

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Sven Mahner



***Die Rolle regulatorischer T-Zellen und ihres rekrutierenden
Chemokins CCL22 im Uterus unter physiologischen und
pathologischen Bedingungen mit Fokus auf das
Endometriumkarzinom***

Dissertation

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

vorgelegt von

Anna Mareike Mannewitz

aus München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Kolben

Zweiter Gutachter: PD Dr. Stefanie Corradini

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Nina Ditsch

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Susanne Beyer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2023

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste.....	5
1. Eigener Beitrag zu den inkludierten Veröffentlichungen	6
1.1 Beitrag zu Paper I (Kapitel 3)	6
1.2 Beitrag zu Paper II (Kapitel 4)	6
2. Einleitung.....	7
2.1 Endometriumkarzinom	7
2.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	7
2.1.2 Pathohistologie und molekulare Klassifikation.....	7
2.1.3 Diagnostik und Therapie.....	9
2.2 Immune escape Mechanismen und Bedeutung des Tumormicroenvironments im Endometriumkarzinom	10
2.3 Endometrium, Plazenta und Pathophysiologie der Präeklampsie	12
2.4 Bedeutung des Immunsystems im Endometrium und der Plazenta	13
2.5 Regulatorische T-Zellen und das Chemokin CCL22.....	14
2.5.1 Anreicherung tumor-assoziiertes Treg fördert das Tumorwachstum und korreliert mit der Prognose	14
2.5.2 Bedeutung und Vorkommen von Treg und CCL22 im gesunden Endometrium und der Plazenta	15
2.6 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	16
3. Paper I: Presence of regulatory T-cells in endometrial cancer predicts poorer overall survival and promotes progression of tumor cells.....	17
4. Paper II: Regulatory T Cell Apoptosis during Preeclampsia May Be Prevented by Gal-2... 18	18
5. Zusammenfassung.....	19
6. Abstract.....	20
7. Ausblick.....	21
8. Abkürzungsverzeichnis.....	23
9. Literaturverzeichnis.....	24
Anhang: Manuskript „CCL22 as independent prognostic factor in endometrial cancer patients“ ...	37
Affidavit.....	63
Danksagung.....	64

Die vorliegende Dissertation wurde als kumulative Arbeit eingereicht. Grundlage dieser Arbeit sind die folgenden Publikationen:

Kolben Thomas*, Mannewitz Mareike*, Perleberg Carolin, Schnell Konstantin, Anz David, Hahn Laura, Meister Sarah, Schmoeckel Elisa, Burges Alexander, Mahner Sven, Jeschke Udo, Corradini Stefanie, Trillsch Fabian, Beyer Susanne

Presence of regulatory T-cells in endometrial cancer predicts poorer overall survival and promotes progression of tumor cells

Cellular Oncology 2022 Aug, doi: 10.1007/s13402-022-00708-2

* Geteilte Erstautorenschaft

und

Meister Sarah, Hahn Laura, Beyer Susanne, Mannewitz Mareike, Perleberg Carolin, Schnell Konstantin, Anz David, Corradini Stefanie, Schmoeckel Elisa, Mayr Doris, Hasbargen Uwe, Zati Zehni Alaleh, Mahner Sven, Jeschke Udo, Kolben Thomas

Regulatory T Cell Apoptosis during Preeclampsia May Be Prevented by Gal-2

International Journal of Molecular Sciences 2022 Feb, doi: 10.3390/ijms23031880

1. Eigener Beitrag zu den inkludierten Veröffentlichungen

1.1. Beitrag zu Paper I

Der Beitrag zu dem Paper „Presence of regulatory T-cells in endometrial cancer predicts poorer overall survival and promotes progression of tumor cells“, bestand in der Beteiligung an der Planung, sowie der selbstständigen Durchführung und Auswertung aller Experimente. Die Durchflusszytometrie erfolgte gemeinsam mit Mitgliedern der Arbeitsgruppe Immunregulation, Klinische Pharmakologie, LMU München (PD Dr. Anz). Des Weiteren fiel mir die Aufgabe der Grafikerstellung, sowie der Formulierung der Kapitel *Methods* und *Results* zu. Die Abschnitte *Introduction* und *Discussion* wurden mit Dr. Susanne Beyer zusammen formuliert. Inhaltlich wurden meine Überlegungen zur Interpretation und Diskussion der Ergebnisse dabei aufgenommen. Grundzüge des Projektes und damit auch der vorliegenden Veröffentlichung sind im FöFoLe Förderantrag „Molekulare Marker und deren Einfluss auf das Überleben von Patientinnen mit Endometriumkarzinom“ von Prof. Dr. Thomas Kolben vorgezeichnet. Darüberhinausgehende experimentelle Ansätze konnte ich in Abstimmung mit meinen Betreuern einbringen, entwickeln und selbstständig planen und durchführen. Die geteilte Erstautorenschaft ergab sich aus der Projektplanung und teilweisen Versuchsplanung durch Prof. Kolben und meinem oben erläuterten Anteil an der Veröffentlichung.

1.2. Beitrag zu Paper II

Mein Beitrag zu „Regulatory T Cell Apoptosis during Preeclampsia may be prevented by Gal-2“ bestand vordergründig in der Etablierung der Treg-Isolation und des Caspase-3-Elisa mit Laura Hahn. Als Coautor hatte ich außerdem Anteil an der Erstellung folgender Abschnitte: Diskussion, Methodik und Ergebnisse, Des Weiteren bestand meine Aufgabe in der sowie der kritischen Prüfung des Manuskriptes.

Die Beiträge aller weiteren Autoren sind entsprechend der Credit Taxonomie am Ende jeder Veröffentlichung gelistet und hier zu entnehmen.

2. Einleitung

2.1. Endometriumkarzinom

2.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Endometriumkarzinom (EC) als bösartige Neubildung des Corpus uteri ist das vierthäufigste Karzinom der Frau mit einer altersstandardisierten Inzidenz von 15,9/100 000 Einwohnern im Jahr 2018 in Deutschland und ist in der Subgruppe der Malignome des weiblichen Genitaltraktes am häufigsten vertreten [1, 2]. Epidemiologisch zeigen sich regionale Unterschiede: aufgrund der verbesserten Vorsorge und Impfmöglichkeiten speziell für das Zervixkarzinom, ist das EC in den Industrieländern die häufigste Krebserkrankung des weiblichen Genitaltraktes und hat damit das Zervixkarzinom abgelöst, das in den Entwicklungsländern noch vorherrschend ist [3]. Das Risiko, ein invasives EC zu entwickeln, steigt mit dem Alter [4, 5], wobei zwei Drittel der Patientinnen postmenopausal sind und ein medianes Erkrankungsalter von 63 Jahren angegeben wird [6]. Die stetig steigende Lebenserwartung könnte somit global zu einer Zunahme der Inzidenzen beitragen. Neben dem Alter ist die Östrogenexposition, insbesondere ohne Progesteronschutz, ein entscheidender Risikofaktor [7–9]. Eine erhöhte endogene Produktion, beispielsweise bei Diabetes, Adipositas [10, 11] oder dem PCOS (Polyzystisches Ovar Syndrom) [12] sowie die exogene Zufuhr im Rahmen einer Hormonersatztherapie führen zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines EC [13, 14]. Eine frühe Menarche, späte Menopause und Nulliparität sind ebenso mit einer hohen Östrogenexposition bezogen auf die Lebenszeit verbunden [15–17].

Aufgrund der häufig frühen Diagnose haben Patientinnen mit Endometriumkarzinom im Vergleich zu anderen malignen Erkrankungen eine gute Prognose. Die Fünfjahresüberlebensrate liegt bei 78% [2]. Die tumor-assoziierten Todesfälle lagen im Jahr 2017 bei rund 2700 bundesweit und platzieren das EC damit an elfter Stelle der Sterbefälle durch Malignome bei Frauen [2].

2.1.2 Pathohistologie und molekulare Klassifikation

Histologisch sind ca. 80% der Endometriumkarzinome vom endometroiden Typ [5]. Weitere Subtypen sind das seröse oder klarzellige Karzinom, das Karzinosarkom und gemischte Subtypen [18]. Bokhman et al. veröffentlichte 1983 ein dualistisches Modell zur Einteilung der EC, in dem die pathohistologischen Subtypen bezüglich epidemiologischer und endokriner Faktoren sowie des klinischen Verlaufs unterschieden werden. Dieses bildete die Grundlage der überarbeiteten Version des Leitfadens zur Tumorklassifikation der WHO (*World Health Organisation*), nach der EC in einen hormonsensiblen Typ 1 und einen hormonunabhängigen Typ 2 eingeteilt werden [4, 18]. Histologisch gehören die endometroiden und muzinösen Karzinome eher dem Typ 1 an, seröse und klarzellige Histologien dagegen dem Typ 2. Es bleiben jedoch Unschärfen bei der Korrelation der traditionellen histologischen Einteilung und Bokhman's dualen System [19]. Auch sagt das duale Pathogenesemodell von Bokhman die Prognose der Patientinnen nicht zuverlässig vorher, da sich durchaus überlappende klinische, pathologische und molekulare Eigenschaften zwischen Typ 1 und 2 Patientinnen finden. Das Modell gilt daher als überholt und eine neue Einteilung mit molekularer Subklassifizierung hält zunehmend auch in die klinische Praxis Einzug. Abbildung 1a stellt die vier Subtypen dar, die ausgehend von Daten des Cancer Genome Atlas

Project zur Entwicklung des ProMisE-Algorithmus (*proactive molecular risk classifier for endometrial cancer*) führten [20–23]. Aus Abbildung 1b wird zusätzlich die unterschiedliche Prognose der vier identifizierten Patientensubgruppen anhand eines Kaplan-Meier-Plots sichtbar.

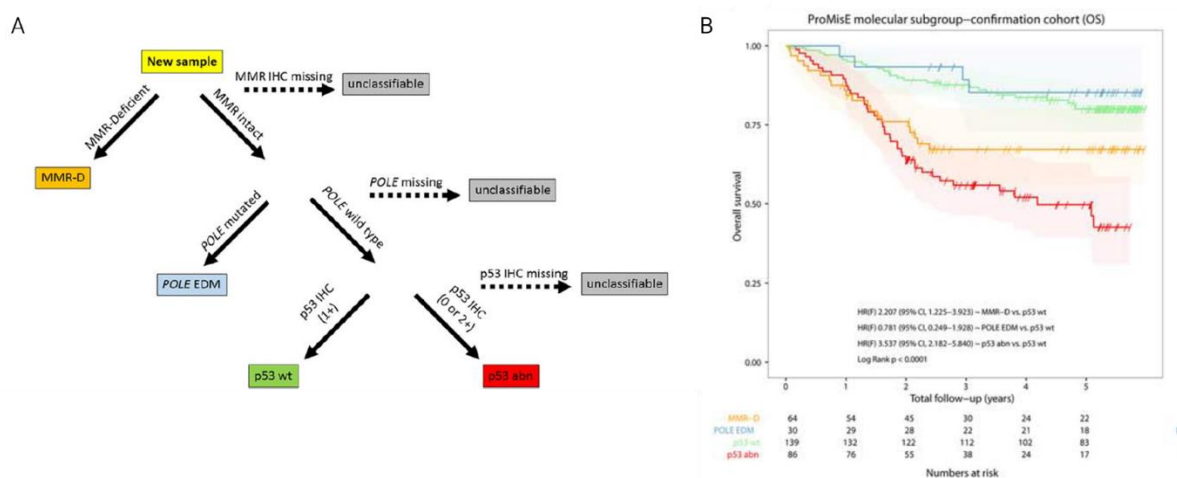


Abb. 1: (A) Stufen der molekularen Klassifikation entsprechend dem *Proactive Molecular Classifier for Endometrial Cancer (ProMisE)* [23]. Patientenproben werden auf die Präsenz von *mismatch-repair* Proteinen (MMR), auf Mutationen der *polymerase-ε (POLE)* sowie des Proteins *p53* getestet. In der klinischen Praxis kann die Reihenfolge der Testungen abweichen. (B) Die Kaplan-Meier-Kurve stellt die unterschiedlichen Gesamtüberlebensprognosen der vier Subgruppen dar. Patientinnen mit POLE Mutation weisen eine besonders gute Prognose auf (blau), während eine *p53* Mutation mit der schlechtesten Prognose einhergeht (rot) [23].

Patienten mit einer *p53* Mutation weisen die schlechteste Prognose auf. Eine POLE Mutation, die trotz phänotypischer häufiger G3 Klassifizierung mit einer besonders guten Prognose vergesellschaftet ist, kann nur mittels molekularer Methoden ermittelt werden. Ein Verlust der Expression sog. *mismatch-repair* Proteine als Phänotyp einer Mikrosatelliteninstabilität ist mit einer mittleren Prognose assoziiert. Die vierte Subgruppe umfasst den Pool der Patientinnen, auf die keines der anderen Kriterien zutrifft, und hat dementsprechend eine vergleichsweise schwankende Prognose. Dies könnte darauf schließen lassen, dass eine weitere Substratifizierung der Gruppe nötig und möglich ist mittels weiterer molekularer Marker [21–25].

2.1.3 Diagnostik und Therapie

Häufigstes und frühes Symptom eines Endometriumkarzinoms sind abnorme vaginale Blutungen. Die Abklärung postmenopausaler Blutungen führt daher oft zur Erstdiagnose in frühen Stadien [6, 17, 26]. Bei prämenopausalen Frauen sind entsprechend Menorrhagien oder Metrorrhagien kennzeichnend [27]. In fortgeschrittenen Stadien können Schmerzen bei der Miktions oder diffuse Schmerzen im Unterbauch auftreten [17, 27]. Bei auffälliger Klinik und transvaginaler Sonographie sollte zur Diagnosesicherung eine Hysteroskopie mit Gewebeentnahme durch fraktionierte Abrasio erfolgen [5, 28].

Zur Beurteilung der Pathogenität wird ein histologisches Grading vorgenommen. Grundlage dessen ist der Anteil solider, nicht plattenepithelialer Tumoranteile sowie der Differenzierungsgrad [29, 30]. Beides nimmt mit steigender Gradingstufe zu. Diese Einteilung gilt allerdings nur für endometroide und muzinöse Karzinome. Seröse und klarzellige Tumore werden per definitionem in die höchste Stufe G3 eingeordnet.

Zusätzlich werden zur klinischen Stadieneinteilung das System der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) in seiner überarbeiteten Version von 2010 sowie die TNM-Klassifikation [31, 32] genutzt. Beide berücksichtigen Kriterien wie die lokale Ausbreitung des Tumors, die Durchdringung angrenzenden Gewebes, die Lymphknoteninfiltration und Fernmetastasierung [5, 33].

Therapie der Wahl ist die totale Hysterektomie mit Adnexektomie und ab Stadium pT3b eine radikale Hysterektomie, da hier ein Teil der Parametrien mit betroffen ist und ebenfalls entfernt werden muss [34]. Stadienabhängig wird zusätzlich eine pelvine und paraaortale Lymphonodektomie durchgeführt, deren Bedeutung noch Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Studien, wie in der laufenden ECLAT/AGO-OP.6, ist [5, 35–37]. Bei noch nicht abgeschlossenem Kinderwunsch kann nach entsprechender Aufklärung und unter Berücksichtigung individueller Risikofaktoren bei frühem endometrioiden Karzinom zunächst eine Gestagentherapie unter engmaschiger Kontrolle mittels Endometriumbiopsie eingeleitet werden. Im Falle einer Remission sollte zeitnah die Realisierung des Kinderwunsches erfolgen und nach Erfüllung oder Aufgabe des Kinderwunsches eine Hysterektomie durchgeführt werden [5]. Adjuvante Therapien in Form von Strahlen-, Chemo- oder Immuntherapie werden je nach FIGO Stadium und molekularer Merkmale bei hohem Rezidivrisiko eingesetzt [38].

Die beschriebene Subtypisierung anhand molekularer Marker ist nicht nur von diagnostischer und prognostischer Bedeutung. Neueste Daten zeigen ein unterschiedliches Ansprechen der einzelnen Subgruppen auf Immuntherapien. Immuntherapeutische Therapiestrategien wurden beim rezidivierenden oder fortgeschrittenen EC und im Zustand nach Carboplatin/Paclitaxel-Therapie zunehmend genutzt. Patientinnen mit dMMR Status (*deficient mismatch repair*) - etwa 20% aller Patientinnen - scheinen besonders gut auf Immuntherapien anzusprechen, was sich in der Zulassung von Pembrolizumab durch die FDA 2017 widerspiegelt. Bemerkenswert ist hierbei, dass es sich um eine entitätsübergreifende Zulassung für alle dMMR Tumore handelt.

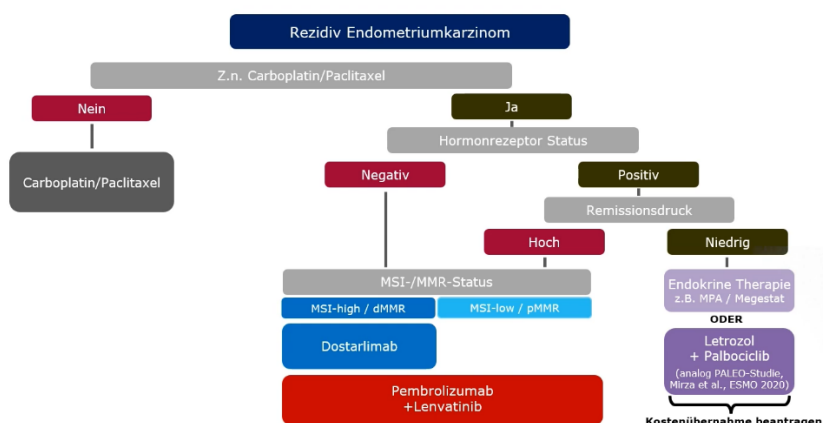


Abb. 2: Fließschema zum aktuellen therapeutischen Vorgehen bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom in der Rezidivsituation (Stand Dezember 2021, © Prof. Dr. Fabian Trillsch). Neuzulassungen im Bereich der Immuntherapeutika ermöglichen weitere Therapiewege ohne individuelle Kostenübernahmebewilligungen. Die Kombination Letrozol+Palbociclib wird aktuell noch im *off-label-use* eingesetzt.

