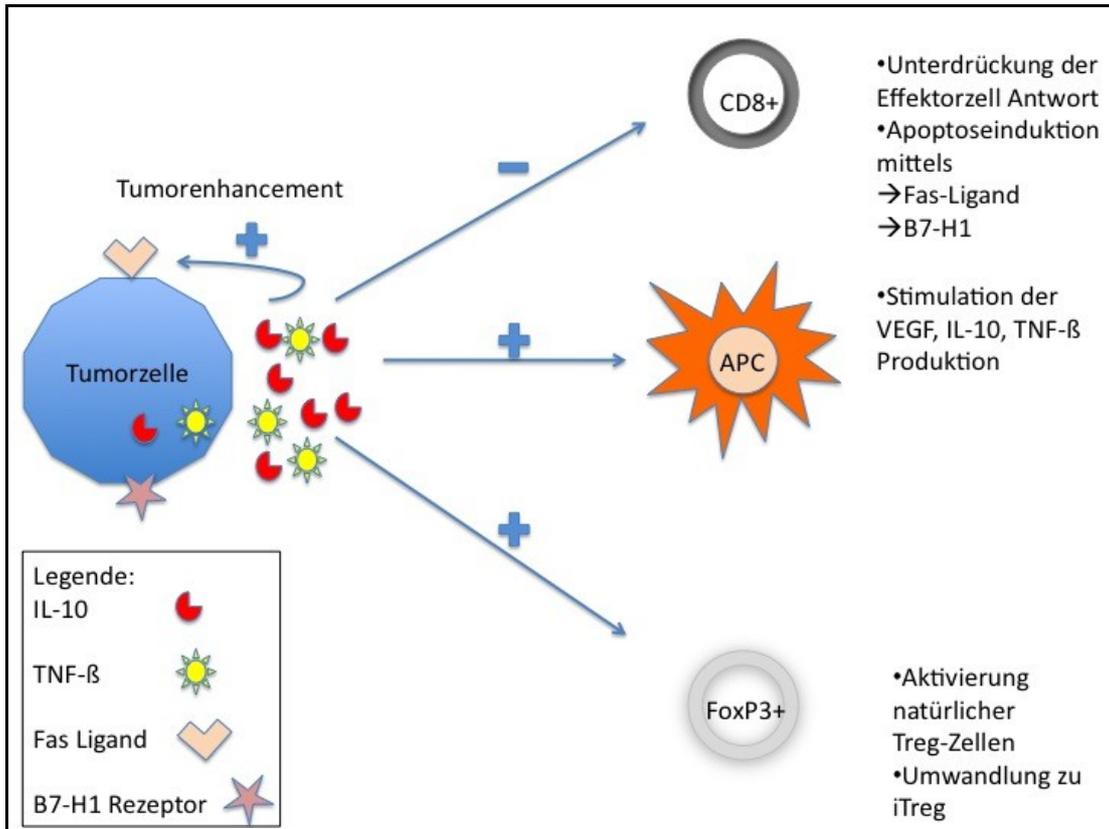


Abbildung 18: Funktionsmechanismen Treg- Zelle

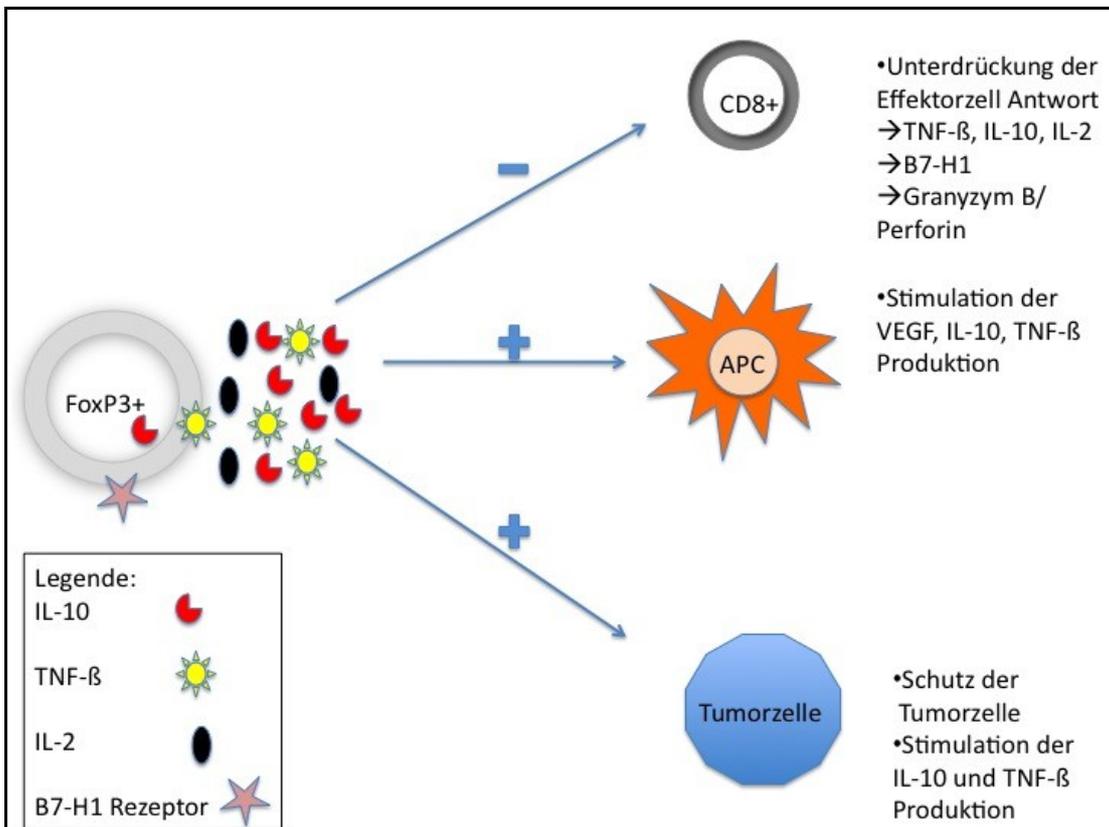
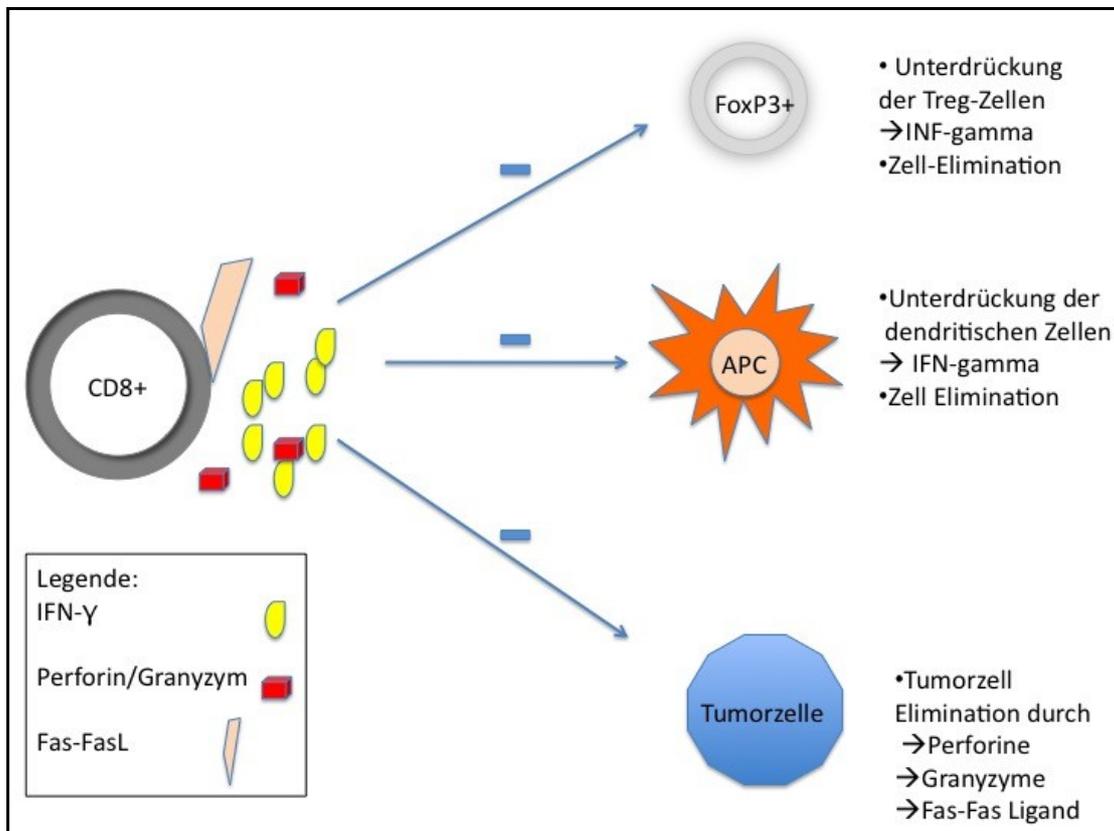