In Deutschland steht seit April 2021 - mit der Zulassung von Dostarlimab durch die EMA (*European Medicines Agency*) - ebenfalls eine Monotherapie zur Behandlung des rezidivierten und fortgeschrittenen EC mit dMMR zur Verfügung [39, 40]. Das Ansprechen von MSI^{low} (*microsatellite instability*) Patienten war

hier deutlich geringer. Auch für diese Patientengruppe, die mit 80% die deutlich größere Patientenpopulation darstellt, gibt es seit November 2021 eine neue Therapieoption: Die EMA ließ die Kombination aus Pembrolizumab und dem Tyrosinkinaseinhibitor Lenvatinib unabhängig vom MMR-Status zu, nachdem die Keynote775 Studie im Vergleich zur Standard Chemotherapie eine verbesserte Prognose auch in der Gesamtkohorte der Patientinnen nachweisen konnte. Abbildung 2 stellt das aktuelle therapeutische Vorgehen in der Rezidivsituation in der Frauenklinik der LMU München zusammenfassend dar.

2.2 Immune escape mechanismen und Bedeutung des "Tumormicroenvironment" (TME) im Endometriumkarzinom

Obwohl das Endometriumkarzinom nur für 2,5% aller krebsbedingten Todesfälle ursächlich ist [2], zeichnet es aufgrund seiner hohen Inzidenz doch verantwortlich für eine beträchtliche Zahl von Todesfällen, da bei Patientinnen in fortgeschrittenen Stadien oder metastasiertem Zustand das Ansprechen auf konventionelle Therapien gering ist [20, 25]. Bisher basierte die prognostische Risikoabschätzung auf der histopathologischen Einteilung und der Expression von Hormonrezeptoren [4, 41]. Dies hat sich jedoch als nicht ausreichend hinsichtlich der starken Heterogenität der Tumore erwiesen [20, 42].

Mit der Entwicklung neuer Immuntherapien in den letzten zwei Jahrzehnten rückte dieser Therapiebereich auch für das EC zunehmend in den Fokus. Die aktuellen Neuzulassungen für das EC zeigen klar die Bedeutung und Aktualität des Immunsystems als potentiellen Angriffspunkt mit hohem Einfluss auf die Prognose der Patientinnen.

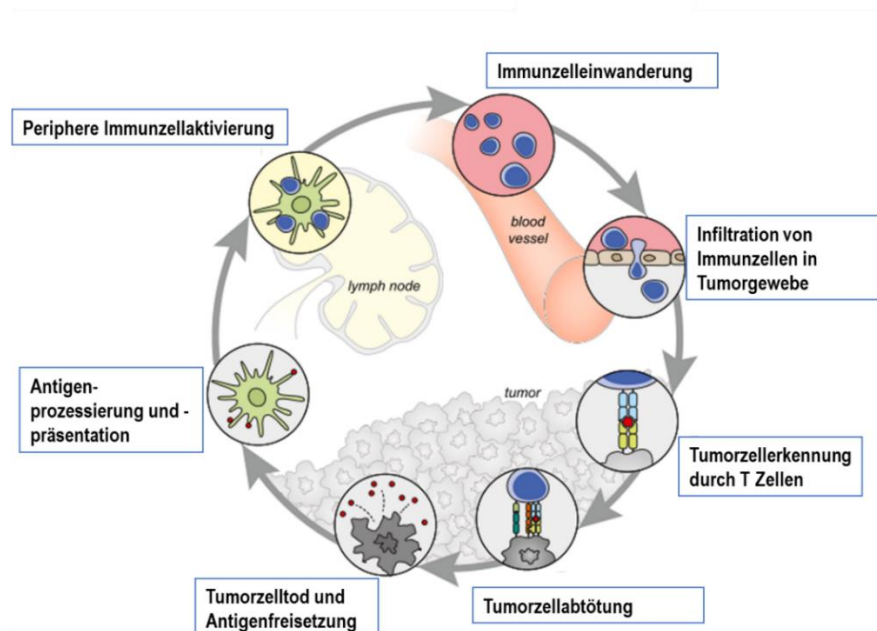


Abb. 3: Prozess der immunologischen Tumorzellabwehr: Von der Präsentation der Tumorantigene bis zur Tumorzellabtötung ergeben sich auf jeder Stufe des Kreislaufes mögliche therapeutische Ansatzpunkte. Abbildung modifiziert nach [51].

Grundsätzlich ist das Immunsystem entsprechend der *Immunosurveillance*-Hypothese in der Lage, Tumore zu erkennen und zu eliminieren [43]. Es entwickeln sich jedoch oft Mechanismen, den Angriffen des Immunsystems im Rahmen eines sog. *immune escape* zu entgehen [44–46]. Solche Adaptionen im Prozess der immunologischen Tumorabwehr können auf verschiedensten Ebenen stattfinden: von der Antigenpräsentation und peripheren Immunzellaktivierung, die Einwanderung derselben bis hin zur Veränderung der direkten Tumorzellerkennung und -abtötung (Abb. 3) [47].

Eine zentrale Herausforderung in der Krebsimmuntherapie besteht folglich darin, die tumorbedingte Immunsuppression zu überwinden. Erste Zulassungen in diesem Bereich stellten die Immuncheckpointinhibitoren Ipilimumab und Nivolumab dar [48–50].

Zunehmend rückte auch die Charakterisierung des sog. Tumormikromilieus (*Tumormicroenvironment*; TME) in den Fokus der Forschung [52]. Die Mikroumgebung des Tumors spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion und Ausbreitung von Krebszellen. Der Tumor erschafft durch Rekrutierung bestimmter Zellpopulationen sowie Sekretion von Zytokinen und Chemokinen eine immunsuppressive Umgebung [58].

Neben den in Kapitel 2.5. näher erläuterten regulatorischen T-Zellen (Treg), sind tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) und myeloide Suppressorzellen (*Myeloid-derived suppressor cells*; MDSC) von besonderer Bedeutung als immunsuppressive Zellen im Tumormikromilieu [53]. TAM sind mehrheitlich als M2-Makrophagen definierte Zellen, die im Gegensatz zu proinflammatorischen M1-Makrophagen, schon in vielen Tumorentitäten mit einer Förderung des Tumorwachstums und Metastasierung in Verbindung gebracht wurden [54–56]. Sie exprimieren u.a. PD-1-Liganden, sekretieren immunsuppressive Zytokine wie IL-1 und TGF- β und inhibieren damit tumorgerichtete Immunzellreaktionen [57–59].

MDSCs dagegen sind eine sehr heterogene Gruppe unreifer Zellen myeloiden Ursprungs. Auch sie sekretieren immunsuppressive Zytokine, exprimieren PD-L1 und tragen so zu einem immunsuppressiven TME bei [60–62]. Weitere Mechanismen laufen über eineIDO Überexpression oder die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies [47, 63, 64]. Die Veränderungen des TME im EC betreffen somit sowohl humorale Faktoren als auch zelluläre Anpassungen.

Obwohl die Krebsimmuntherapie im EC beachtliche Erfolge erzielt hat, erreicht sie nur für eine Untergruppe von Patienten einen klinischen Nutzen [4, 5]. Die Vielfalt der möglichen *immune escape* Mechanismen zeigt schon die Komplexität der Tumor-Immunsystem-Interaktion. Zudem spielen sicher verschiedene Mechanismen gleichzeitig zusammen, und sowohl der Tumor als auch das Immunsystem sind sehr heterogen und individuell zwischen einzelnen Patientinnen.

2.3. Endometrium, Plazenta und die Pathophysiologie der Präeklampsie

Neben dem EC als zentraler Punkt dieser Arbeit werden zusätzlich die Gegebenheiten in physiologischem Endometrium, Plazenta und Plazenta von Präeklampsie (PE) Patientinnen beleuchtet. Auch wenn das EC eine primär postmenopausale Erkrankung ist, lohnt sich die Betrachtung der uterinen Verhältnisse in weiterem Radius bezüglich der immunologischen Bedeutung von Treg, um ein umfassendes Bild zu erhalten.

Der Uterus, anatomisch aufgeteilt in Fundus, Corpus und Zervix, besteht aus einer dicken muskulären Schicht (Myometrium), die Richtung Bauchhöhle durch die Serosa begrenzt wird und der Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium) [65]. Das Endometrium selbst wird aus einer oberflächlichen Zona functionalis mit einem hohen Anteil an luminalem Epithel, das die Endometriumdrüsen auskleidet und der tieferen Zona basalis, mit einem kompakteren Stroma, aber weniger Drüsengewebe als in der functionalis, gebildet [66, 67]. Das Endometrium unterliegt hormonell bedingten zyklischen Veränderungen, bestehend aus follikulärer (proliferativer) Phase, lutealer (sekretorischer) Phase und der Desquamationsphase (Menstruation). Während der Menstruation wird die in der proliferativen und sekretorischen Phase verdickte Gebärmutter Schleimhaut oberhalb der Basalschicht abgestoßen [65–67].

In der Schwangerschaft hat das Endometrium, das sich nach der Einnistung der Blastozyste in die Dezidua umwandelt [68] wichtige Funktionen als fetomaternalen Grenze [69]. Nur an dieser Stelle kann Gas- und Nährstoffaustausch stattfinden [70]. Während der Einnistung sorgen Trophoblasten, die den Embryoblast umgeben, für eine Verankerung der Blastozyste in der Dezidua, die aus den Stromazellen des Endometriums entsteht [71, 72].

Bei der Implantation differenziert der Trophoblast der Blastozyste zu Synzytiotrophoblasten oder Zytotrophoblasten. Dies ist der initiale Schritt der Plazentabildung, der ab dem fünften Tag nach Fertilisation mit der Differenzierung der Trophoblasten beginnt [70].

Die Zytotrophoblasten umhüllen den Embryoblast, während die zum mehrkernigen Synzytiotrophoblast verschmolzenen Zellen direkt am mütterlichen Gewebe anliegen und die Verankerung sowie den maternofetalen Stoffaustausch gewährleisten [73, 74]. Die Spiralarterien des Endometriums bauen sich im Rahmen der Dezidualisierung um, sodass ein vereinfachter Transfer über die Plazenta aus dem umspülenden mütterlichen Blut möglich wird [68]. Zytotrophoblasten, die außerhalb der plazentaren Zotten weiter in den Uterus einwandern, werden als extravillösen Trophoblasten bezeichnet [70, 75].

Am Ende der Schwangerschaft wird die Plazenta inklusive Dezidua abgestoßen und das Endometrium regeneriert sich. [76, 77]

Präeklampsie ist ein schwangerschaftsspezifisches Syndrom, das für 10 bis 15% aller maternalen Todesfälle weltweit verantwortlich ist [78]. Die Ursachen der Präeklampsie sind vielschichtig und werden u.a. in einer inadäquaten Immuntoleranz gegenüber dem semi-allogenen Fötus [79, 80] und einer abnormalen Trophoblastinvasion [81] gesehen, die zu einer lokalen sowie systemischen Entzündungsreaktion führen [82–84]. Folgen sind ein erhöhter oxidativer Stress, gestörte Funktion der Spiralarterien und letztlich eine Plazentainsuffizienz [79, 85, 86].

Definiert wird die Präeklampsie diagnostisch über eine neu auftretende oder verschlechterte Hypertonie einhergehend mit einer weiteren Organmanifestation, die in der Niere, Leber, Lunge oder im ZNS sein kann [87, 88]. Die Hypertonie ($> 140/90$ mmHg) und Proteinurie (> 300 mg/24 h) gelten als Kardinalsymptome der Erkrankung. In Ermangelung ursachenspezifischer Therapiemöglichkeiten, wird nach Nutzen-Risiko-Abwägung zur Vermeidung extremer Frühgeburtlichkeit eine medikamentöse Symptomkontrolle und -prävention mit ggf. Lungenreifungstherapie des Fötus durchgeführt. Treten Komplikationen auf, ist eine sofortige Entbindung jedoch unumgänglich [70, 87, 89]. Sowohl hinsichtlich Behandlungsmöglichkeiten

als auch Screeningverfahren zur Früherkennung und Prävention fehlen somit geeignete Strategien in der Klinik. Weitere Forschung zu den Ursachen und pathophysiologischen Veränderungen sind essentiell dafür.

2.4. Bedeutung des Immunsystems im Endometrium und der Plazenta

Die Diversität des Tumormikromilieus wie in Kapitel 2.2. dargestellt, ergibt sich auch aus der phänotypischen und funktionalen Plastizität der Immunzellen sowie deren Vorläuferzellen [90]. Entsprechend sollten auch differenzierte hämatopoetische Zellen eher in dynamischem Zustand, denn als Subtypen mit starrer Einteilung gesehen werden. Ständige Anpassungen der Immunzellzusammensetzung des Endometriums sind allerdings auch natürlich während des Zyklus vorhanden und ein Ergebnis hormoneller Einflüsse [52]. Bezüglich der Bedeutung von Abwehr und Toleranz nimmt das Endometrium eine einzigartige Rolle ein [91, 92]. Einerseits muss es den Schutz vor Krankheitserregern sicherstellen und andererseits fähig sein, einen immunsuppressiven Zustand zuzulassen, um eine feto-maternale Toleranz gegenüber einem semi-allogenen Fötus zu gewährleisten [91]. Eine Toleranz muss auch gegenüber den besiedelnden kommensalen Mikroorganismen des Uterus bestehen, um die natürliche Symbiose aufrecht zu erhalten [93, 94]. Dies wird durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen den hormonellen Schwankungen des Menstruationszyklus und dem Immunsystem möglich [92, 95].

So nimmt die Zahl der Makrophagen [96] und natürlichen Killerzellen (NK) bis zur Menstruation zu [97, 98], was möglicherweise ihre Rolle in der Phase der gestörten Schleimhautbarriere bei der Abstoßung des Endometriums widerspiegelt. Dagegen verlieren B- und T-Zellen in der Gebärmutter Schleimhaut während der proliferativen Phase vorübergehend ihre zytotoxischen Eigenschaften, sodass eine Einnistung stattfinden kann [52, 98].

Auch im Verlauf der Schwangerschaft spielen physiologisch sowohl Veränderungen in der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort eine Rolle [82, 83]. Die Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz wird u.a. über die Inhibition verschiedener Immunzellen, wie zytotoxischer T-Lymphozyten [99], gewährleistet. 30 – 40 % der dezidualen Zellen sind Leukozyten, wobei NK-Zellen und Makrophagen vorherrschend sind [100–102] und folgende Funktionen haben: beide regulieren die Trophoblastzellinvasion und die Umformung der Spiralarterien, bei der Plazentabildung [100, 102, 103]. Dagegen sind deziduale Makrophagen, die als antiinflammatorische Typ-2 Makrophagen beschrieben werden [104], auch als antigenpräsentierende Zellen an der Abwehr uteriner Infektionen beteiligt [102].

Die Bedeutung des Immunsystems setzt sich auch in der Pathophysiologie der Präeklampsie durch Veränderungen in der Plazenta fort. Bezüglich der in der Dezidua dominanten Immunzelltypen NK-Zellen und Makrophagen ergab sich durch bisherige Studien kein eindeutiges Bild zu Veränderungen der Zellzahl in der PE. Für beide wurden sowohl erhöhte als auch erniedrigte Zellzahlen festgestellt [100, 105, 106]. Bei getrennter Betrachtung der M1 und M2 Makrophagen, scheinen aber M1 zuzunehmen und M2 abzunehmen, was sich funktionell mit dem Bild einer erhöhten Entzündungsreaktion deckt [107, 108]. Dennoch wurden mehrfach eine veränderte Zytokinsekretion der T-Zellen und NK-Zellen in der PE gezeigt,

die eine verstärkte Entzündungsreaktion gegen die Trophoblasten hervorrufen und die Trophoblastinvasion stören [84, 85]

Mit dem Hintergrund dieser einzigartigen Physiologie des Endometriums ist die Identifizierung neuer therapeutische Angriffspunkte eine besonders komplexe Herausforderung, sowohl in schwangerschaftsassozierten Erkrankungen wie der PE als auch im EC.

2.5. Regulatorische T-Zellen (Treg) und das Chemokin CCL22

2.5.1. Anreicherung tumor-assoziiertes Treg fördert das Tumorstadium und korreliert mit der Prognose

Die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen stellt einen in vielen Tumorentitäten untersuchten Mechanismus zur Generierung eines immunsuppressiven TME dar. Es handelt sich um eine CD4⁺ T-Zell Subpopulation, die physiologisch einen Beitrag zur Gewährleistung der Immunhomöostase leistet, indem sie überschießende Immunantworten verhindert [109]. Pathophysiologisch sind sie im Zusammenhang mit Krebserkrankungen folglich mit einem immunsuppressiven Einfluss verbunden, der die körpereigene Tumorabwehr hemmt.

Ihre regulatorischen Funktionen werden mechanistisch sowohl durch Sekretion löslicher Faktoren als auch durch direkten Zellkontakt beschrieben: Die Kostimulation naiver T-Zellen wird durch die inhibitorische Wirkung von Immuncheckpoint Molekülen wie CTLA-4 und LAG 3 eingeschränkt [110, 111]. Außerdem sezernieren Treg IL-10 und TGF- β , die die Proliferation von T-Zellen hemmen [112, 113]. Ein Einfluss auf die Apoptose von Effektor-T-Zellen und das IL-2 Milieu durch Treg wird diskutiert [114].