Abbildung 19: Funktionsmechanismen Effektor-T-Zelle



Literaturverzeichnis

1. Boyle, P. and B. Levin, *World Cancer Report*, World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, Editors. 2008, World Health Organization: IARC Press: Lyon.
2. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.(Hrsg). Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes., *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes.* 2010, Robert Koch Institut: Berlin.
3. Tavassoli, F.A. and P. Devilee, Editors. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs.* 2003, IARC Press: Lyon. 114-116.
4. Ovarialtumore, I.S.k.-L.f.d.D.u.T.m., *Herausgegeben von der Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. sowie der Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. sowie der Deutsche Krebsgesellschaft e.V.* 2006, überarbeitet 2007, W. Zuckschwerdt Verlag: München Wien New York. p. 76.
5. Schmalfeldt, B., Editor. *Manual maligne Ovarialtumore.* 2007, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München: München.
6. Remmele, W., et al., eds. *Pathologie Bd. 4. Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen; Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen; Tumoren des Kindesalters; Endokrine Organe (S. 90-123).* ed. W. Remmele. Vol. 2, neubearbeitete Auflage 1997. 1997, Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York.
7. Lynch, H.T., et al., *Hereditary ovarian carcinoma: Heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management.* *Molecular Oncology*, 2009. **3**(2): p. 97-137.
8. Hildreth, N.G., et al., *AN EPIDEMIOLOGIC-STUDY OF EPITHELIAL CARCINOMA OF THE OVARY.* *American Journal of Epidemiology*, 1981. **114**(3): p. 398-405.
9. Zhou, B., et al., *Hormone replacement therapy and ovarian cancer risk: A meta-analysis.* *Gynecologic Oncology*, 2008. **108**(3): p. 641-651.
10. Delort, L., et al., *Central adiposity as a major risk factor of ovarian cancer.* *Anticancer Res*,

2009. **29**(12): p. 5229-34.
11. Beral, V., et al., *Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23 257 women with ovarian cancer and 87 303 controls*. Lancet, 2008. **371**(9609): p. 303-314.
 12. Scully, R.E., R.H.Young, and P.B. Clement, eds. *Atlas of Tumor Pathology*. Tumors of the Ovary, Maldeveloped Gonads, Fallopian Tube, and Broad Ligament, ed. J. Rosai. 1998, Armed Forces Institut of Pathology: Washington D.C., USA. 1-527.
 13. Shih, I.M. and R.J. Kurman, *Ovarian tumorigenesis - A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. American Journal of Pathology, 2004. **164**(5): p. 1511-1518.
 14. Kurman, R.J. and T.G. McConnell, *Precursors of endometrial and ovarian carcinoma*. Virchows Archiv, 2010. **456**(1): p. 1-12.
 15. Mayr, D., et al., *KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: A comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants*. Gynecologic Oncology, 2006. **103**(3): p. 883-887.
 16. Gilks, C.B. and J. Prat, *Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances*. Human Pathology, 2009. **40**(9): p. 1213-1223.
 17. Chen, V.W., et al., *Pathology and classification of ovarian tumors*. Cancer, 2003. **97**(10): p. 2631-+.
 18. Scully, R.E., *World Health Organization International Histological Classification of Tumours- Histological Typing of Ovarian Tumours*. 2 ed. 1999, Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.
 19. Silverberg, S.G., *Histopathologic grading of ovarian carcinoma: A review and proposal*. International Journal of Gynecological Pathology, 2000. **19**(1): p. 7-15.
 20. Shimizu, Y., et al., *Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma - I. Prognostic significance of histopathologic features - Problems involved in the architectural grading system*. Gynecologic Oncology, 1998. **70**(1): p. 2-12.
 21. Kommoss, S., et al., *Histological grading in a large series of advanced stage ovarian carcinomas by three widely used grading systems: consistent lack of prognostic significance. A translational research subprotocol of a prospective randomized phase III study (AGO-OVAR 3 protocol)*. Virchows Archiv, 2009. **454**(3): p. 249-256.
 22. Malpica, A., *Grading of ovarian cancer: a histotype-specific approach*. Int J Gynecol

- Pathol, 2008. **27**(2): p. 175-81.
23. Mayr, D. and J. Diebold, *Grading of ovarian carcinomas*. International Journal of Gynecological Pathology, 2000. **19**(4): p. 348-353.
24. Shaw, P.A., et al., *Histopathologic features of genetically determined ovarian cancer*. International Journal of Gynecological Pathology, 2002. **21**(4): p. 407-411.
25. Kindelberger, D.W., et al., *Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship*. American Journal of Surgical Pathology, 2007. **31**(2): p. 161-169.
26. Vine, M.F., et al., *Characterization of prediagnostic symptoms among primary epithelial ovarian cancer cases and controls*. Gynecologic Oncology, 2003. **90**(1): p. 75-82.
27. Goff, B.A., et al., *Development of an ovarian cancer symptom index - Possibilities for earlier detection*. Cancer, 2007. **109**(2): p. 221-227.
28. Jacobs, I., et al., *PREVALENCE SCREENING FOR OVARIAN-CANCER IN POSTMENOPAUSAL WOMEN BY CA 125 MEASUREMENT AND ULTRASONOGRAPHY*. British Medical Journal, 1993. **306**(6884): p. 1030-1034.
29. Woodward, E.R., et al., *Annual surveillance by CA125 and transvaginal ultrasound for ovarian cancer in both high-risk and population risk women is ineffective*. Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2007. **114**(12): p. 1500-1509.
30. Kauff, N.D., et al., *Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: a multicenter, prospective study*. J Clin Oncol, 2008. **26**(8): p. 1331-7.
31. Tothill, R.W., et al., *Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5198-208.
32. North, R.J. and I. Bursuker, *Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells*. J Exp Med, 1984. **159**(5): p. 1295-311.
33. Awwad, M. and R.J. North, *Immunologically mediated regression of a murine lymphoma after treatment with anti-L3T4 antibody. A consequence of removing L3T4+ suppressor T cells from a host generating predominantly Lyt-2+ T cell-mediated immunity*. J Exp Med, 1988. **168**(6): p. 2193-206.
34. Sakaguchi, S., et al., *IMMUNOLOGICAL SELF-TOLERANCE MAINTAINED BY ACTIVATED T-CELLS EXPRESSING IL-2 RECEPTOR ALPHA-CHAINS (CD25) -*

- BREAKDOWN OF A SINGLE MECHANISM OF SELF-TOLERANCE CAUSES VARIOUS AUTOIMMUNE-DISEASES*. Journal of Immunology, 1995. **155**(3): p. 1151-1164.
35. Bretscher, P. and M. Cohn, *A theory of self-nonself discrimination*. Science, 1970. **169**(950): p. 1042-9.
36. B. Bröker and C. Schütt, *Grundwissen Immunologie*. 2009, Springer Verlag: Berlin.
37. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. Nature Immunology, 2003. **4**(4): p. 330-336.
38. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
39. Neumann, H.J., *Immunologie: Eine Einführung*. 2008.
40. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
41. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
42. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells in the past and for the future*. European Journal of Immunology, 2008. **38**(4): p. 901-903.
43. Clarke, S.L., et al., *CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer*. PLoS One, 2006. **1**: p. e129.
44. Feyler, S., et al., *CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+)CD4(-)CD8(-)alpha beta TCR+ Double Negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden*. British Journal of Haematology, 2009. **144**(5): p. 686-695.
45. Chen, W.J., et al., *Conversion of peripheral CD4(+)CD25(-) naive T cells to CD4(+)CD25(+) regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **198**(12): p. 1875-1886.
46. Ahmadzadeh, M., et al., *FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions*. Blood, 2008. **112**(13): p. 4953-4960.
47. Kmieciak, M., et al., *Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function*. Journal of Translational Medicine, 2009. **7**.

48. Barnett, B., et al., *Regulatory T cells in ovarian cancer: Biology and therapeutic potential*. American Journal of Reproductive Immunology, 2005. **54**(6): p. 369-377.
49. Liu, V.C., et al., *Tumor evasion of the immune system by converting CD4(+) CD25(-) T cells into CD4(+) CD25(+) T regulatory cells: Role of tumor-derived TGF-beta*. Journal of Immunology, 2007. **178**(5): p. 2883-2892.
50. Zou, W.P., *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(4): p. 263-274.
51. Kryczek, I., et al., *B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma*. Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(4): p. 871-881.
52. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells*. Nat Med, 2001. **7**(10): p. 1118-22.
53. Karanikas, V., et al., *Foxp3 expression in human cancer cells*. J Transl Med, 2008. **6**: p. 19.
54. Hinz, S., et al., *Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(17): p. 8344-50.
55. Ebert, L.M., et al., *The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 3001-9.
56. Singleton, P. and D. Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. 2006, John Wiley & Sons.
57. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nature Medicine, 2004. **10**(9): p. 942-949.
58. Shevach, E.M., *Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells*. Nature Medicine, 2004. **10**(9): p. 900-901.
59. 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*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(51): p. 18538-18543.
60. Mizukami, Y., et al., *CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3(+) regulatory T cells in gastric cancer*. International Journal of Cancer, 2008. **122**(10): p. 2286-2293.
61. Ishida, T. and R. Ueda, *CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer*. Cancer Science, 2006. **97**(11): p. 1139-1146.
62. Mailloux, A.W. and M.R.I. Young, *NK-Dependent Increases in CCL22 Secretion Selectively*