Treg werden mehrheitlich als CD25⁺ und FoxP3⁺ charakterisiert [115, 116]. Der Transkriptionsfaktor *Forkhead-Box-Protein 3* (FoxP3) ist essentiell für ihre Differenzierung und Funktion [117, 118]. Zunehmend zeigt sich jedoch, dass diese Marker nicht ausreichend sind und verschiedene Subgruppen von Treg betrachtet werden müssen: Für FoxP3 und CD25 hat sich eine differenziertere Auftrennung in high und low Fraktionen durchgesetzt. Zudem etabliert sich CD45RA als zusätzlicher Marker. Die immunsuppressive Subpopulation eTreg (*effector*) wird beschrieben als CD25^{high}FoxP3^{high}CD45RA⁺ [119, 120]. Im Gegensatz dazu haben CD25⁺CD45RA⁺FoxP3^{low} nTreg (*non* oder *naive*) eher proinflammatorische Eigenschaften [118, 119, 121, 122]. CD4⁺ T Zellen können aber dynamisch in die eine oder andere Richtung ihren Phänotyp und auch ihre funktionellen Eigenschaften ändern durch entsprechende Stimulation [123–126]. Weitere Marker wie Helios, CD15s, CTLA4, CD127 und CCR4 werden diskutiert [123, 127–130], um die immunsupprimierende Treg Subpopulationen besser zu charakterisieren. Die einzelnen Subgruppen werden in der Literatur noch unterschiedlich beschrieben und benannt. Die genauere Subtypisierung der Treg-Populationen bedarf demzufolge weiterer Forschung.

Eine FoxP3 Expression wird in einigen Tumorentitäten auch durch Tumorzellen, wie im Brustkrebs [131], Melanom [132] oder oralen Plattenepithelkarzinom [133], beschrieben. Lurchenko et al. und Yamagami et al. geben dies auch im EC an, allerdings bei fehlender Beschreibung, wie die FoxP3⁺ Zellen als Tumorzellen identifiziert wurden [134, 135].

Häufiger untersucht ist dagegen die prognostische Bedeutung tumor-assoziiertes FoxP3⁺ Treg. Sie variiert zwischen den verschiedenen Tumorentitäten: Während die Invasion FoxP3⁺ Treg im Ovarialkarzinom [136], Bronchialkarzinom [137], hepatozellulärem Karzinom [138] und Brustkrebs [139, 140] eher mit einer

negativen klinischen Prognose korreliert, resultiert unter den Lymphomkrankungen eher eine positive Prognose [141, 142].

Im EC wurde die Bedeutung von Treg schon mehrfach immunhistologisch untersucht. Einheitlich wurde dabei FoxP3 als Marker für alle immunsuppressiven Treg angenommen. Die Ergebnisse sind inkohärent [143]. Während meist kein Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens detektiert wurde [56, 144, 145], wurde häufig von signifikanten Unterschieden bezüglich des Grading Status berichtet [134, 135, 144, 146]. Allerdings weisen alle Studien große Differenzen bezüglich der Kollektivgröße und -zusammensetzung auf. Weitere Studien finden sich zur Bestimmung von Treg aus peripherem Patientenblut [147, 148].

Auch der Mechanismus der Treg Anreicherung im Tumorgewebe ist nur teilweise geklärt. Zum einen wird die Treg-Proliferation stimuliert als Reaktion auf lokale Inflammation durch TGF- β und IL-10 [149]. Die schon beschriebene Plastizität der T-Zellen kann ebenso den Anteil von Treg im TME erhöhen, indem naive und Gedächtnis-T-Zellen nach Kontakt mit unreifen antigenpräsentierenden Zellen oder MDSC zu Treg differenzieren [150]. Eine gerichtete Migration, getriggert durch Chemokine, stellt einen weiteren wichtigen Mechanismus dar für eine spezifische Treg-Anreicherung.

2.5.2 Bedeutung und Vorkommen von Treg und CCL22 in gesundem Endometrium und Plazenta

Aufgrund der bereits erwähnten, besonderen Stellung des Uterus in der Balance zwischen Abwehr exogener Pathogene und parallel notwendiger Toleranz zur Implantation und Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft, muss ein Blick bei der Betrachtung des EC auch immer den Verhältnissen im gesunden Endometrium gelten. Eng damit ist dann folgerichtig auch die Bedeutung des Immunsystems in der Plazenta verbunden [151, 152]. Der Dezidua, die sich aus Stromazellen des Endometriums entwickelt, ist dabei besondere Aufmerksamkeit zu schenken [153]. Das Wachstum der Trophoblasten der Plazenta wird aufgrund ihres invasiven Eindringens in Fremdgewebe der Mutter auch partiell mit Tumorwachstum verglichen [154].

Die hormonelle Zyklussteuerung scheint auch Auswirkungen auf das Treg-Level zu haben: Estrogen induziert die Expansion FoxP3⁺ Treg sowohl im Endometrium [155, 156] als auch im Uterus während der Schwangerschaft [157]. Folgerichtig können Treg als Regulatoren anderer Immunzellen [158, 159] einen Beitrag zur Toleranz gegenüber dem Fötus und der Erhaltung der Schwangerschaft leisten [157].

Die Anzahl regulatorischer T-Zellen in regulär verlaufenden Schwangerschaften steigt bis zum Ende des zweiten Trimesters sowohl peripher als auch lokal in der Plazenta [160, 161]. Im dritten Trimester sinkt die Zahl dagegen wieder [160, 162]. In der PE ergeben sowohl Untersuchungen zur Anzahl peripherer Treg [163, 164], als auch zu dezidualen Treg bisher kein einheitliches Bild [165, 166]. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise auf Funktionsstörungen der Treg in der PE Plazenta [158, 163, 167].

CCL22, auch bekannt als Macrophage-derived-Chemokine (MDC), wurde erstmals von Godiska et.al als konstitutiv exprimiertes Chemokin in differenzierten Makrophagen und dendritischen Zellen beschrieben [168]. In der Folge wurden weitere CCL22-produzierende Zellen identifiziert: eine konstitutive Expression findet in epithelialen Zellen des Thymus [169] und anderen lymphatischen Organen statt [170], während eine induzierte Expression auch in T-Helfer-Zellen [171, 172], B-Zellen [173] und Monozyten [174] gefunden wurde. CCL22 ist der Ligand für CCR4, einen Chemokin-Rezeptor, der neben Treg auch auf der Oberfläche von T_{H2} Zellen exprimiert ist [136, 175, 176]. Physiologisch trägt CCL22 so zur Immunregulation bei, z.B.

im Rahmen der Treg-vermittelten Entzündungskontrolle der Haut, der Lunge oder des Brustgewebes [177–179]. In gesundem Endometrium wurde bislang eine Expression sowohl durch Stroma- als auch durch Drüsenzellen beschrieben sowie eine induzierte Expression unter Progesterontherapie [180].

Forschung zu CCL22 in der Schwangerschaft zeigte, dass das Chemokin an der M2-Polarisation der plazentaren Makrophagen und der Treg Rekrutierung beteiligt ist [181, 182]. Als exprimierende Zellen werden neben Immunzellen auch maternale Trophoblasten genannt [182], wodurch ihre Fähigkeit zur Rekrutierung von Treg erklärt werden kann [183, 184]. In der PE wurde eine erhöhte CCL22 Expression in der Plazenta gefunden [182, 185].

2.6. Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Für zahlreiche Tumorerkrankungen wurde bereits eine Anreicherung regulatorischer T-Zellen beschrieben, die eine tumorgerichtete Immunantwort unterdrücken und folglich oft mit verkürztem Überleben assoziiert sind. Der genaue Mechanismus der Rekrutierung sowie die Aufklärung der Tumor-Treg-Interaktion könnte sowohl prognostische als auch therapeutische Bedeutung haben. In dieser Studie sollte der Einfluss regulatorischer T-Zellen im Endometriumkarzinom weiter aufgeklärt werden.

Obwohl Treg schon mehrfach im EC untersucht wurden, ergaben sich bislang widersprüchliche Ergebnisse, und bisherige Veröffentlichungen beziehen nur immunhistologische Methoden ein. Eine Kombination immunhistologischer Untersuchungen in einem großen Kollektiv endometroider Adenokarzinome, ergänzt durch in vitro Untersuchungen, sollte in dieser Studie die prognostische Relevanz von FoxP3⁺ Treg sowie mögliche funktioneller Einflüsse besser beleuchten.

Neben dem Fokus auf das EC sollte aber der Blickwinkel auch auf das gesunde Endometrium, sowie die Physiologie und Pathophysiologie der Plazenta erweitert werden, um ein umfassenderes Bild der uterinen Verhältnisse bezüglich Treg zu gewinnen. Zusätzlich wurde hier auch das Treg-rekrutierende Chemokin CCL22 mit einbezogen, was ebenso für das EC der nächste Schritt sein muss, da das Chemokin bisher nicht in der Tumorentität untersucht wurde.

Diese Promotionsarbeit soll zu einem besseren Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung regulatorischer T-Zellen im Bereich des Endometriums, EC sowie der Plazenta und der PE als plazentarer Erkrankung beitragen. Mit dem Fokus auf das EC war das Ziel neben der Aufklärung der prognostischen Bedeutung von Treg vor allem auch einen Beitrag zum Verständnis der funktionalen Zusammenhänge zwischen Tumorzellen und Treg zu leisten. Die entitätsspezifische Charakterisierung der Tumor-Immunsystem-Interaktionen ist essentiell um neue Möglichkeiten für therapeutische Angriffspunkte und auftretendes Therapieversagen bei Immuntherapien zu erklären und weitere Schritte Richtung einer verbesserten personalisierten Behandlung der Patientinnen zu gehen.

Kapitel 3: Paper I: Presence of regulatory T-cells in endometrial cancer predicts poorer overall survival and promotes progression of tumor cells

Kolben Thomas*, Mannewitz Mareike*, Perleberg Carolin, Schnell Konstantin, Anz David, Hahn Laura, Meister Sarah, Schmoeckel Elisa, Burges Alexander, Mahner Sven, Jeschke Udo, Corradini Stefanie, Trillsch Fabian, Beyer Susanne

Cellular Oncology 2022 Aug, doi: 10.1007/s13402-022-00708-2

* Geteilte Erstautorenschaft

Kapitel 4: Paper II: Regulatory T Cell Apoptosis during Preeclampsia may be prevented by Gal-2

Meister Sarah, Hahn Laura, Beyer Susanne, Mannewitz Mareike, Perleberg Carolin, Schnell Konstantin, Anz David, Corradini Stefanie, Schmoeckel Elisa, Mayr Doris, Hasbargen Uwe, Zati Zehni Alaleh, Mahner Sven, Jeschke Udo, Kolben Thomas

International Journal of Molecular Sciences 2022 Feb, doi: 10.3390/ijms23031880

5. Zusammenfassung

Das Endometriumkarzinom stellt weltweit das häufigste Malignom des weiblichen Genitals dar und insbesondere Patientinnen mit fortgeschrittenen oder rezidierten Stadien bedürfen aufgrund der schlechten Prognose weiterer Behandlungsstrategien [186, 187]. Da das EC sich zunehmend als immunogener Tumor präsentiert, wird auf die Forschung und Entwicklung neuer Immuntherapeutika große Hoffnung gesetzt [52, 188, 189]. Ein besseres Verständnis der Bedeutung FoxP3⁺ Treg soll dazu beitragen, die molekularen Mechanismen der Erkrankung besser zu verstehen, um potentielle therapeutische Angriffspunkte daraus ableiten zu können.

Neben einem deutlichen Einfluss FoxP3⁺ Treg auf das Überleben der Patientinnen einer großen Kohorte endometroider Adenokarzinome resultierte auch ein Beitrag zur Aufklärung funktioneller Zusammenhänge: Veränderungen der Eigenschaften der Tumorzellen, u.a. der Viabilität und Migrationsfähigkeit, nach Kontakt mit Treg wurden in Kokultorexperimenten detektiert. Andererseits wurde die Veränderung der PBMC-Subpopulation mit spezifischem Blick auf die Treg-Subpopulation nach Kokultur mit EC-Zelllinien betrachtet. Um unsere Daten zu stärken im Hinblick auf immunsuppressive Treg wurden die etablierten Marker CD25 und FoxP3, sowohl in der Histologie als auch in den in-vitro Versuchen durch zusätzliche Betrachtung von CCR4 und CD45RA erweitert.

Daneben gibt die Arbeit Einblicke in die physiologische Bedeutung von Treg und CCL22 in gesundem Endometrium sowie in der Plazenta bei Patientinnen mit PE. Eine verringerte Anzahl dezidualer FoxP3⁺ Treg und erhöhte Expression von CCL22 in der Plazenta präeklampsischer Patientinnen konnte festgestellt werden. Da dennoch eine positive Korrelation zwischen beiden Markern bestand, entstand die Hypothese, dass rekrutierte Treg in der PE eine erhöhte Apoptoserate aufweisen. Dieses wurde histologisch mittels Immunfluoreszenz bestätigt und zusätzlich in vitro Galectin-2 als potentielles Target, Treg vor Apoptose zu bewahren, identifiziert.

So konnte der Zusammenhang zwischen FoxP3⁺ Treg und ihrem anlockenden Chemokin CCL22 erstmals für die Präeklampsie beschrieben werden und der Zusammenhang mit Gal-2 und der Treg Apoptose als Ansatzpunkt weiterer Forschung dienen.

Die vorgestellte Arbeit leistet insbesondere aber weitere Einblicke in die Bedeutung regulatorischer T-Zellen im Rahmen der *immune escape* Mechanismen im EC. Treg stellen damit ein mögliches Ziel neuartiger Tumorimmuntherapien dar. Das komplexe Wechselspiel zwischen Tumorzellen und infiltrierenden Immunzellen bedarf allerdings weiterer Forschungsarbeiten.

6. Abstract

Endometrial carcinoma represents the most common malignancy of the female genital tract worldwide, and particularly patients in advanced or recurrent stages require further treatment strategies due to their poor prognosis [186, 187]. As EC turns increasingly out to be an immunogenic tumor, great hope lies in the research and development of new immunotherapeutic strategies [52, 188, 189]. A better understanding of the importance of FoxP3⁺ Treg should help to elucidate the molecular mechanisms of the disease in order to derive potential therapeutic targets.

Besides a clear influence of FoxP3⁺ Treg on the survival in a large cohort of patients with endometrioid adenocarcinomas, a contribution to the elucidation of functional adaptations in tumor cell characteristics resulted: Especially adaptations in viability and migration ability after contact with Treg were detected in coculture experiments. On the other hand, alterations in PBMC composition with specific regard to the Treg subpopulation after coculture with EC cell lines were considered. To strengthen our data with regard to immunosuppressive Treg, the established markers, CD25 and FoxP3, were extended in histology as well as in *in vitro* experiments by additional consideration of CCR4 or CD45RA, and measurements of suppressive cytokines were added.

In addition, this work provides insights into the physiological relevance of Treg and CCL22 in healthy endometrium as well as in the placenta of patients with PE. We found a decreased number of decidual FoxP3⁺ Treg and increased expression of CCL22 in the placenta of preeclamptic patients. Nevertheless, because there was a positive correlation between both markers, the hypothesis arose that recruited Treg in PE show an increased rate of apoptosis. This was confirmed by immunofluorescence and additionally Gal-2 was identified *in vitro* as a potential target to prevent Treg from apoptosis.

Thus, the relationship between FoxP3⁺ Treg and their attracting chemokine CCL22 could be described for the first time for preeclampsia and the connection with Gal-2 and Treg apoptosis could serve as a starting point for further research.

However, the presented work particularly provides further insights into the importance of regulatory T cells in the context of immune escape mechanisms in EC. Treg thus represent a potential target of novel tumor immunotherapies. However, the complex interplay between tumor cells and infiltrating immune cells requires further research.

7. Ausblick

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und in Zusammenschau der derzeitigen Datenlage in der Literatur werden hier abschließend noch einige weiterführende Forschungsansätze diskutiert.

Zunächst ist für jedes Thema der Grundlagenforschung zu EC die Einbindung der aktuellen klinischen Entwicklungen in der Diagnostik und Forschung relevant, d.h. Patientenpanel müssen um die neu eingeführten Standardmarker p53abn, den MSI Status und die POLE-Mutation erweitert werden, um neueste Erkenntnisse der Forschung im aktuellen klinischen Bezug einordnen zu können.

Diese Arbeit bestätigt für das EC, was in vielen anderen Tumorentitäten bereits bekannt ist: Eine erhöhte Invasion immunsuppressiver regulatorischer T-Zellen führt zu einem erniedrigten Gesamtüberleben der Patientinnen. Neu sind aber erste Hinweise auf mechanistische Zusammenhänge zur Tumorprogression durch den Nachweis veränderter Tumorzelleigenschaften in Anwesenheit von Treg. Dies kann als Anhaltspunkt dienen, die Mechanismen der Invasion und Migration von Tumorzellen im EC weiter zu untersuchen, z.B. den Zusammenhang von Treg mit verstärkter epithelialer-mesenchymaler Transition (EMT) unter Berücksichtigung der entsprechenden epithelialen und mesenchymalen Marker [190].

Der komplexe Einfluss von Treg im TME erstreckt sich aber nicht nur auf die Interaktion mit Tumorzellen, sondern auch mit anderen Immunzellen [115]. Weiterführend relevant wäre dabei die Frage zu untersuchen, auf welchem Weg die Hemmung der Effektorzellen durch Treg bei malignen Erkrankungen zustande kommt. Dafür ist zunächst eine genaue Kenntnis des TME mit allen Immunzellen wichtig, um anschließend eine entsprechende Korrelation mit Effektorzellen zu identifizieren. Unsere vorgestellten Ergebnisse, dass sowohl M1- als auch M2-Makrophagen, wenn auch in unterschiedlichen Gewebereichen, um den Tumor vorhanden sind, können als Ausgangspunkt dienen, weitere Immunzellpopulationen zu untersuchen, inklusive der räumlichen Verteilung im Gewebe.

Wie bereits in den Veröffentlichungen diskutiert, etabliert sich eine zunehmende Subklassifizierung der regulatorischen T-Zellen mit unterschiedlichen Funktionen, insbesondere hinsichtlich ihrer immunsupprimierenden Eigenschaften. Eine differenziertere Betrachtung unter Einbindung weiterer Marker muss zukünftig noch weiter erforscht werden, wird aber immer bedeutender. Gleichzeitig besteht hier auch das Potential, die zuweilen konträren Ergebnisse bezüglich der Überlebensprognose [143], die auch als „Duale Rolle der Treg“ beschrieben wurde [191], weiter aufzuklären.

Die Untersuchung von CCL22 in Plazenta von PE Patientinnen hat die Bedeutung des Chemokins bei der Treg Rekrutierung unterstrichen. Weiterführend wäre hier interessant, weitere Chemokine, die inzwischen als relevant bei Treg Rekrutierung beschrieben wurde, auch in der PE zu untersuchen. [192–194]. Daneben verspricht die genauere Erforschung von Gal-2 in der Plazenta neue Erkenntnisse. Generell ist natürlich auch für alle Untersuchungen zu Treg in der Plazenta relevant, die Subcharakterisierung der Treg anhand neuer diskutierter Marker in Betracht zu nehmen.

Zur Ergänzung unserer Daten zu Treg im Endometriumkarzinom bietet sich folgerichtig die Untersuchung von CCL22 im EC und Endometrium an. CCL22 wurde bisher nur im Zusammenhang mit Endometriose

untersucht, lieferte in verschiedenen Tumorentitäten aber bereits vielversprechende Ergebnisse bezüglich einer Beeinflussung der Prognose und des Tumorwachstums.

Die erhöhte CCL22-Expression in malignen Tumoren wird mehrheitlich mit einer Anreicherung regulatorischer T-Zellen im Tumorbereich und einer lokalen Unterdrückung der tumorgerichteten Immunantwort in Verbindung gebracht [194, 195]. Folge davon ist ein beschleunigtes Tumorwachstum und eine negative Prognose [136, 196]. Es gibt allerdings auch Studien, die einen inhibierenden Effekt auf das Tumorwachstum zeigten [197, 198].

Die Hauptquelle von CCL22 bei malignen Erkrankungen sehen einige Studien in Immunzellen. Dabei werden vornehmlich Makrophagen und dendritische Zellen genannt [199, 200]. Die Rolle von nicht-Immunzellen in Zusammenhang mit dem Chemokin CCL22 wird noch kontrovers diskutiert. Eine Expression durch Epithel wurde nachgewiesen und zeigt sich auch in einigen Tumorentitäten [136, 139], während andere scheinbar kein CCL22 produzieren [200–202]. Hier wäre insbesondere auch zu bedenken, ob die funktionelle Bedeutung des tumorgenerierten CCL22 über die Treg-Assoziierung hinausgeht. Erste Anzeichen für mögliche weitere Funktionen wurden im Bereich der Tumorzellproliferation und –migration gezeigt [197, 203–205].

Die Bedeutung von CCL22 im EC konnte ich als Folgeprojekt basierend auf den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen durchführen und wurde somit von unserer Arbeitsgruppe erstmals im EC untersucht. Eine Publikation ist geplant (s. Anhang, S.68ff.). Die Zwischenergebnisse legen nahe, dass CCL22 das Gesamtüberleben von Krebspatientinnen negativ beeinflusst. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich aber, dass der Zusammenhang deutlich komplexer ist. Es muss sowohl die produzierende Zellpopulation als auch die histologische Verteilung des Chemokins in Betracht gezogen werden. Unsere Ergebnisse ergaben, dass hohe CCL22 Konzentration im tumornahen Stroma und Myometrium das Gesamtüberleben herabsetzt, während sich tumorferne M1-Makrophagen die ebenso CCL22 exprimieren, als unabhängiger prognostischer Marker für ein verbessertes Überleben erwiesen. Neben Immunzellen als Quelle für CCL22, zeigte sich im EC sowohl in Zellkulturversuchen als auch in histologischen Auswertungen aber auch eine Expression durch Tumorzellen, die wiederum einen positiven Einfluss auf das Überleben hat. In vitro bestätigte sich eine CCL22 Expression sowohl durch Immunzellen als auch Tumorzellen, dabei sind aber PBMC als dominante Zellfraktion bei der Sekretion.

CCL22-exprimierende Zellen und Treg stellen damit ein mögliches Ziel neuartiger Tumormimmuntherapien dar. Das komplexe Wechselspiel zwischen Tumorzellen und infiltrierenden Immunzellen bedarf allerdings weiterer Forschungsarbeiten.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
CCL22	CC-motif-ligand 22
CCR4	C-C Chemokin Rezeptor Typ 4
CD	cluster of differentiation
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
dMMR	deficient mismatch repair protein
EC	Endometrial cancer/ Endometriumkarzinom
EMA	European Medicines Agency/ Europäische Arzneimittelagentur
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
eTreg	effector
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FoxP3	Forkhead-Boxprotein-3
Gal-2	Galctin 2
IFN γ	Interferon-gamma
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IL	Interleukin
LAG3	lymphocyte-activation gene 3
MDC	macrophage derived chemokine
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MMR	mismatch repair protein
MSIlow	low microsatellite instability
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
nTreg	non/naïve
p53/abn	aberrantes p53 Protein
PBMC	periphere mononuclear cells
PCOS	Polyzystisches Ovar Syndrom
PD-L1	programmed death-ligand 1
PE	Präeklampsie
POLE	DNA polymerase epsilon
ProMisE	proactive molecular risk classifier for endometrial cancer
TAM	tumor associated macrophages
TGF β	tumor growth factor
TME	tumor microenvironment(Tumormikromilieu)
TNF α	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T Zellen
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.)
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf (abgerufen am 17.12.2021).
2. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 (Robert Koch-Institut (Hrsg). Berlin)
<https://edoc.rki.de/handle/176904/3264> (abgerufen am 17.12.2021).
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359-86. doi:10.1002/ijc.29210.
4. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983;15:10–7. doi:10.1016/0090-8258(83)90111-7.
5. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom, Kurzversion 1.0, 2018, AWMF Registernummer: 032/034-OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/endometriumkarzinom/> (abgerufen am 17.12.2021).
6. Colombo N, Preti E, Landoni F, Carinelli S, Colombo A, Marini C, Sessa C. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 6:vi33-8. doi:10.1093/annonc/mdt353.
7. Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, et al. Endometrial cancer: a review and current management strategies: part I. *Gynecol Oncol*. 2014;134:385–92. doi:10.1016/j.ygyno.2014.05.018.
8. Pike MC, Peters RK, Cozen W, Probst-Hensch NM, Felix JC, Wan PC, Mack TM. Estrogen-progestin replacement therapy and endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:1110–6. doi:10.1093/jnci/89.15.1110.
9. Yang HP, Wentzensen N, Trabert B, Gierach GL, Felix AS, Gunter MJ, et al. Endometrial cancer risk factors by 2 main histologic subtypes: the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am J Epidemiol*. 2013;177:142–51. doi:10.1093/aje/kws200.
10. Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia*. 2007;50:1365–74. doi:10.1007/s00125-007-0681-5.
11. Donkers H, Bekkers R, Massuger L, Galaal K. Socioeconomic deprivation and survival in endometrial cancer: The effect of BMI. *Gynecol Oncol*. 2020;156:178–84. doi:10.1016/j.ygyno.2019.10.030.
12. Barry JA, Azizia MM, Hardiman PJ. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 2014;20:748–58. doi:10.1093/humupd/dmu012.
13. Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA*. 2002;288:872–81. doi:10.1001/jama.288.7.872.
14. DeMichele A, Troxel AB, Berlin JA, Weber AL, Bunin GR, Turzo E, et al. Impact of raloxifene or tamoxifen use on endometrial cancer risk: a population-based case-control study. *J Clin Oncol*. 2008;26:4151–9. doi:10.1200/JCO.2007.14.0921.
15. Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang Y-B, et al. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *J Clin Oncol*. 2013;31:2607–18. doi:10.1200/JCO.2012.48.2596.
16. Parazzini F, La Vecchia C, Bocciolone L, Franceschi S. The epidemiology of endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 1991;41:1–16. doi:10.1016/0090-8258(91)90246-2.
17. Cancer Facts & Figures 2016 (American Cancer Society)
<http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2016/> (abgerufen am 17.12.2021).

18. WHO 2014. Zaino R, Carinelli SG, Ellenson LH et al. Tumours of the uterine Corpus: epithelial Tumours and Precursors. In: Kurman RJ, Carcanglu ML, Herrington CS, Young RH, eds. WHO Classification of Tumours of female reproductive Organs. 4th ed. Lyon: WHO Press; 2014: 125-126.
19. Murali R, Soslow RA, Weigelt B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *The Lancet Oncology*. 2014;15:e268-e278. doi:10.1016/S1470-2045(13)70591-6.
20. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497:67–73. doi:10.1038/nature12113.
21. Kommoss S, McConechy MK, Kommoss F, Leung S, Bunz A, Magrill J, et al. Final validation of the ProMisE molecular classifier for endometrial carcinoma in a large population-based case series. *Ann Oncol*. 2018;29:1180–8. doi:10.1093/annonc/mdy058.
22. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N, et al. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer*. 2015;113:299–310. doi:10.1038/bjc.2015.190.
23. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Yang W, Lum A, Senz J, et al. Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. *Cancer*. 2017;123:802–13. doi:10.1002/cncr.30496.
24. Alicia León-Castillo, Stephanie M. de Boer, Melanie E. Powell, Linda R. Mileshekin, Helen J. Mackay, Alexandra Leary, et al. Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy.
25. Talhouk A, Derocher H, Schmidt P, Leung S, Milne K, Gilks CB, et al. Molecular Subtype Not Immune Response Drives Outcomes in Endometrial Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2019;25:2537–48. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3241.
26. Tiffen JM, Mahon SM. Educating women regarding the early detection of endometrial cancer—what is the evidence? *Clin J Oncol Nurs*. 2006;10:102–4. doi:10.1188/06.CJON.102-104.
27. Berek JS und Hacker NF. Berek and Hacker’s Gynecologic Oncology. 6th ed. Alphen aan den Rijn: Wolters Kluwer Health; 2015.
28. Clark TJ, Mann CH, Shah N, Khan KS, Song F, Gupta JK. Accuracy of outpatient endometrial biopsy in the diagnosis of endometrial cancer: a systematic quantitative review. *BJOG*. 2002;109:313–21. doi:10.1111/j.1471-0528.2002.01088.x.
29. Amant F, Mirza MR, Creutzberg CL. Cancer of the corpus uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2012;119:S110-S117. doi:10.1016/S0020-7292(12)60024-1.
30. Soslow RA, Tornos C, Park KJ, Malpica A, Matias-Guiu X, Oliva E, et al. Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice: Recommendations of the International Society of Gynecological Pathologists. *Int J Gynecol Pathol*. 2019;38 Suppl 1:S64-S74. doi:10.1097/PGP.0000000000000518.
31. Horn L-C, Schierle K, Schmidt D, Ulrich U, Wittekind C. Neues TNM/FIGO-Staging-System für das Zervix- und Endometriumkarzinom sowie maligne Müller’sche Mischtumoren (MMMT) des Uterus. *Geburtsh Frauenheilk*. 2009;69:1078–81. doi:10.1055/s-0029-1240644.
32. Prat J. FIGO staging for uterine sarcomas. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;104:177–8. doi:10.1016/j.ijgo.2008.12.008.
33. Wittekind C, Bootz F, Meyer H-J. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 6th ed. Berlin: Springer; 2003.
34. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. *The Lancet*. 2016;387:1094–108. doi:10.1016/S0140-6736(15)00130-0.
35. Todo Y, Kato H, Kaneuchi M, Watari H, Takeda M, Sakuragi N. Survival effect of para-aortic lymphadenectomy in endometrial cancer (SEPAL study): a retrospective cohort analysis. *The Lancet*. 2010;375:1165–72. doi:10.1016/S0140-6736(09)62002-X.

36. Chan JK, Kapp DS. Role of complete lymphadenectomy in endometrioid uterine cancer. *The Lancet Oncology*. 2007;8:831–41. doi:10.1016/S1470-2045(07)70275-9.
37. Offene Studien-ECLAT_Deutsche Synopse.2018 (AGO Research GmbH)
https://ago-ovar.de/wp-content/uploads/2020/07/eclat_deutsche_synopse_v01f_2018-01-16_korr.pdf (abgerufen am 17.12.2021).
38. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, van Limbergen E, Vergote I. Treatment modalities in endometrial cancer. *Curr Opin Oncol*. 2007;19:479–85. doi:10.1097/CCO.0b013e32827853c0.
39. Oaknin A, Tinker AV, Gilbert L, Samouëlian V, Mathews C, Brown J, et al. Clinical Activity and Safety of the Anti-Programmed Death 1 Monoclonal Antibody Dostarlimab for Patients With Recurrent or Advanced Mismatch Repair-Deficient Endometrial Cancer: A Nonrandomized Phase 1 Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6:1766–72. doi:10.1001/jamaoncol.2020.4515.
40. Jemperli, INN-dostarlimab (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), EMA)
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/jemperli-epar-product-information_de.pdf (abgerufen am 17.12.2021).
41. CREASMAN WT. Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer. *Cancer*. 1993;71:1467–70. doi:10.1002/cncr.2820710411.
42. Soslow RA. Endometrial carcinomas with ambiguous features. *Semin Diagn Pathol*. 2010;27:261–73. doi:10.1053/j.semmp.2010.09.003.
43. Burnet FM. IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF MALIGNANT DISEASE. *The Lancet*. 1967;289:1171–4. doi:10.1016/S0140-6736(67)92837-1.
44. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16:151–67. doi:10.1038/s41571-018-0142-8.
45. Kunimasa K, Goto T. Immunosurveillance and Immunoediting of Lung Cancer: Current Perspectives and Challenges. *Int J Mol Sci* 2020. doi:10.3390/ijms21020597.
46. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
47. Tang S, Ning Q, Yang L, Mo Z, Tang S. Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle. *Int Immunopharmacol*. 2020;86:106700. doi:10.1016/j.intimp.2020.106700.
48. Yervoy, INN-Ipilimumab (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), EMA)
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yervoy-epar-product-information_en.pdf (abgerufen am 17.12.2021).
49. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;373:1627–39. doi:10.1056/NEJMoa1507643.
50. Callahan MK, Wolchok JD. At the bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*. 2013;94:41–53. doi:10.1189/jlb.1212631.
51. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39:1–10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012.
52. Longoria TC, Eskander RN. Immunotherapy in endometrial cancer - an evolving therapeutic paradigm. *Gynecol Oncol Res Pract*. 2015;2:11. doi:10.1186/s40661-015-0020-3.

53. Davidov V, Jensen G, Mai S, Chen S-H, Pan P-Y. Analyzing One Cell at a TIME: Analysis of Myeloid Cell Contributions in the Tumor Immune Microenvironment. *Front Immunol.* 2020;11:1842. doi:10.3389/fimmu.2020.01842.
54. Tamura R, Tanaka T, Yamamoto Y, Akasaki Y, Sasaki H. Dual role of macrophage in tumor immunity. *Immunotherapy.* 2018;10:899–909. doi:10.2217/imt-2018-0006.
55. Krishnan V, Schaar B, Tallapragada S, Dorigo O. Tumor associated macrophages in gynecologic cancers. *Gynecol Oncol.* 2018;149:205–13. doi:10.1016/j.ygyno.2018.01.014.
56. Kübler K, Ayub TH, Weber SK, Zivanovic O, Abramian A, Keyver-Paik M-D, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 2014;135:176–83. doi:10.1016/j.ygyno.2014.08.028.
57. Ke X, Wu M, Lou J, Zhang S, Huang P, Sun R, et al. Activation of Toll-like receptors signaling in non-small cell lung cancer cell line induced by tumor-associated macrophages. *Chin J Cancer Res.* 2015;27:181–9. doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2015.03.07.
58. Tang F, Zheng P. Tumor cells versus host immune cells: whose PD-L1 contributes to PD-1/PD-L1 blockade mediated cancer immunotherapy? *Cell Biosci.* 2018;8:34. doi:10.1186/s13578-018-0232-4.
59. Vari F, Arpon D, Keane C, Hertzberg MS, Talaulikar D, Jain S, et al. Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood.* 2018;131:1809–19. doi:10.1182/blood-2017-07-796342.
60. Lu C, Redd PS, Lee JR, Savage N, Liu K. The expression profiles and regulation of PD-L1 in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology.* 2016;5:e1247135. doi:10.1080/2162402X.2016.1247135.
61. Park M-J, Lee S-H, Kim E-K, Lee E-J, Baek J-A, Park S-H, et al. Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice. *Sci Rep.* 2018;8:3753. doi:10.1038/s41598-018-21856-2.
62. Liu Y, Wei G, Cheng WA, Dong Z, Sun H, Lee VY, et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67:1181–95. doi:10.1007/s00262-018-2175-3.
63. Ugel S, Sanctis F de, Mandruzzato S, Bronte V. Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J Clin Invest.* 2015;125:3365–76. doi:10.1172/JCI80006.
64. Li A, Barsoumian HB, Schoenhals JE, Cushman TR, Caetano MS, Wang X, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibition targets anti-PD1-resistant lung tumors by blocking myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Lett.* 2018;431:54–63. doi:10.1016/j.canlet.2018.05.005.
65. Agostinis C, Mangogna A, Bossi F, Ricci G, Kishore U, Bulla R. Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm. *Front. Immunol.* 2019;10:2387. doi:10.3389/fimmu.2019.02387.
66. Queckbörner S, Davies LC, Grothusen C von, Santamaria X, Simón C, Gemzell-Danielsson K. Cellular therapies for the endometrium: An update. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2019;98:672–7. doi:10.1111/aogs.13598.
67. Ferenczy A, Bergeron C. Histology of the human endometrium: from birth to senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1991;622:6–27. doi:10.1111/j.1749-6632.1991.tb37847.x.
68. Ander SE, Diamond MS, Coyne CB. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci Immunol* 2019. doi:10.1126/sciimmunol.aat6114.
69. Hsu P, Nanan RKH. Innate and adaptive immune interactions at the fetal-maternal interface in healthy human pregnancy and pre-eclampsia. *Front. Immunol.* 2014;5:125. doi:10.3389/fimmu.2014.00125.
70. Huppertz B. *Die Plazenta: Grundlagen und Klinische Bedeutung.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg; 2018.

71. Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. *Reproductive medicine and biology*. 2018;17:220–7. doi:10.1002/rmb2.12088.
72. Glover LE, Crosby D, Thiruchelvam U, Harmon C, Chorcora CN, Wingfield MB, O'Farrelly C. Uterine natural killer cell progenitor populations predict successful implantation in women with endometriosis-associated infertility. *American Journal of Reproductive Immunology* 2018. doi:10.1111/aji.12817.
73. Schneider H, Husslein P, Schneider K-TM, editors. *Die Geburtshilfe*. 5th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
74. Han C, Han L, Huang P, Chen Y, Wang Y, Xue F. Syncytiotrophoblast-Derived Extracellular Vesicles in Pathophysiology of Preeclampsia. *Front Physiol*. 2019;10:1236. doi:10.3389/fphys.2019.01236.
75. Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Development* 2019. doi:10.1242/dev.163428.
76. Huang C-C, Orvis GD, Wang Y, Behringer RR. Stromal-to-epithelial transition during postpartum endometrial regeneration. *PLoS One*. 2012;7:e44285. doi:10.1371/journal.pone.0044285.
77. Bae HS, Ahn KH, Oh MJ, Kim HJ, Hong SC. Postpartum uterine involution: sonographic changes in the endometrium between 2 and 6 weeks postpartum related to delivery mode and gestational age at delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012;39:727–8. doi:10.1002/uog.11069.
78. Berzan E, Doyle R, Brown CM. Treatment of preeclampsia: current approach and future perspectives. *Curr Hypertens Rep*. 2014;16:473. doi:10.1007/s11906-014-0473-5.
79. Zhou J, Xiao X-M, Wu Y-H. Expression of interferon- γ in decidual natural killer cells from women with hypertensive disorder complicating pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014;40:670–6. doi:10.1111/jog.12216.
80. Ma Y, Ye Y, Zhang J, Ruan C-C, Gao P-J. Immune imbalance is associated with the development of preeclampsia. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98:e15080. doi:10.1097/MD.00000000000015080.
81. Cartwright JE, James-Allan L, Buckley RJ, Wallace AE. The role of decidual NK cells in pregnancies with impaired vascular remodelling. *J Reprod Immunol*. 2017;119:81–4. doi:10.1016/j.jri.2016.09.002.
82. Apicella C, Ruano CSM, Méhats C, Miralles F, Vaiman D. The Role of Epigenetics in Placental Development and the Etiology of Preeclampsia. *Int J Mol Sci* 2019. doi:10.3390/ijms20112837.
83. Deng Z, Zhang L, Tang Q, Xu Y, Liu S, Li H. Circulating levels of IFN- γ , IL-1, IL-17 and IL-22 in pre-eclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2020;248:211–21. doi:10.1016/j.ejogrb.2020.03.039.
84. Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C, Jonsson Y, Sharma S. Immunology of preeclampsia. *Chemical immunology and allergy*. 2005;89:49–61. doi:10.1159/000087912.
85. Perez-Sepulveda A, Torres MJ, Khoury M, Illanes SE. Innate immune system and preeclampsia. *Front Immunol*. 2014;5:244. doi:10.3389/fimmu.2014.00244.
86. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruyse L, van Assche A. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 1991;98:648–55. doi:10.1111/j.1471-0528.1991.tb13450.x.
87. Stepan H, Kuse-Föhl S, Klockenbusch W, Rath W, Schauf B, Walther T, Schlembach D. Diagnosis and Treatment of Hypertensive Pregnancy Disorders. Guideline of DGGG (S1-Level, AWMF Registry No. 015/018, December 2013). *Geburtsh Frauenheilk*. 2015;75:900–14. doi:10.1055/s-0035-1557924.
88. Leeman L, Dresang LT, Fontaine P. Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Am Fam Physician*. 2016;93:121–7.

89. Nguyen TPH, Patrick CJ, Parry LJ, Familiari M. Using proteomics to advance the search for potential biomarkers for preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2019;14:e0214671. doi:10.1371/journal.pone.0214671.
90. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*. 2011;12:1035–44. doi:10.1038/ni.2109.
91. Vanderstraeten A, Tuyaeerts S, Amant F. The immune system in the normal endometrium and implications for endometrial cancer development. *J Reprod Immunol*. 2015;109:7–16. doi:10.1016/j.jri.2014.12.006.
92. Wira CR, Fahey JV, Ghosh M, Patel MV, Hickey DK, Ochiel DO. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63:544–65. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00842.x.
93. Zhou JZ, Way SS, Chen K. Immunology of the Uterine and Vaginal Mucosae. *Trends Immunol*. 2018;39:302–14. doi:10.1016/j.it.2018.01.007.
94. Verstraelen H, Vilchez-Vargas R, Desimpel F, Jauregui R, Vankeirsbilck N, Weyers S, et al. Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *PeerJ*. 2016;4:e1602. doi:10.7717/peerj.1602.
95. Lee S, Kim J, Jang B, Hur S, Jung U, Kil K, et al. Fluctuation of peripheral blood T, B, and NK cells during a menstrual cycle of normal healthy women. *J Immunol*. 2010;185:756–62. doi:10.4049/jimmunol.0904192.
96. Bonatz G, Hansmann M-L, Buchholz F, Mettler L, Radzun HJ, Semm K. Macrophage- and lymphocyte-subtypes in the endometrium during different phases of the ovarian cycle. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 1992;37:29–36. doi:10.1016/0020-7292(92)90974-N.
97. Jones RK, Bulmer JN, Searle RF. Phenotypic and functional studies of leukocytes in human endometrium and endometriosis. *Human Reproduction Update*. 1998;4:702–9. doi:10.1093/humupd/4.5.702.
98. Flynn L, Byrne B, Carton J, Kelehan P, O’Herlihy C, O’Farrelly C. Menstrual cycle dependent fluctuations in NK and T-lymphocyte subsets from non-pregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol*. 2000;43:209–17. doi:10.1111/j.8755-8920.2000.430405.x.
99. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;202:1075–85. doi:10.1084/jem.20051511.
100. Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *Int J Dev Biol*. 2010;54:281–94. doi:10.1387/ijdb.082763jb.
101. Faas MM, Vos P de. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta*. 2017;56:44–52. doi:10.1016/j.placenta.2017.03.001.
102. Yang F, Zheng Q, Jin L. Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. *Front. Immunol*. 2019;10:2317. doi:10.3389/fimmu.2019.02317.
103. Ives CW, Sinkey R, Rajapreyar I, Tita ATN, Oparil S. Preeclampsia-Pathophysiology and Clinical Presentations: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76:1690–702. doi:10.1016/j.jacc.2020.08.014.
104. Liu S, Diao L, Huang C, Li Y, Zeng Y, Kwak-Kim JYH. The role of decidual immune cells on human pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2017;124:44–53. doi:10.1016/j.jri.2017.10.045.
105. Milosevic-Stevanovic J, Krstic M, Radovic-Janosevic D, Popovic J, Tasic M, Stojnev S. Number of decidual natural killer cells & macrophages in pre-eclampsia. *Indian J Med Res*. 2016;144:823–30. doi:10.4103/ijmr.IJMR_776_15.

106. Williams PJ, Bulmer JN, Searle RF, Innes BA, Robson SC. Altered decidual leucocyte populations in the placental bed in pre-eclampsia and foetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy. *Reproduction*. 2009;138:177–84. doi:10.1530/REP-09-0007.
107. Schonkeren D, van der Hoorn M-L, Khedoe P, Swings G, van Beelen E, Claas F, et al. Differential distribution and phenotype of decidual macrophages in preeclamptic versus control pregnancies. *Am J Pathol*. 2011;178:709–17. doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.011.
108. Tsao F-Y, Wu M-Y, Chang Y-L, Wu C-T, Ho H-N. M1 macrophages decrease in the deciduae from normal pregnancies but not from spontaneous abortions or unexplained recurrent spontaneous abortions. *J Formos Med Assoc*. 2018;117:204–11. doi:10.1016/j.jfma.2017.03.011.
109. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic 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. *J Immunol*. 1995;155:1151–64.
110. Huang C-T, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004;21:503–13. doi:10.1016/j.immuni.2004.08.010.
111. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206:1717–25. doi:10.1084/jem.20082492.
112. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. 1999;190:995–1004. doi:10.1084/jem.190.7.995.
113. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *Journal of Experimental Medicine*. 2001;194:629–44. doi:10.1084/jem.194.5.629.
114. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol*. 2012;3:51. doi:10.3389/fimmu.2012.00051.
115. Whiteside TL. The role of regulatory T cells in cancer immunology. *Immunotargets Ther*. 2015;4:159–71. doi:10.2147/ITT.S55415.
116. Wolf D, Sopper S, Pircher A, Gastl G, Wolf AM. Treg(s) in Cancer: Friends or Foe? *J Cell Physiol*. 2015;230:2598–605. doi:10.1002/jcp.25016.
117. Szyłberg Ł, Karbownik D, Marszałek A. The Role of FOXP3 in Human Cancers. *Anticancer research*. 2016;36:3789–94.
118. Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3+ Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity*. 2019;50:302–16. doi:10.1016/j.immuni.2019.01.020.
119. Takuro Saito, Hiroyoshi Nishikawa, Hisashi Wada, Yuji Nagano, Daisuke Sugiyama, Koji Atarashi, et al. Two FOXP3+CD4+ T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers.
120. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30:899–911. doi:10.1016/j.immuni.2009.03.019.
121. Silva-Neta HL, Brelaz-de-Castro MCA, Chagas MBO, Mariz HA, Arruda RG de, Vasconcelos VF de, et al. CD4+CD45RA-FOXP3low Regulatory T Cells as Potential Biomarkers of Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus Brazilian Patients. *Biomed Res Int*. 2018;2018:3419565. doi:10.1155/2018/3419565.

122. Munn DH, Sharma MD, Johnson TS. Treg Destabilization and Reprogramming: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancer Res.* 2018;78:5191–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1351.
123. Cao M, Cabrera R, Xu Y, Firpi R, Zhu H, Liu C, Nelson DR. Hepatocellular carcinoma cell supernatants increase expansion and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 2007;87:582–90. doi:10.1038/labinvest.3700540.
124. Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J. Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102:4091–6. doi:10.1073/pnas.0408679102.
125. Zhang N, Chen J, Xiao L, Tang F, Zhang Z, Zhang Y, et al. Accumulation Mechanisms of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells in EBV-associated Gastric Carcinoma. *Sci Rep.* 2015;5:18057. doi:10.1038/srep18057.
126. Ke X, Shen L. Targeting cytokines secreted by CD4+ CD25high CD127low regulatory T cells inhibits ovarian cancer progression. *Scand J Immunol.* 2019;89:e12736. doi:10.1111/sji.12736.
127. Miyara M, Chader D, Sage E, Sugiyama D, Nishikawa H, Bouvry D, et al. Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. *PNAS.* 2015;112:7225–30. doi:10.1073/pnas.1508224112.
128. Golding A, Hasni S, Illei G, Shevach EM. The percentage of FoxP3+Helios+ Treg cells correlates positively with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2013;65:2898–906. doi:10.1002/art.38119.
129. McClymont SA, Putnam AL, Lee MR, Esensten JH, Liu W, Hulme MA, et al. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J Immunol.* 2011;186:3918–26. doi:10.4049/jimmunol.1003099.
130. Ishida T, Ueda R. CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer. *Cancer Sci.* 2006;97:1139–46. doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00307.x.
131. Douglass S, Meeson AP, Overbeck-Zubrzycka D, Brain JG, Bennett MR, Lamb CA, et al. Breast cancer metastasis: demonstration that FOXP3 regulates CXCR4 expression and the response to CXCL12. *J Pathol.* 2014;234:74–85. doi:10.1002/path.4381.
132. Ebert LM, Tan BS, Browning J, Svobodova S, Russell SE, Kirkpatrick N, et al. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res.* 2008;68:3001–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5664.
133. Li K, Huang S-H, Lao X-M, Le Yang, Liao G-Q, Liang Y-J. Interaction of cancer cell-derived Foxp3 and tumor microenvironment in human tongue squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res.* 2018;370:643–52. doi:10.1016/j.yexcr.2018.07.029.
134. Yamagami W, Susumu N, Tanaka H, Hirasawa A, Banno K, Suzuki N, et al. Immunofluorescence-detected infiltration of CD4+FOXP3+ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21:1628–34. doi:10.1097/IGC.0b013e31822c271f.
135. Iurchenko NP, Glushchenko NM, Buchynska LG. Comprehensive analysis of intratumoral lymphocytes and FOXP3 expression in tumor cells of endometrial cancer. *Exp Oncol.* 2014;36:262–6.
136. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10:942–9. doi:10.1038/nm1093.
137. Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi M-B, Harpole DH, Patz EF. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer.* 2006;107:2866–72. doi:10.1002/cncr.22282.

138. Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology*. 2007;132:2328–39. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.102.
139. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, 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 Res*. 2009;69:2000–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2360.
140. Huang Y, Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, et al. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*. 2015;6:17462–78. doi:10.18632/oncotarget.3958.
141. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2008;93:193–200. doi:10.3324/haematol.11702.
142. Kim WY, Jeon YK, Kim TM, Kim JE, Kim YA, Lee S-H, et al. Increased quantity of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells is an independent predictor for improved clinical outcome in extranodal NK/T-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2009;20:1688–96. doi:10.1093/annonc/mdp056.
143. Guo F, Dong Y, Tan Q, Kong J, Yu B. Tissue Infiltrating Immune Cells as Prognostic Biomarkers in Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *Dis Markers*. 2020;2020:1805764. doi:10.1155/2020/1805764.
144. Jong RA de, Leffers N, Boezen HM, Hoor KA ten, van der Zee AGJ, Hollema H, Nijman HW. Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2009;114:105–10. doi:10.1016/j.ygyno.2009.03.022.
145. Giatromanolaki A, Bates GJ, Koukourakis MI, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL, Banham AH. The presence of tumor-infiltrating FOXP3+ lymphocytes correlates with intratumoral angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110:216–21. doi:10.1016/j.ygyno.2008.04.021.
146. Xi Z, Jing L, Le-Ni K, Zhu L, Ze-Wen D, Hui Y, et al. Evaluation of PTEN and CD4+FOXP3+ T cell expressions as diagnostic and predictive factors in endometrial cancer: A case control study. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98:e16345. doi:10.1097/MD.00000000000016345.
147. Chang W-C, Li C-H, Huang S-C, Chang D-Y, Chou L-Y, Sheu B-C. Clinical significance of regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with human endometrial carcinoma. *Cancer*. 2010;116:5777–88. doi:10.1002/cncr.25371.
148. Zhang W, Hou F, Zhang Y, Tian Y, Jiao J, Ma D, et al. Changes of Th17/Tc17 and Th17/Treg cells in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2014;132:599–605. doi:10.1016/j.ygyno.2013.12.036.
149. TOKUNO K, HAZAMA S, YOSHINO S, YOSHIDA S, OKA M. Increased prevalence of regulatory T-cells in the peripheral blood of patients with gastrointestinal cancer. *Anticancer research*. 2009;29:1527–32.
150. Gantt S, Gervasi A, Jaspan H, Horton H. The role of myeloid-derived suppressor cells in immune ontogeny. *Front Immunol*. 2014;5:387. doi:10.3389/fimmu.2014.00387.
151. Schumacher A, Sharkey DJ, Robertson SA, Zenclussen AC. Immune Cells at the Fetomaternal Interface: How the Microenvironment Modulates Immune Cells To Foster Fetal Development. *J Immunol*. 2018;201:325–34. doi:10.4049/jimmunol.1800058.
152. Zeldovich VB, Bakardjiev AI. Host defense and tolerance: unique challenges in the placenta. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002804. doi:10.1371/journal.ppat.1002804.
153. Dunn CL, Kelly RW, Critchley HOD. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reproductive BioMedicine Online*. 2003;7:151–61. doi:10.1016/S1472-6483(10)61745-2.