- Recruits Regulatory T Cells to the Tumor Microenvironment*. Journal of Immunology, 2009. **182**(5): p. 2753-2765.
63. Gobert, M., et al., *Regulatory T Cells Recruited through CCL22/CCR4 Are Selectively Activated in Lymphoid Infiltrates Surrounding Primary Breast Tumors and Lead to an Adverse Clinical Outcome*. Cancer Research, 2009. **69**(5): p. 2000-2009.
64. Tang, H.L. and J.G. Cyster, *Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells*. Science, 1999. **284**(5415): p. 819-22.
65. Vulcano, M., et al., *Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo*. Eur J Immunol, 2001. **31**(3): p. 812-22.
66. Boenisch, T., ed. *Immunohistochemical Staining Methods*. 3 ed. 2001, DAKO Cooperation: Carpinteria, USA. 1-64.
67. Laboratories, V., *Vectastain Universal Elite ABC Kit: Instructions for Immunohistochemical Staining*, V. Laboratories, Editor. 2006: Burlingame, USA.
68. Curiel, T.J., *Tregs and rethinking cancer immunotherapy*. Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(5): p. 1167-1174.
69. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(3): p. 203-213.
70. Ling, K.L., et al., *Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients*. Cancer Immun, 2007. **7**: p. 7.
71. Ropponen, K.M., et al., *Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer*. J Pathol, 1997. **182**(3): p. 318-24.
72. Ebel, K., et al. (2009) *Prostate cancer lesions are surrounded by FoxP3+, PD-1+ and B7-H1 lymphocyte clusters*. European Journal of Cancer **45**, 1664-1672.
73. Hirahara, K., et al., *The majority of human peripheral blood CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells bear functional skin-homing receptors*. Journal of Immunology, 2006. **177**(7): p. 4488-4494.
74. Lee, I., et al., *Recruitment of Foxp3(+) T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor*. Journal of Experimental Medicine, 2005. **201**(7): p. 1037-1044.
75. Gallimore, A. and A. Godkin, *Regulatory T cells and tumour immunity - observations in mice and men*. Immunology, 2008. **123**(2): p. 157-163.
76. Antony, P.A., et al., *CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by*

- CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells.* J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2591-601.
77. Clarke, B., et al., *Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss.* Modern Pathology, 2009. **22**(3): p. 393-402.
78. Galon, J., et al. (2006) *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.* Science **313**, 1960-1963.
79. Naito, Y., et al., *CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer.* Cancer research, 1998. **58**(16): p. 3491-3494.
80. Woo, E.Y., et al., *Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer.* Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4766-72.
81. Milne, K., et al., *Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors.* PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6412.
82. Ménétrier-Caux, C., M. Gobert, and C. Caux, *Differences in Tumor Regulatory T-Cell Localization and Activation Status Impact Patient Outcome.* Cancer Res, 2009. **69**(20): p. 7895-7898.
83. Larmonier, N., et al., *Tumor-derived CD4(+)CD25(+) regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10.* Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(1): p. 48-59.
84. Zou, W.P., *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy.* Nature Reviews Immunology, 2006. **6**(4): p. 295-307.
85. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.* Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
86. Yamagiwa, S., et al., *A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood.* J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7282-9.
87. Davidson, T.S., et al., *Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells.* J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4022-6.
88. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells.* Nature Immunology, 2005. **6**(11): p. 1142-1151.
89. Kang, S.J., et al., *Targeted knock down of CCL22 and CCL17 by siRNA during DC*

- differentiation and maturation affects the recruitment of T subsets.* Immunobiology, 2010. **215**(2): p. 153-162.
90. Zhang, H.-Y. and H. Sun, *Up-regulation of Foxp3 inhibits cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer.* Cancer Letters, 2010. **287**(1): p. 91-97.
91. Zuo, T., et al., *FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene.* Cell, 2007. **129**(7): p. 1275-86.
92. Zuo, T., et al., *FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP2.* J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3765-73.
93. Rabinowich, H., et al., *Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand- expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes.* J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2579-88.
94. Beyer, M. and J.L. Schultze, *Regulatory T cells in cancer.* Blood, 2006. **108**(3): p. 804-811.
95. Wing, K. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity.* Nature Immunology, 2010. **11**(1): p. 7-13.
96. Wu, Y.Q., et al., *FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT.* Cell, 2006. **126**(2): p. 375-387.
97. Shevach, E.M., *From vanilla to 28 flavors: Multiple varieties of T regulatory cells.* Immunity, 2006. **25**(2): p. 195-201.
98. Quezada, S.A., et al., *Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts.* Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(3): p. 637-650.
99. Wang, L., et al., *Clinical significance of b7-h1 and b7-1 expressions in pancreatic carcinoma.* World J Surg, 2010. **34**(5): p. 1059-65.
100. Matsuzaki, J., et al., *Recognition of naturally processed and ovarian cancer reactive CD8(+) T cell epitopes within a promiscuous HLA class II T-helper region of NY-ESO-1.* Cancer Immunology Immunotherapy, 2008. **57**(8): p. 1185-1195.
101. Dudley, M.E., et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.* Science, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
102. Wong, S.B.J., R. Bos, and L.A. Sherman, *Tumor-specific CD4(+) T cells render the tumor environment permissive for infiltration by low-avidity CD8(+) T cells.* Journal of Immunology, 2008. **180**(5): p. 3122-3131.
103. Xie, Y., et al., *Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate*