154. Piechowski J. Plausibility of trophoblastic-like regulation of cancer tissue. *Cancer Manag Res.* 2019;11:5033–46. doi:10.2147/CMAR.S190932.
155. Polanczyk MJ, Hopke C, Vandenbark AA, Offner H. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res.* 2006;84:370–8. doi:10.1002/jnr.20881.
156. Prieto GA, Rosenstein Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology.* 2006;118:58–65. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02339.x.
157. Tai P, Wang J, Jin H, Song X, Yan J, Kang Y, et al. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J Cell Physiol.* 2008;214:456–64. doi:10.1002/jcp.21221.
158. Daraei N, Ghafourian M, Ghadiri A, Amari A, Najafian M, Rokhafrooz S. Evaluation of Exhausted Regulatory T Cells in Preeclampsia. *Iran J Immunol.* 2019;16:163–9. doi:10.22034/IJI.2019.80259.
159. Hosseini A, Dolati S, Hashemi V, Abdollahpour-Alitappeh M, Yousefi M. Regulatory T and T helper 17 cells: Their roles in preeclampsia. *J Cell Physiol.* 2018;233:6561–73. doi:10.1002/jcp.26604.
160. Figueiredo AS, Schumacher A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology.* 2016;148:13–21. doi:10.1111/imm.12595.
161. Huang N, Chi H, Qiao J. Role of Regulatory T Cells in Regulating Fetal-Maternal Immune Tolerance in Healthy Pregnancies and Reproductive Diseases. *Front. Immunol.* 2020;11:1023. doi:10.3389/fimmu.2020.01023.
162. Teles A, Zenclussen AC, Schumacher A. Regulatory T cells are baby's best friends. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2013;69:331–9. doi:10.1111/aji.12067.
163. Toldi G, Svec P, Vásárhelyi B, Mészáros G, Rigó J, Tulassay T, Treszl A. Decreased number of FoxP3+ regulatory T cells in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87:1229–33. doi:10.1080/00016340802389470.
164. Paeschke S, Chen F, Horn N, Fotopoulou C, Zambon-Bertoja A, Sollwedel A, et al. Pre-eclampsia is not associated with changes in the levels of regulatory T cells in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol.* 2005;54:384–9. doi:10.1111/j.1600-0897.2005.00334.x.
165. Jung YJ, Park Y, Kim H-S, Lee HJ, Kim Y-N, Lee J, et al. Abnormal lymphatic vessel development is associated with decreased decidual regulatory T cells in severe preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2018;80:e12970. doi:10.1111/aji.12970.
166. Quinn KH, Lacoursiere DY, Cui L, Bui J, Parast MM. The unique pathophysiology of early-onset severe preeclampsia: role of decidual T regulatory cells. *J Reprod Immunol.* 2011;91:76–82. doi:10.1016/j.jri.2011.05.006.
167. Darmochwal-Kolarz D, Saito S, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. Apoptosis signaling is altered in CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory lymphocytes in pre-eclampsia. *Int J Mol Sci.* 2012;13:6548–60. doi:10.3390/ijms13066548.
168. Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, et al. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med.* 1997;185:1595–604. doi:10.1084/jem.185.9.1595.
169. Chantry D, Romagnani P, Raport CJ, Wood CL, Epp A, Romagnani S, Gray PW. Macrophage-derived chemokine is localized to thymic medullary epithelial cells and is a chemoattractant for CD3(+), CD4(+), CD8(low) thymocytes. *Blood.* 1999;94:1890–8.
170. Mantovani A, Gray PA, van Damme J, Sozzani S. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol.* 2000;68:400–4.

171. Galli G, Chantry D, Annunziato F, Romagnani P, Cosmi E, Lazzeri E, et al. Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines. *undefined*. 2000.
172. Iellem A, Colantonio L, Bhakta S, Sozzani S, Mantovani A, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Inhibition by IL-12 and IFN- α of I-309 and macrophage-derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur J Immunol*. 2000;30:1030–9. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(200004)30:4<1030::AID-IMMU1030>3.0.CO;2-8.
173. Schaniel C, Pardali E, Sallusto F, Speletas M, Ruedl C, Shimizu T, et al. Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1998;188:451–63. doi:10.1084/jem.188.3.451.
174. Andrew DP, Chang MS, McNinch J, Wathen ST, Rihaneck M, Tseng J, et al. STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol*. 1998;161:5027–38.
175. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2001;194:847–53. doi:10.1084/jem.194.6.847.
176. Imai T, Chantry D, Raport CJ, Wood CL, Nishimura M, Godiska R, et al. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:1764–8. doi:10.1074/jbc.273.3.1764.
177. Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowiec M, Fontenot JD, Rudensky AY, Campbell DJ. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204:1335–47. doi:10.1084/jem.20070081.
178. Yuan Q, Bromley SK, Means TK, Jones KJ, Hayashi F, Bhan AK, Luster AD. CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204:1327–34. doi:10.1084/jem.20062076.
179. Ménétrier-Caux C, Faget J, Biota C, Gobert M, Blay J-Y, Caux C. Innate immune recognition of breast tumor cells mediates CCL22 secretion favoring Treg recruitment within tumor environment. *Oncoimmunology*. 2012;1:759–61. doi:10.4161/onci.19680.
180. Jones RL, Morison NB, Hannan NJ, Critchley HOD, Salamonsen LA. Chemokine expression is dysregulated in the endometrium of women using progestin-only contraceptives and correlates to elevated recruitment of distinct leukocyte populations. *Hum Reprod*. 2005;20:2724–35. doi:10.1093/humrep/dei140.
181. Yao Y, Xu X-H, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front. Immunol*. 2019;10:792. doi:10.3389/fimmu.2019.00792.
182. Freier CP, Kuhn C, Rapp M, Endres S, Mayr D, Friese K, et al. Expression of CCL22 and Infiltration by Regulatory T Cells are Increased in the Decidua of Human Miscarriage Placentas. *Am J Reprod Immunol*. 2015;74:216–27. doi:10.1111/ajr.12399.
183. Ramhorst R, Fraccaroli L, Aldo P, Alvero AB, Cardenas I, Leirós CP, Mor G. Modulation and recruitment of inducible regulatory T cells by first trimester trophoblast cells. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2012;67:17–27. doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01056.x.
184. Leber A, Teles A, Zenclussen AC. Regulatory T cells and their role in pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010;63:445–59. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00821.x.

185. Stefańska K, Zieliński M, Jankowiak M, Zamkowska D, Sakowska J, Adamski P, et al. Cytokine Imprint in Preeclampsia. *Front. Immunol.* 2021;12:667841. doi:10.3389/fimmu.2021.667841.
186. Legge F, Restaino S, Leone L, Carone V, Ronsini C, Di Fiore GLM, et al. Clinical outcome of recurrent endometrial cancer: analysis of post-relapse survival by pattern of recurrence and secondary treatment. *Int J Gynecol Cancer.* 2020;30:193–200. doi:10.1136/ijgc-2019-000822.
187. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2018;68:394–424. doi:10.3322/caac.21492.
188. Cao W, Ma X, Fischer JV, Sun C, Kong B, Zhang Q. Immunotherapy in endometrial cancer: rationale, practice and perspectives. *Biomark Res.* 2021;9:49. doi:10.1186/s40364-021-00301-z.
189. Willvonseder B, Stögbauer F, Steiger K, Jesinghaus M, Kuhn P-H, Brambs C, et al. The immunologic tumor microenvironment in endometrioid endometrial cancer in the morphomolecular context: mutual correlations and prognostic impact depending on molecular alterations. *Cancer Immunol Immunother.* 2021;70:1679–89. doi:10.1007/s00262-020-02813-3.
190. Nola R de, Menga A, Castegna A, Loizzi V, Ranieri G, Cicinelli E, Cormio G. The Crowded Crosstalk between Cancer Cells and Stromal Microenvironment in Gynecological Malignancies: Biological Pathways and Therapeutic Implication. *Int J Mol Sci* 2019. doi:10.3390/ijms20102401.
191. Frydrychowicz M, Boruczkowski M, Kolecka-Bednarczyk A, Dworacki G. The Dual Role of Treg in Cancer. *Scand J Immunol.* 2017;86:436–43. doi:10.1111/sji.12615.
192. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang L-P, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature.* 2011;475:226–30. doi:10.1038/nature10169.
193. Kuehnemuth B, Piseddu I, Wiedemann GM, Lauseker M, Kuhn C, Hofmann S, et al. CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer. *BMC Cancer.* 2018;18:1278. doi:10.1186/s12885-018-5117-8.
194. Maruyama T, Kono K, Izawa S, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Mimura K, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus.* 2010;23:422–9. doi:10.1111/j.1442-2050.2009.01029.x.
195. Nakanishi T, Imaizumi K, Hasegawa Y, Kawabe T, Hashimoto N, Okamoto M, Shimokata K. Expression of macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 in human lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55:1320–9. doi:10.1007/s00262-006-0133-y.
196. Li Y-Q, Liu F-F, Zhang X-M, Guo X-J, Ren M-J, Fu L. Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer. *PLoS One.* 2013;8:e76379. doi:10.1371/journal.pone.0076379.
197. Chen Y-H, Zhou B-Y, Wu X-J, Xu J-F, Zhang J-A, Chen Y-H, Liang S-S. CCL22 and IL-37 inhibit the proliferation and epithelial-mesenchymal transition process of NSCLC A549 cells. *Oncol Rep.* 2016;36:2017–24. doi:10.3892/or.2016.4995.
198. Li X, Liu Z, Zhou W, Liu X, Cao W. Downregulation of CCL22 and mutated NOTCH1 in tongue and mouth floor squamous cell carcinoma results in decreased Th2 cell recruitment and expression, predicting poor clinical outcome. *BMC Cancer.* 2021;21:922. doi:10.1186/s12885-021-08671-1.
199. Vulcano M, Albanesi C, Stoppacciaro A, Bagnati R, D'Amico G, Struyf S, et al. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur J Immunol.* 2001;31:812–22. doi:10.1002/1521-4141(200103)31:3<812::aid-immu812>3.0.co;2-l.

200. Wiedemann GM, Knott MML, Vetter VK, Rapp M, Haubner S, Fessler J, et al. Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells. *Oncoimmunology*. 2016;5:e1175794. doi:10.1080/2162402X.2016.1175794.
201. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, Fujii H. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer*. 2008;122:2286–93. doi:10.1002/ijc.23392.
202. Haubner S. Expression der regulatorische-T-Zell-rekrutierenden Chemokine CCL22 und CCL28 im humanen Mammakarzinom.
203. Tsujikawa T, Yaguchi T, Ohmura G, Ohta S, Kobayashi A, Kawamura N, et al. Autocrine and paracrine loops between cancer cells and macrophages promote lymph node metastasis via CCR4/CCL22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2013;132:2755–66. doi:10.1002/ijc.27966.
204. Korbecki J, Kojder K, Simińska D, Bohatyrewicz R, Gutowska I, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of the Ligands of Receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. *Int J Mol Sci* 2020. doi:10.3390/ijms21218412.
205. Huang Y-H, Chang C-Y, Kuo Y-Z, Fang W-Y, Kao H-Y, Tsai S-T, Wu L-W. Cancer-associated fibroblast-derived interleukin-1 β activates protumor C-C motif chemokine ligand 22 signaling in head and neck cancer. *Cancer Sci*. 2019;110:2783–93. doi:10.1111/cas.14135.

CCL22 as independent prognostic factor in endometrial cancer patients

Mannewitz Mareike, Beyer Susanne, Perleberg Carolin, Hahn Laura, Schmoeckel Elisa, Mahner Sven, Corradini Stefanie, Trillsch Fabian, Kessler Mirjana, Jeschke Udo, Kolben Thomas

Abstract

(1) Background: The chemokine CCL22 is known to recruit immunosuppressive regulatory T-cells (Treg) that contribute to disease progression in several tumor entities by evading the host immune response. Our study aims to determine the expressing cell types and prognostic significance of CCL22 secretion and their link to Treg invasion in endometrial cancer (EC), an immunogenic cancer.

(2) Methods: Specimens of EC from 275 patients and 28 healthy controls were screened immunohistochemically for CCL22. Immunofluorescence double-staining for CCL22 and different immune-cell markers was performed. Further, in vitro regulation of CCL22 expression was investigated for EC cell lines (Ishikawa+, RL95-2) and in human PBMC in coculture settings via qPCR and ELISA.

(3) Results: High CCL22 staining in tumor cells and the presence of protruding CCL22-positive M1 macrophages in tumor distant areas is associated with a significantly increased overall survival (OS). Conversely, a moderate, secretory-appearing staining in the peritumoral and intratumoral stroma was correlated to worse prognosis. Although analysis of the in vitro coculture model of epithelial and immune-cells revealed PBMC as the primary source of CCL22, we could confirm induction of the chemokine also in the EC epithelial cells.

(4) Conclusion: Our study is the first investigation of CCL22 in EC and suggests that CCL22 is associated with OS depending on its location and producing cell type. Additionally, intracellular upregulation and extracellular secretion must be considered separately when investigating CCL22 expressing cell types in EC. These results may provide evidence for CCL22-mediated Treg recruitment in EC as a potential future therapeutic target.

Introduction

With an incidence of over 417.000 cases per year, endometrial cancer (EC) is the sixth most frequent cancer in women worldwide [1]. Although cancer-related death rates are comparatively low due to a usually early diagnosis as a result of abnormal vaginal bleeding, the increasing number of patients in the last several years [2, 3] show the need for further research of treatment options. The importance of reconsidering diagnosis and therapy is also reflected in the new classification for EC initiated by the Cancer Genome Atlas [4] incorporating molecular criteria that slowly replace the classical histopathological classification [5, 6].

Recently, immunotherapeutic approaches, for example the PDL-1-inhibitor Pembrolizumab or the tyrosine kinase inhibitor Dostarlimab, have led to significant expansions of therapeutic options in EC therapy.

EC was found to be closely related to changes in the immune system, regarding humoral factors [7] as well as cellular adaptations [8–10]. However, a more detailed understanding of the tumor microenvironment (TME) is still required to overcome tumor-induced immunosuppression. Immune escape describes a mechanism which is used by tumor cells to evade the eradication by the host immune system. A variety of processes in their immunologic microenvironment are adapted to create an immunosuppressive milieu [11–13].

The CC-motif ligand 22 (CCL22) was originally found to be secreted by macrophages and dendritic cells (DC) [14]. Recently, it has been reported that other immune cells such as monocytes [15, 16], activated NK-cells [13], and T-cells [15] also secrete the chemokine. Additionally, epithelial cells [15, 17], as well as several cancer cells, i.e. breast [18, 19], gastric [20] and ovarian cancer cells [21] are meanwhile known to express CCL22.

CCL22 is a ligand of CCR4 [18, 22], that is preferentially expressed on regulatory T-cells (Treg) and mediates Treg immigration into the tumor tissue [13, 18, 21, 23]. With Treg being associated with suppression of the local immune response [21, 24] this mechanism may lead to reduced antitumor immunity and favoring tumor progression. We recently showed, that a higher infiltration of Treg in EC tissue is associated with a reduced OS [25]. A higher expression of CCL22 has been described to be associated with a negative prognostic outcome in several cancers [26, 27]. Thus, the recruitment of Treg mediated by CCL22 is an important component of tumor immune escape. Targeting this process could help to strengthen or reinstate the host immune response against the tumor [21].

Although the role of CCL22 has already been documented in several tumor types, there are no previous reports about its impact in EC. This study aimed to elucidate the prognostic influence of CCL22 in a large cohort of patients with endometrial adenocarcinoma and evaluating dynamics of CCL22 expression in in vitro cell culture models of EC.

Additionally, the interplay of CCL22 and Treg should be examined connecting these two markers for the first time.

Materials and Methods

Patients and specimens

Tissue samples from 275 patients with endometrial adenocarcinoma were included in this study. All patients had been treated by surgery in the Department of Gynecology and Obstetrics of the Ludwig-Maximilians-University of Munich between 1990 and 2002.

Information about the histological subtype and grade retrieved from the Munich cancer registry were reviewed by the Department of Pathology, Ludwig-Maximilians-University Munich. Clinicopathological data from the Munich cancer registry were complemented by the latest revision of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO) system from 2009.

Additionally, a control group of 28 specimens from surgeries for benign indications (descensus uteri, uterine fibroids) between 2000 and 2002 were enrolled. According to medical records, no evidence for (pre-)malignant or inflammatory processes were found in these samples. Patient age of the cohort is similar to that of the experimental group.

The study was approved by the local ethics committee of the Ludwig-Maximilians-University of Munich (reference number 19-249 including amendment) and all patients' data were anonymized and patients have given written, informed consent before surgery. The ethical principles adopted in the Declaration of Helsinki 1975 have been respected.

Immunohistochemical staining with CCL22

Paraffin-embedded TMA of endometrial cancer patients and tissue sections of the control group were incubated with the polyclonal rabbit anti-human MDC (CCL22) antibody (500-P107 1:300, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) using ZytoChem Plus HRP Polymer System mouse/rabbit (Zytomed, Berlin, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. 3,3-diaminobenzidine (DAKO DAB+; Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) served as chromogen and slides were counterstained with Meyer's hemalum. Positive and negative controls were carried out with human placenta sections (**Supplement 1**). Staining was evaluated by the semiquantitative immunoreactive score (IRS Score) [28] based on the percentage and staining intensity of positive cells using a light microscope (lens 10x and 20x, Leitz Diaplan light microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)). A score of 0-12 was determined for every TMA spot and representative fields of view in case of control group, resulting in three values per patient. The mean was calculated for further evaluation.

Uterine tissue was divided into the following areas according to histomorphological aspects: endometrial epithelium and areas with stroma respectively myometrium, depending on the extent of tumor myometrial invasion. Separate scores were collected for epithelial cells of the endometrium and surrounding stroma and myometrium. In addition, the occurrence of conspicuously strong positive

isolated cells was noted separately. In case of no epithelial cells on all three TMA spots, the patients were excluded from evaluation of endometrial cancer cells.

Doubleimmunofluorescence

Primary antibodies, listed in **Supplement 2**, were applied on 27 representative EC specimens for each marker combination (CCL22 with either CD68, CD163, CD80 or DEC205) after blocking with Ultra-Vision-Proteinblock (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Goat-anti-mouse-Alexa-Fluor488- and Goat-anti-rabbit-Cy-3-conjugated antibodies (both Dianova, Hamburg, Germany) were used as secondary antibodies. Subsequently the samples were fixed with Vectashield® H1200 mounting medium with DAPI (VectorLab, Burlingame, CA, USA). Axiophot fluorescent photomicroscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and AxioVision software were used for evaluation. Single positive and double positive cells were counted in three representative fields of view (20x magnification) in each section. For CD80-CCL22 staining, a serum blocking before applying the primary antibodies was used since the antibodies shared the same host species origin.

Cell lines and isolation of primary PBMC

The human cell lines RL95-2 and HEK293 were obtained from *The American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA). Ishikawa+ER were provided by the *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Porton Down, Salisbury, UK). The cells were maintained in RPMI- 1640 medium + GlutaMAX (Gibco Life technologies, Carlsbad, CA, USA) and 10% fetal calf serum (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂.

Human PBMC were purified from healthy blood donors by density gradient centrifugation at with Biocoll Separating Solution (Biochrom, Darmstadt, Germany) and subsequent erythrolysis.