- established melanoma*. Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(3): p. 651-667.
104. Nishikawa, H., et al., *IFN-gamma controls the generation/activation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in antitumor immune response*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4433-40.
105. Yu, P., et al., *Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 779-91.
106. Mahnke, K., et al., *Depletion of CD4+CD25+ human regulatory T cells in vivo: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro*. Int J Cancer, 2007. **120**(12): p. 2723-33.
107. Kim, J., et al., *Cutting edge: depletion of Foxp3+ cells leads to induction of autoimmunity by specific ablation of regulatory T cells in genetically targeted mice*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 7631-4.
108. Golgher, D., et al., *Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens*. Eur J Immunol, 2002. **32**(11): p. 3267-75.
109. Kryczek, I., et al., *FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease*. Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 3995-4000.
110. Morgan, M.E., et al., *Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans*. Hum Immunol, 2005. **66**(1): p. 13-20.
111. Cao, X., et al., *Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 635-46.

Nachwort

Gerade in der Medizinischen Forschung und insbesondere im Teilbereich der Tumorummunologie sind in den vergangenen zwei Jahren weitreichende Fortschritte erzielt worden. Die vorliegende Promotion wurde in den Jahren 2009-2011 fertig gestellt und im Jahr 2011 zur Korrektur eingereicht. Da die Promotionsordnung der Ludwig-Maximilians-Universität das Einreichen der Promotion jedoch erst nach Erhalt der Approbation zulässt kann sie erst zu diesem Zeitpunkt vorgelegt werden. Der folgende Abschnitt dient dazu, die vorliegende Promotionsarbeit vor dem Hintergrund der in jüngster Zeit veröffentlichten Publikationen zu positionieren und einen Ausblick auf zukünftige Forschungsmöglichkeiten zu geben.

Mit der Zulassung des anti-CTLA4 Antikörpers Ipilimumab ist erstmals eine gezielt auf die T-Zell Aktivierung eingreifende Immuntherapie zugänglich geworden, die in der Lage ist einen signifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit metastasiertem Malignem Melanom zu erreichen[1]. Durch die Blockade des CTLA-4 Rezeptors wird die T-Zell vermittelte Tumorabwehr der zytotoxischen T-Zellen gesteigert. Gleichzeitig wird die Unterdrückung der T-Zell vermittelten, gegen den Tumor gerichteten Immunantwort durch Treg Zellen antagonisiert [2,3]. Auch vor dem Hintergrund der hier vorgelegten Promotionsarbeit ist die Entwicklung einer solch gezielt wirkenden, effektiven Immuntherapie als Meilenstein der Tumorthherapie anzusehen. Es stellt sich die Frage, ob ein solcher therapeutischer Ansatz nicht auch im Falle anderer Tumorerkrankungen in Erwägung gezogen werden kann. Noch ist die Rolle, die Treg- Zellen im Rahmen der Karzinogenese einnehmen jedoch nicht eindeutig für alle Tumorentitäten geklärt [3,4]. So gibt es nach wie vor widersprüchliche Forschungsergebnisse in Hinblick auf die Assoziation zwischen Treg- Zellen und der Prognose von Patienten bei unterschiedlichen Tumoren und im speziellen des Ovarialkarzinoms [5]. Eine zwischenzeitlich von Gooden et al. vorgelegte Metaanalyse der 33 herausragenden Veröffentlichungen zu diesem Thema konnte hinsichtlich der Prognose von Patienten mit Ovarialkarzinom und spezifischer T-Zell Infiltration kein eindeutiges Ergebnis aufzeigen [6]. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen der vorliegenden Promotion, die ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Erhöhter Treg Zell Infiltration und Gesamtüberleben hat darlegen können. Es ist entsprechend deutlich vor Generalisierungen hinsichtlich der therapeutischen Einsatzmöglichkeiten eines Immunmodulators wie Ipilimumab zu warnen.

Vor diesem Hintergrund hat sich der Fokus der Tumorummunologischen Forschung zunehmend auf die Untersuchung des tumoreigenen immunologischen Milieus, insbesondere der Chemotaxis von Immunzellen und der Tumoreigenen Immunmodulation, gerichtet [5, 7-9]. Dieses scheint in den verschiedenen Stadien des Tumorwachstums gänzlich unterschiedlich aufgebaut zu sein. Der gleiche Zelltyp kann durch Interaktion mit anderen Immunzellen in verschiedenen Stadien des Tumorwachstums inhibierende und aktivierende Funktionen im Tumor erfüllen. So konnte durch Uciane et al. gezeigt werden, dass im Laufe der Tumorprogression beim Ovarialkarzinom Dendritische Zellen unterschiedliche Funktionen einnehmen. In frühen Tumorstadien hemmen sie das Tumorwachstum durch Aktivierung von CD8+ T-Zellen. Im Verlauf der Tumorerkrankung kommt es jedoch zu einer Umkehrung dieser Funktion. Durch die Ausschüttung verschiedener Mediatoren werden Dendritische Zellen dann durch die Tumorzellen selbst dahingehend gelenkt, dass sie zu einer Unterdrückung der körpereigenen Immunantwort beitragen [10]. Ansammlung von Tumor assoziierte Makrophagen im Tumorgewebe sind oft mit einer schlechter Prognose assoziiert worden. Ong et al. haben jedoch für das Kolonkarzinom gezeigt, dass dort die Tumor assoziierten Makrophagen zur Ausbildung eines Tumor Suppressiven Mikrobiologischen Milieus beitragen, zur Aktivierung von Th1+ T-Zellen beitragen und Pro-inflammatorische Zytokine ausschütten [11,12]. Auch in diesem Fall muss davon ausgegangen werden, dass eine Verallgemeinerung hinsichtlich der Funktion von Makrophagen im Tumormilieu verschiedener Organe nicht möglich ist und daher Untersuchungen bezüglich der Funktion von Makrophagen beim Ovarialkarzinom noch ausstehen.