Coculture of tumor cells and immune cells

The coculture experiments were performed using transwell inserts to separate the different cell fractions. The benign HEK293 cell line was chosen as control. To establish coculture for an ELISA of supernatants (SN) and qPCR, 2x10⁵ tumor cells (Ishikawa+, RL95-2) or HEK293-cells per well were transferred into a 24-well plate. 2x10⁶ PBMC were added in a 0.4-µm-pore Costar Transwell insert (Corning Incorporated, Kennebunk, ME, USA) at 37°C for 48h. To detect CCL22-levels in the coculture-SN, PBMC were also transferred directly to the tumor cells without a physical separation.

For performing ELISA of intracellular CCL22, coculture was carried out in 6-well plates with 1x10⁶ tumor cells and 1x10⁷ PBMC under otherwise identical conditions.

To characterize the cell subset responsible for CCL22 secretion, cell-free SN of PBMC and tumor cells, respectively HEK293-cells, were generated. Therefore, PBMC and tumor cells were cultured as described above and SN were harvested after 48 hours.

Tumor cells or PBMC cultured alone were chosen as control group in each experiment. To ensure an equal cell viability in every coculture setting, a MTT assay with the suspended PBMC was performed after

coculture, indicating that a lack of viability does not bias the experiments (**Supplement 3**). Tumor cells after coculture showed equivalent adherence and density in the well plates as the untreated tumor cells suggesting a comparable viability.

ELISA of supernatants

To detect the secretion of CCL22, collected SN were quantified by Human CCL22/MDC DuoSet ELISA purchased from R&D systems following the protocols supplied by the manufacturer. Absorbance was measured at 450nm and was corrected on a microplate reader. The standard curve was created using a four-parameter logistic regression (4PL). The final cytokine concentration was specified as picogram cytokine per gram protein in the SN. The assay range of the ELISA was 7.8 – 500 pg/ml. Every experiment was carried out in technical triplicate and repeated three times with PBMC from different blood donors.

RNA Isolation and RT-qPCR

After culture for 48h, the cells were washed with PBS and the total RNA was extracted from the cultured cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). The RNA concentrations of the cell lines were measured photometrically. 0.3-0.5µg of RNA was transcribed to cDNA using the MMLV Reverse Transcriptase 1-st-Strand cDNA Synthesis kit (Lucigen, Middleton, WI, USA). cDNA copies were quantified by TaqMan-PCR with Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and TaqMan Fast Universal PCR Master Mix. TaqMan Gene Expression Assay (all from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used for priming.

Relative expression of CCL22 was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula using β -actin and GAPDH as housekeeping genes.

ELISA of RIPA-Lysates

To detect intracellular levels of CCL22 an ELISA for RIPA-lysates was established. After 48h of coculture, cells were lysed in RIPA-Buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA) with 0.2% protease inhibitor (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 1% sodiumvanadate 100mM on ice for 30min. After centrifugation at 13000 rpm for 5min, protein concentrations were determined with a Bradford assay. RIPA lysates were diluted 1:10 before applying to ELISA plate. Besides that, Human CCL22/MDC DuoSet ELISA was carried out as described above. A spike/recovery and linearity assay was performed initially to validate the purchased ELISA set from R&D systems for probes with 10% RIPA-solution. The recovery and linearity were in the required range of 80-120%. The total protein concentration measured in the Bradford assay was used as a factor for calculating the CCL22 concentration measured by ELISA to compensate for random differences in cell number and thus total protein levels.

Statistics

Statistical analysis and data processing were performed using Excel 2016 (Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA) and SPSS 26.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Survival analysis was performed using Kaplan-Meier method with log-rank test. The Kaplan-Meier analysis was applied to plot the survival curve. Log rank test was used to compare patient survival between subgroups. Cox regression analysis was used for multivariate analysis. Spearman's correlation coefficient ρ was used for bivariate associations.

Differences between groups were compared using Kruskal-Wallis-test/Mann-Whitney-U-test (2-sided asymptotic significance). In case of multiple testing, Bonferroni-Correction was performed by multiplying the observed p-value with the number of comparisons made. Data are presented as mean \pm SEM (Standard error of mean) or boxplot. $p \leq 0.05$ was considered as a statistically significant difference. Levels of statistical significances are indicated by asterisks as follows: *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$

Results

Patient characteristics

The clinicopathological characteristics of the 275 analyzed EC patients were previously described (**Supplement 4**) [25]. Due to the fact, that some patients' TMA tissue had not sufficient glandular cells in all three spots, they were excluded for evaluation of CCL22 in endometrial tumor cells. This resulted in a reduced cohort of 225 patients for statistical analysis of tumor cell related expressions. Distribution of parameters remained closely similar to the original cohort (**Table 1**). For the distribution of clinicopathological variables see Table 1. Considering the high age at diagnosis of the collective (mean 65.02 years), which is characteristic of endometrial cancer, the maximum follow-up was limited to 200 months. After this time, death unrelated to the disease is considered likely.

Characteristics	Patient no. (n=225)	%
Age at diagnosis (years)		
<65	109	48.4
>65	116	51.6
Tumorsize pT		
pT1	175	77.8
pT2	16	7.1
pT3	30	13.3
pT4	3	1.3
Not available	1	0.4
FIGO		
I	167	74.2
II	15	6.7
III	36	16.0
IV	6	2.7
Not available	1	0.4
Grade		
G1	128	56.9
G2	77	34.2
G3	20	8.9
Not available	0	0
Nodal status		
pN0	142	63.1
pN1	21	9.3
pNX	62	27.6
Metastases		
pM0	109	48.4
pM1	5	2.2
pMX	111	49.4
Survival		
Alive	119	52.9
Died	106	47.1
Not available	0	0
Progression		
None	180	80.0
At least one	45	20.0
Not available	0	0

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study population with n=225

Tumor cells and environmental cells express CCL22

Immunohistochemical staining of CCL22 revealed three different areas of expression: 1) the epithelial, endometrial tumor cells showed uniform levels of CCL22 (**Fig. 1A**); 2) intratumoral, stromal or myometrial areas (S/M) (dependent on grade of myometrial invasion) or areas close to the tumor were CCL22 positive without association to specific cells (**Fig. 1B**). Staining in these areas appeared uniformly pronounced, intracellular as well as extracellular; 3) single isolated protruding positive cells could be identified in tumor distant myometrial areas in some cases (**Fig. 1C**). CCL22 expression in cancer cells was significantly higher than in S/M ($***p<0.001$, **Fig. 1E**) and a strong linear correlation was identified ($\rho = 0.675$, $***p<0.001$, **Fig.1D**).

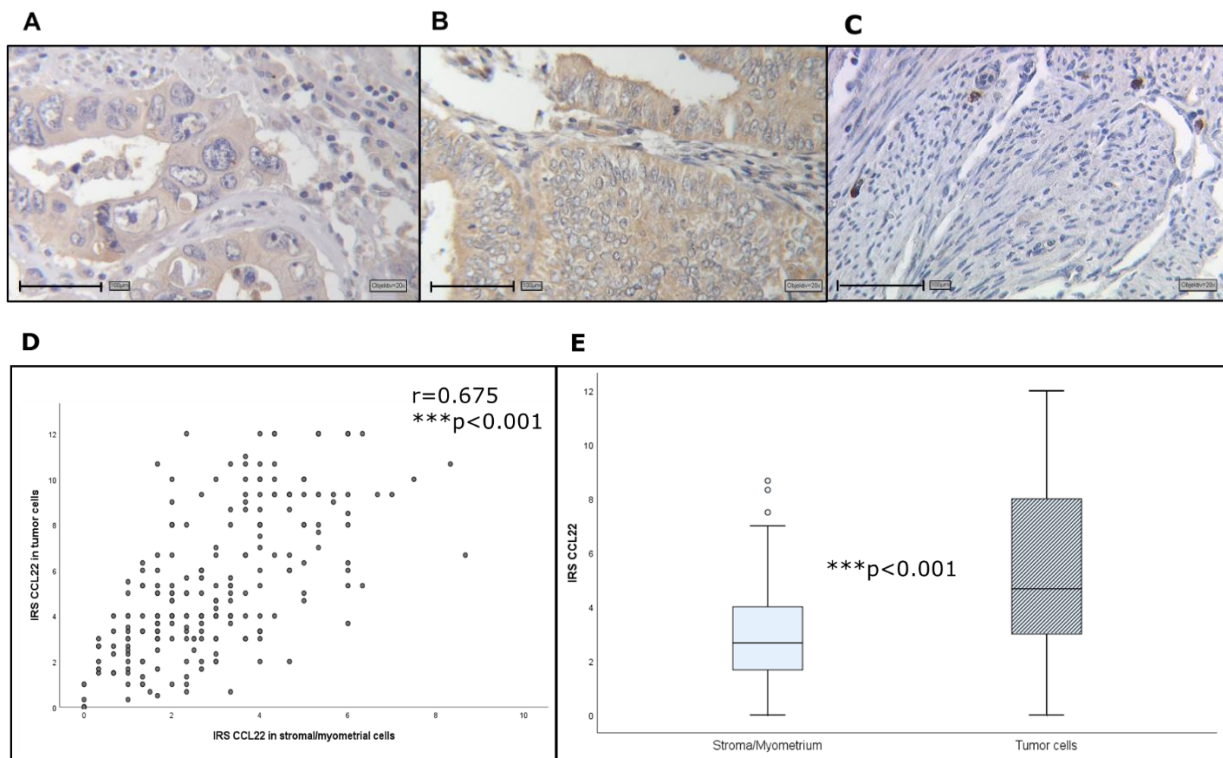


Figure 1. Representative images of CCL22 in endometrial cancer specimen. Expression was assessed semiquantitatively by the IRS:

- (A) intermediate expression in glandular cells (IRS 2.67), S/M (IRS 0.67),
- (B) High expression in glandular cells (IRS 12.00), S/M (IRS 5.33),
- (C) Strongly positive cells in tumor distant S/M
- (D) A significant, linear correlation between CCL22 in epithelial and stromal cells was revealed.
- (E) CCL22 levels in tumor cells were higher than in S/M in general.

Objective 20x, Scale bar 100 μ m

Healthy control group tissue showed significantly different CCL22 expression compared with tumor tissue

Healthy endometrium tissue of the control group revealed also, that CCL22 expression is not restricted to a single cell type, but rather in the different tissue compartments (Fig. 2A-C). Analogous to tumor tissue, CCL22 expression in glandular cells was significantly higher than in surrounding stroma areas (Fig. 2D, $p < 0.001$). Comparison of cancer and healthy tissue revealed a higher glandular epithelial expression in the control group (Fig. 2E, $p = 0.01$) and a trend to a lower expression in the stroma (Fig. 2F, $p = 0.09$).

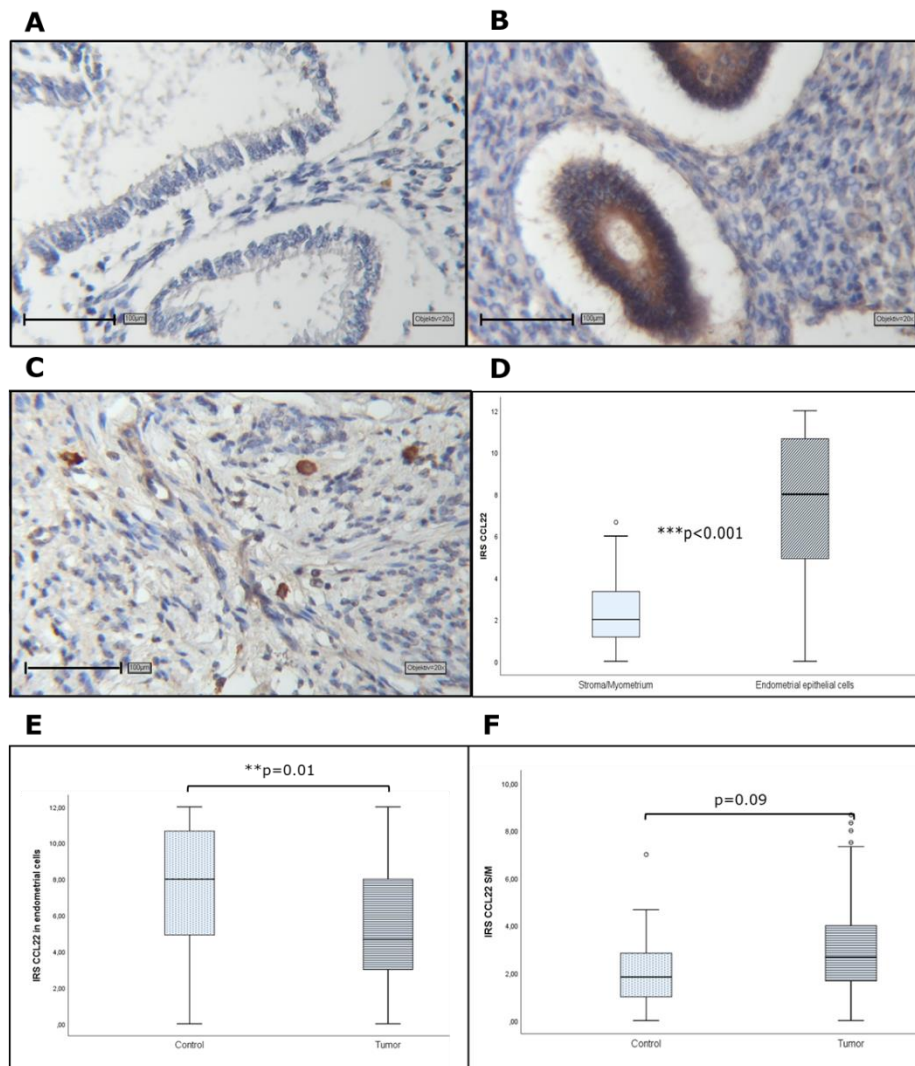


Figure 2. Representative images of CCL22 expression in endometrial control specimen with

- (A) Negative staining in stroma and epithelial cells, IRS 0
- (B) Strong staining in epithelial cells, IRS 12
- (C) Strongly positive cells in myometrium
- (D) Significantly elevated CCL22 expression in glandular cells compared to stroma cells of healthy endometrium tissue
- (E) Significantly lower CCL22 IRS in tumor cells compared to epithelial cells from benign endometrium
- (F) Concerning CCL22 in S/M a trend to a higher, level was found in the specimens of EC patients.

Objective 20x, Scale bar 100µm

High CCL22 expression in endometrial stroma and myometrium is associated with poorer survival

The IRS evaluation of stromal/myometrial areas resulted in a mean value of 2.99 ± 0.11 (range = 0.00-8.67). In order to investigate the potential relevance of increased CCL22 expression in these tissue regions

for the prognosis of EC, we examined its association with several clinicopathological features available at the time of the surgery. The results are presented in **Table 2**.

Advanced disease stages are found to be associated with increasing levels of CCL22 expression (mean \pm SEM): G1 (2.75 ± 0.13) and G2 (3.02 ± 0.19) compared to G3 (4.35 ± 0.42). A significant difference between these three groups (** $p=0.001$) and a significant difference between G1 versus combined G2 and G3 ($*p=0.022$) as well as between G2 and G3 (** $p=0.002$), was found (**Figure 3A, Table 2**). Consequently, Spearman correlation analyses revealed a significantly positive association between the different levels of grade ($\rho = 0.175$, ** $p=0.004$).

In addition, regarding metastatic status, a significant correlation ($\rho = -0.175$, $*p=0.036$) was identified. The negative sign, indicates a protective role of CCL22 upregulation in metastatic disease stage, but the data can only be evaluated to a limited extent, since only few patients had a positive M- status (**Supplement 5**).

	median IRS CCL22 Stroma/Myometrium	p-value (Kruskal-Wallis- Test)
Tumorsize pT pT1 pT2 pT3 pT4	2.67 3.14 3.67 2.33	0.308
Figo staging I II III IV	2.67 2.83 3.33 1.83	0.276
Grading G1 G2 G3	2.67 2.67 4.5	0.001***
Nodal status pN0 pN1	2.67 2.00	0.405
Metastases pM0 pM1	2.67 1.33	0.037*
Age at diagnosis <65 >65	2.83 2.67	0.631

Table 2. Comparison with clinicopathologic parameters showed a significant association of CCL22 in S/M with Grading and M-status.

The rounded median IRS (2.7) was chosen as cut-off to generate equally distributed patient groups for survival analysis. High expression of CCL22 in stroma/myometrial areas was found to be an unfavorable prognostic factor concerning overall survival (OS; ** $p=0.006$, HR=1.643, CI95% 1.147-2.353 in univariate

regression; **Fig. 3B**), but not progression-free survival (PFS; $p=0.169$, **Fig. 3C**). Analysis of the estimated 5-year probabilities led to $70.4\% \pm 4\%$ (mean \pm SEM) for OS of high-grouped and $86.0\% \pm 3\%$ for low-grouped patients. According to the latest data, the American cancer society assumes a 5-year overall survival of 81% for endometrial carcinoma patients [29].

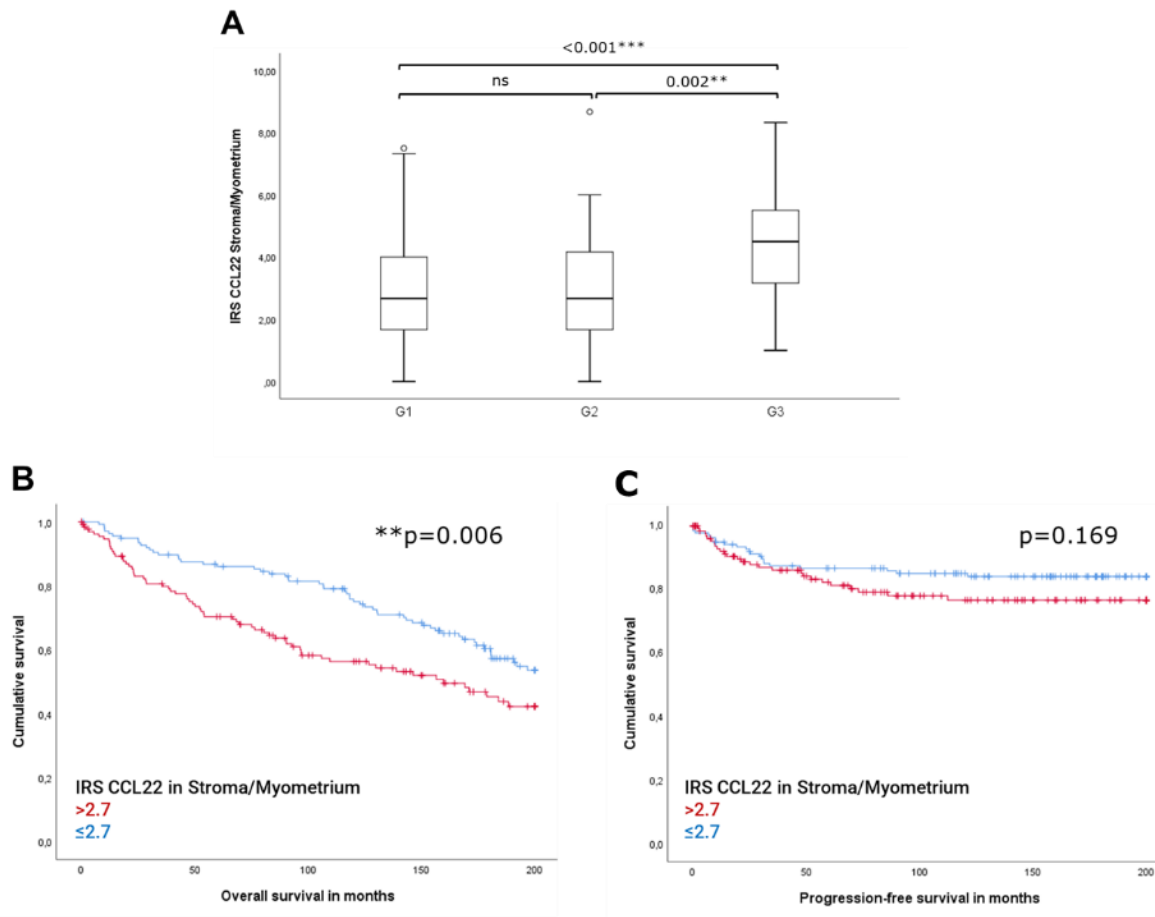


Figure 3. Associations of FoxP3 expression with grade and OS were found.

(A) High CCL22 expression in S/M in individuals with EC is associated to poorer overall survival. ($p=0.006$)

(B) No difference in progression-free survival was found.

Based on the median IRS, that was chosen as cut-off, patients were divided in high-risk (>2.7) and low-risk groups (≤ 2.7). Results of the log-rank test are shown.

(C) CCL22 expression in S/M increases with higher grade in EC. A significant difference was found between G1 and G3, as well as G2 and G3. Mann-Whitney-U-Test. Boxplot: IRS of CCL22; ns: not significant.

Identified as a statistically significant predictor in univariate analysis, CCL22 in S/M was selected to enter into the Cox-model for multivariate survival analyses. The results revealed CCL22 as an independent predictor of OS ($*p=0.020$, **Supplement 6**) even after controlling for age, therapy and pT/FIGO status. However, when adjusting additionally for grade, CCL22 failed to represent as an independent prognostic factor (**Table 3**). Due to the high concordance, FIGO and pT staging systems were included separately in the regression model. Results confirm comparable HR for OS in both cases.

Covariate	p	Hazard Ratio (95%CI)
CCL22 Stroma/Myometrium IRS high vs. low	0.098	1.375 (0.943-2.004)
Age at diagnosis	<0.001***	1.082 (1.060-1.105)
Therapy surgery vs. other	0.757	1.065 (0.716-1.584)
pT (Reference pT1)	<0.001***	
1 vs. 2	0.229	1.514 (0.771-2.973)
1 vs. 3/4	<0.001***	3.185 (1.949-5.206)
grade (Reference G1)	0.003**	
G1 vs. G2	0.370	1.215 (0.794-1.857)
G1 vs. G3	<0.001***	2.711 (1.519-4.836)

Table 3. Multivariate Cox-Regression confirmed independency of CCL22 expression in S/M as prognostic factor for OS. when adjusting for age, therapy and pT/FIGO, but not with grade. Cox-Regression with stepwise inclusion of cofactors is presented in Supplement 6.

High intracellular CCL22 expression in glandular endometrial cancer cells and distant myometrial M1 macrophages is associated to better overall survival

CCL22 expression was detected in almost all of the examined samples (97%) of EC cells. Median IRS of CCL22 in cancer cells was 5.3 ± 0.21 (range 0.00-12.00) No significant correlation was found between the expression level of CCL22 in cancer cells and the clinical parameters considered. Survival analysis revealed a significantly better OS (* $p=0.026$, Fig. 4A) for patients with high CCL22 expression in cancer cells (IRS>5). Univariate analysis revealed a HR of 0.640 (CI95% 0.431-0.954). Subsequent multivariate analysis was performed: CCL22 in cancer cells is an independent prognostic factor for a prolonged OS (Table 4, Supplement 7). Again, there was no difference concerning PFS (Fig. 4B).

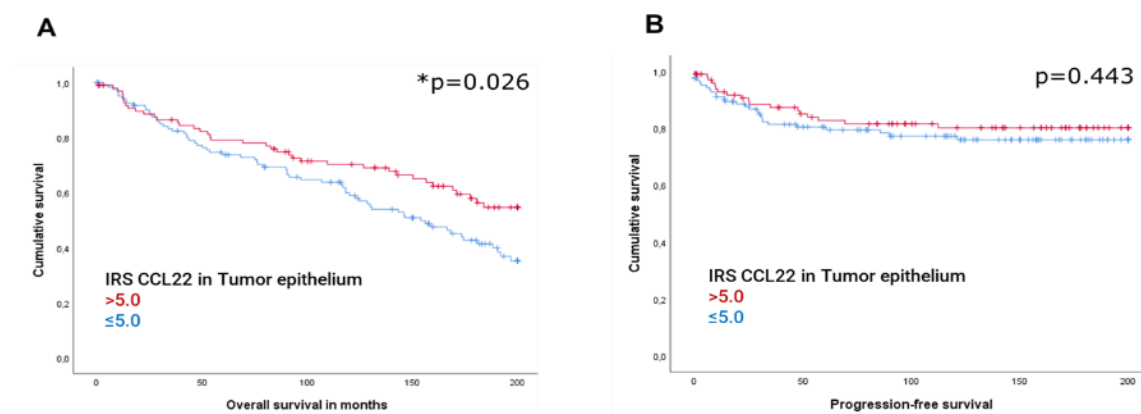


Figure 4. High CCL22 expression in tumor epithelium is associated with good prognosis in EC.

(A) Kaplan-Meier Curve showed a significantly prolonged overall survival for high-grouped patients ($p=0.026$).

(B) No difference in progression-free survival was found.

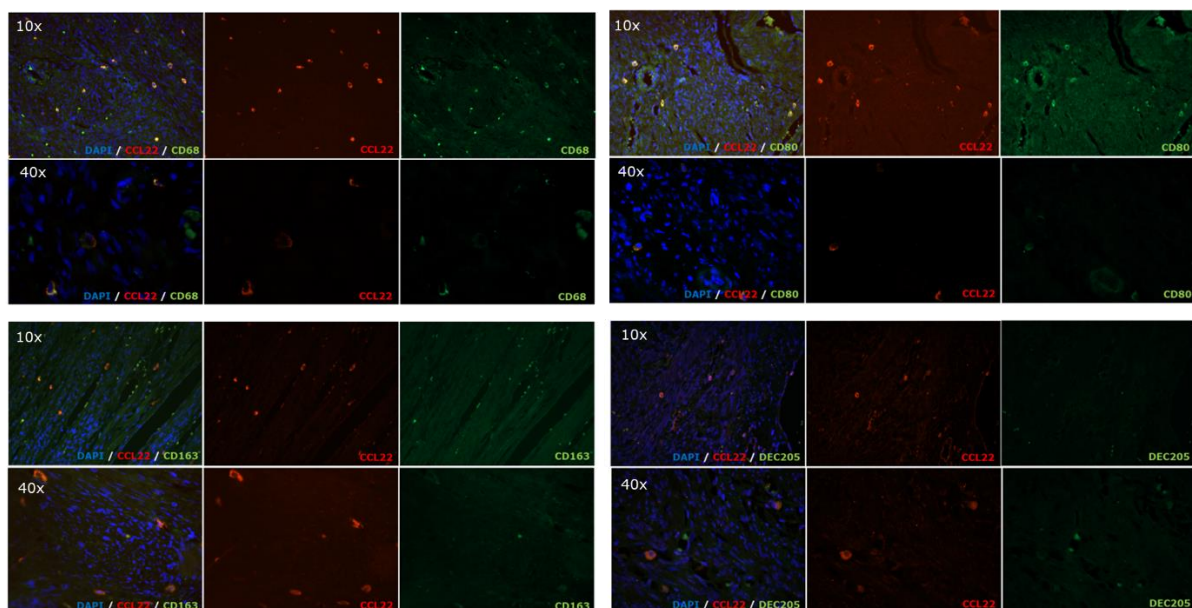
The median IRS was chosen as cut-off, that defined high-risk (>5.0) and low-risk groups (≤ 5.0). Results of the log-rank test are shown.

Covariate	p	Hazard Ratio (95%CI)
CCL22 Tumor IRS high vs. low	0.001**	0.503 (0.331-0.765)
Age at diagnosis	<0.001***	1.036 (1.058-1.109)
Therapy surgery vs. other	0.868	1.036 (0.683-1.572)
pT (Reference pT1)	<0.001***	
1 vs. 2	0.121	1.758 (0.862-3.586)
1 vs. 3/4	<0.001***	3.509 (2.113-5.827)
grade (Reference G1)	<0.001**	
G1 vs. G2	0.686	1.102 (0.707-1.718)
G1 vs. G3	<0.001***	3.475 (1.882-5.064)

Table 4. Multivariate analysis confirmed independency of intratumoral CCL22 expression as positive prognostic factor for OS. Cox-Regression with stepwise inclusion of cofactors is presented in Supplement 7.

Since isolated strongly CCL22 positive (CCL22+) cells were found only in distant myometrial areas (Fig. 1C), they were further characterized by doubleimmunofluorescence using several immune cell markers (Fig. 5A). Indeed, we found that vast majority are positive for the pan-macrophage marker CD68 (83.6% ± 3.4% SD 19.8%) and for the M1 macrophage marker CD80 (89.5% ± 2.6%, SD 14.1%). Dendritic cells could be confirmed by co-expression of DEC205 in 13.0% ± 3.3% (SD 18.6%) and M2 macrophages by coexpression of CD163 in 19.6% ± 3.3% (SD 17.7%). In conclusion the distant, strongly CCL22+ cells can be identified as mostly CD68+CD80+ M1 macrophages. Less than 20% are CD163+ M2 macrophages or DEC+ dendritic cells (Fig. 5B). However, these sparse cell types are also CCL22+ in over 60% (Supplement 8). Regarding the overall proportion of stained cells in total, over 80% of all stained cells were positive for CCL22, CD68, or CD80, respectively. Less than 40% were positive for CD163 and DEC205, respectively (Fig. 5C).

A



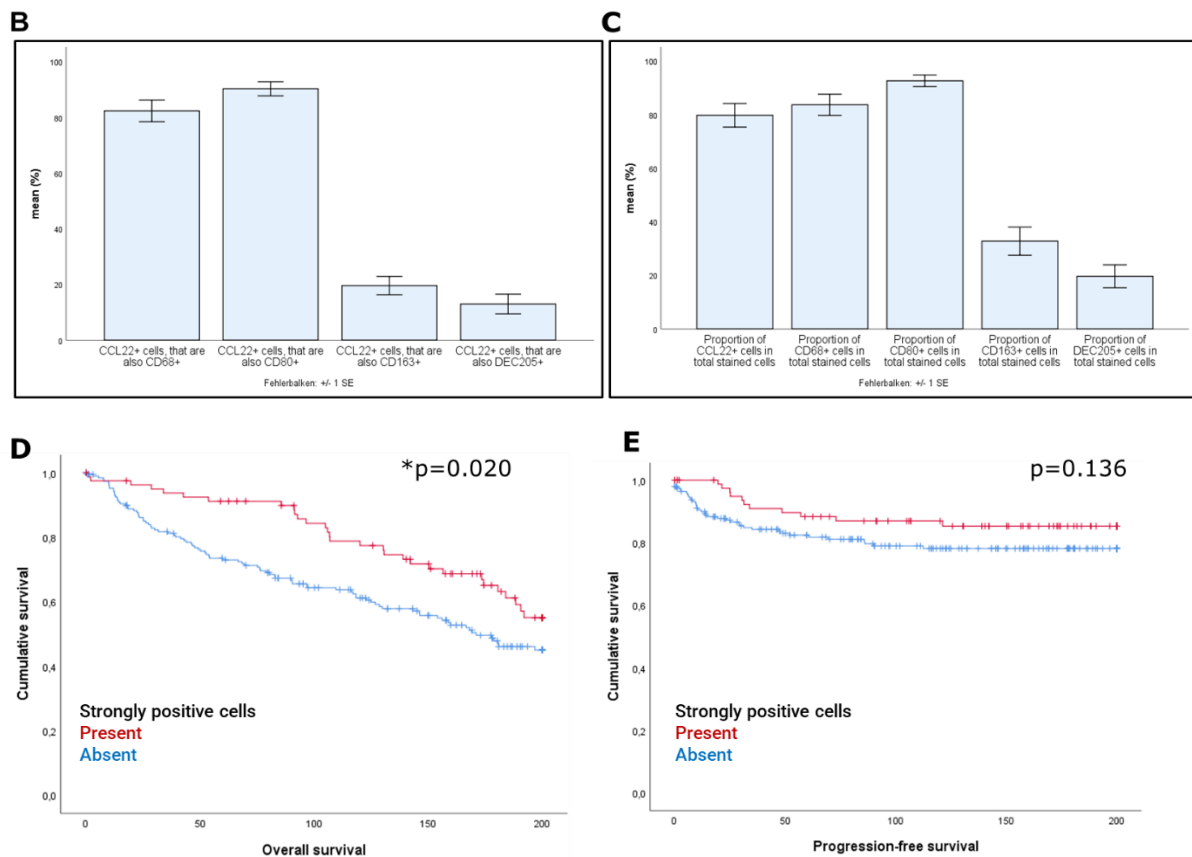


Figure 5. Analysis by doubleimmunofluorescence of protruding CCL22+ cells: M1-macrophages and a subordinate amount of DC and M2 produce CCL22 in distant myometrial tissue areas.

(A) Representative EC tissues were stained for CCL22 (red) and CD68, CD80, CD163 and DEC205 (green)

(B) Proportion of CCL22+ cells, that expressed also one of those immune cells markers is presented

(C) Additionally, the proportion of total expression of all five markers show a dominant occurrence of CD68+ and CD80+ cells regarding the immune cells markers.

Presence of protruding CCL22+ M1macrophages is associated with prolonged OS in EC:

(D) Kaplan-Meier Curve for patients grouped according to cell-presence or -absence (* $p=0.020$)

(E) No difference in progression-free survival was found.

The presence of those CCL22+ cells was significantly associated with a better overall survival (* $p=0.020$, Fig. 5D). Differences in progression-free survival did not reach statistical significance. An univariate Cox-regression confirmed by the log rank test (HR 1.626, CI95% 1.076-2.459, Supplement 9) and adjusting for age, therapy, FIGO/pT and grade revealed its independence as prognostic marker (** $p=0.006$, HR1.810, CI95% 1.182-2.769, Table 5).

Covariate	p	Hazard Ratio (95%CI)
CCL22 strongly positive present vs. absent	0.004**	1.894 (1.233-2.910)
Age at diagnosis	<0.001***	1.088 (1.065-1.111)
Therapy surgery vs. other	0.626	1.102 (0.746-1.627)
pT (Reference pT1) 1 vs. 2	<0.001*** 0.242	1.492 (0.764-2.914)

1 vs. ¼	<0.001***	3.463 (2.142-5.598)
grade (Reference G1)	0.002**	
G1 vs. G2	0.245	1.281 (0.844-1.945)
G1 vs. G3	<0.001***	2.730 (1.555-4.792)

Table 5. Multivariate Cox-regression revealed the presence of strongly CCL22+ cells as an independent predictor for increased OS. Cox-Regression with stepwise inclusion of cofactors is presented in Supplement 9.

Taken together, we found CCL22 to be expressed by tumor cells, distant myometrial M1 macrophages and in areas of the stroma located closely to the tumor. The latter expression appeared intracellular as well as intercellular on a uniform level. The impact on patients' outcome depends on the localization of CCL22+ cells.

Correlation between areas of different CCL22 expression and FoxP3

With CCL22 being the best known chemoattractant for FoxP3+ Treg, a correlation analysis was performed with FoxP3 staining in the same panel. The Treg marker FoxP3 was previously investigated in the same panel and an increased infiltration of Treg was associated with a significantly reduced OS [25]. A statistically significant positive correlation was revealed between FoxP3 and CCL22 in S/M ($\rho = 0.210$, $***p < 0.001$, **Fig. 6A**), but not between FoxP3 and CCL22 expressed by tumor cells ($\rho = 0.081$, $p = 0.220$, **Fig. 6B**). An impact of CCL22 in tumor cells was excluded. Additionally, an association between elevated numbers of FoxP3 positive cells and the absence of distant CCL22+ cells was also found (MWU, $**p = 0.008$, **Fig. 6C**).