Weiterhin ist auch die Ansammlung der verschiedenen Typen von Immunzellen im Tumormilieu, der Peripherie, in den anliegenden tertiären lymphoiden Strukturen und im Tumorzentrum für verschiedene Tumorarten noch näher untersucht worden [9,13]. Es zeigte sich für das kleinzellige Bronchialkarzinom, dass im Anfangsstadium naive Dendritische Zellen vornehmlich im Tumorzentrum lokalisiert sind, wo sie tumorspezifische Antigene aufnehmen, wohingegen diese später eher in der Peripherie in tertiären, lymphoiden Strukturen lokalisiert sind um mit T-Zellen in Kontakt zu kommen [2]. Erste Versuche Dendritische Zellen frühzeitig hinsichtlich Tumorspezifischer Antigene zu aktivieren und dadurch eine Toleranzbildung gegenüber dem Tumorgewebe zu verhindern wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen unternommen. Dendritische Zellen übernehmen hierbei theoretisch die Funktion der Steuerung einer T-Zell vermittelten Immunantwort [14]. Trotz der vielversprechenden Theorie ließ sich jedoch anfänglich kein Erfolg erzielen, da die Dendritischen Zellen trotz anfänglicher Aktivität, im Laufe der

Tumorprogression Immunsuppressive Funktionen annehmen. Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass es zur Aktivierung der Dendritischen Zellen unabdingbar ist gleichzeitig ein Aktivierungssignal in Form eines Toll-like Rezeptors, oder gleichzeitiger Gabe eines Aktivierenden Rezeptorantagonisten zu applizieren [2,5]. Es bleibt abzuwarten ob es in Kürze gelingen wird eine entsprechende „Tumorimpfung“ zu entwickeln, die Dendritische Zellen langfristig

Treg T-Lymphozyten werden in fortgeschrittenen Tumorstadien mutmaßlich durch die Ausschüttung von Chemokinen, unter anderem CCL22, zu am Rand des Tumorgewebes befindlichen lymphoiden Strukturen angelockt [7,8]. Eine vor kurzem veröffentlichte Studie von Fialová et al. war nun in der Lage beim Ovarialkarzinom nachzuweisen, dass eine CCL22 Ausschüttung durch Dendritische Zellen, Monozyten und Tumorzellen nur dann in hohen Mengen stattfindet wenn eine gleichzeitige Stimulation der Zellen durch $\text{INF}\gamma$ stattfindet [15]. Diese Ausschüttung des $\text{INF}\gamma$ ist wiederum abhängig von dem Ausmaß der Entzündungsreaktion, die einwandernde Immunzellen in frühen Stadien des Tumorwachstums hervorrufen.

Chronische Entzündungsreaktionen werden als ein weiterer wichtiger Faktor der zu Tumorwachstum und Metastasierung beiträgt angesehen. So tragen durch Tumorzellen sowie Makrophagen ausgeschüttete akute Phase Proteine, allen voran IL-1, IL-2, IL-6, und $\text{TNF}\alpha$, nicht nur zum Tumorwachstum und zur Karzinogenese bei, sondern wird dadurch gleichzeitig eine Unterdrückung der Lymphozytären Reaktion unterhalten [16]. Zusätzlich zu den Veränderungen des immunologischen Milieus, sind durch die vom Tumor unterhaltene chronische Entzündung, auch die klinischen Symptome Anorexie, Gewichtsverlust, Depression und Müdigkeit zu beachten [17]. Als weiterer möglicher Angriffspunkt von Immuntherapeutika haben dementsprechend auch zunehmend gezielte Zytokin Antagonisten Beachtung gefunden.

Als ein immuntherapeutischer Angriffspunkt wurde auch die Blockade des CCR4 Rezeptors im Rahmen der Promotion diskutiert. Diese Möglichkeit wird von der kürzlich erschienen Arbeit von Li et al. gestützt. Diese beobachteten beim Mammakarzinom einen Zusammenhang sowohl zwischen den Metastasierungsraten als auch dem Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der CCR4 Expression der Tumorzellen im Mausmodell [18]. Es wäre vor diesem Hintergrund interessant, die im Rahmen dieser Forschungsarbeit untersuchten Präparate auch auf den CCR4 Rezeptorstatus hin zu untersuchen.

Nachwort

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse der vorgelegten Promotion, insbesondere vor dem Hintergrund der jüngsten tumorimmunologischen Publikationen, keineswegs an Aktualität verloren haben. Zu hoffen ist, dass für Patientinnen mit Ovarialkarzinom in naher Zukunft ebenfalls eine gezielte immunologische Therapie bereitgestellt werden kann, um die nach wie vor infauste Prognose der Patientinnen zu verbessern.

1. Hodi, FS., O'Day, SJ., McDermott, DF., et al., *Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**: p.711-72.
2. Mellman, I., Coukos, G., Dranoff, G., *Cancer immunotherapy comes of age*. Nature, 2011. **480**: p. 480-489.
3. Oleinika, K., Nibbs, RJ., Graham, GJ., et al., *Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression*. *Clinical and Experimental Immunology* , 2013. **171**: p.36-45
4. Facciabene, A., Motz, GT., Coukos, G., *T-Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis*. Cancer Research, 2012. **72**: p. 2162-2171.
5. Fridman, WH., Pages, F., Sautes-Fridman, C., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. Nature Reviews Cancer, 2012. **12**: p. 298-306.
6. Gooden, MJM., de Bock, GH., Leffers, N., et al., *The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis*. British Journal of Cancer, 2011. **105**: p. 93-103.
7. Faget, J., Biota, C., Bachelot, T., et al., *Early Detection of Tumor Cells by Innate Immune Cells Leads to T-reg Recruitment through CCL22 Production by Tumor Cells*. Cancer Research, 2011. **71**: p. 6143-6152.
8. Rahir, G., Moser, M., *Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration*. Cancer Immunology Immunotherapy, 2012. **61**: p.751-759.
9. de Chaisemartin, L., Goc, J., Damotte, D., et al., *Characterization of Chemokines and Adhesion Molecules Associated with T cell Presence in Tertiary Lymphoid Structures in Human Lung Cancer*. Cancer Research, 2011. **71**: p. 6391-6399.
10. Scarlett, UK., Rutkowski, MR., Rauwerdink, AM., et al., *Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells*. Journal of Experimental Medicine, 2012. **209**: p. 495-506.
11. Ong, S-M., Tan, Y-C., Beretta, O., et al., *Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response*. European Journal of Immunology, 2012. **42**: p. 89-100.
12. Kryczek, I., Zou, L., Rodriguez, P., et al., *B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma*. Journal of Experimental Medicine,

2006. **203**:871-881.
13. Dieu-Nosjean, M-C., Antoine, M., Danel, C., et al., *Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**: p. 4410-4417.
 14. Boudreau, JE., Bonehill, A., Thielemans, K., et al., *Engineering Dendritic Cells to Enhance Cancer Immunotherapy*. Molecular Therapy, 2011. **19**: p.841-853.
 15. Fialova, A., Partlova, S., Sojka, L., et al., *Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: The gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells*. International Journal of Cancer, 2013. **132**: p.1070-1079.
 16. Maccio, A., Madeddu, C., *Inflammation and ovarian cancer*. Cytokine, 2012. **58**: p.133-147.
 17. Maccio, A., Madeddu, C., Massa, D., et al., *Interleukin-6 and leptin as markers of energy metabolic changes in advanced ovarian cancer patients*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2009. **13**: p. 3951-3959.
 18. Li, J-Y., Ou, Z-L., Yu, S-J., et al., *The chemokine receptor CCR4 promotes tumor growth and lung metastasis in breast cancer*. Breast Cancer Research and Treatment, 2012. **131**: p. 837-848.

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. T. Kirchner für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pathologie der Universität München durchführen zu können.

Für die hervorragende Zusammenarbeit, freundliche Unterstützung, Hilfsbereitschaft in allen Belangen, für Tipps und Anregungen aller Art, danke ich meiner Betreuerin, Frau PD Dr. med. D. Mayr. Vielen Dank für das Vertrauen, dass Sie mir von Anfang an entgegengebracht haben.

Herzlichen Dank an Andrea Sendelhofert und Anja Heier für die tatkräftige Unterstützung im praktischen Teil der Arbeit.

Für Ratschläge, Geduld und hilfreiche Diskussion bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse, Dank an Marthe und Lars.

Schließlich will ich mich auch bei meiner Familie bedanken. Meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und die mich von Anfang an in allen Belangen unterstützt und ermutigt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Hermans, Cecilia Jane Louise

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**CCL22, CD8 und Fox P3 als prognostische Marker beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom -
Umfassende retrospektive Analyse mit Hilfe der Immunhistochemie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 20.05.2013

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand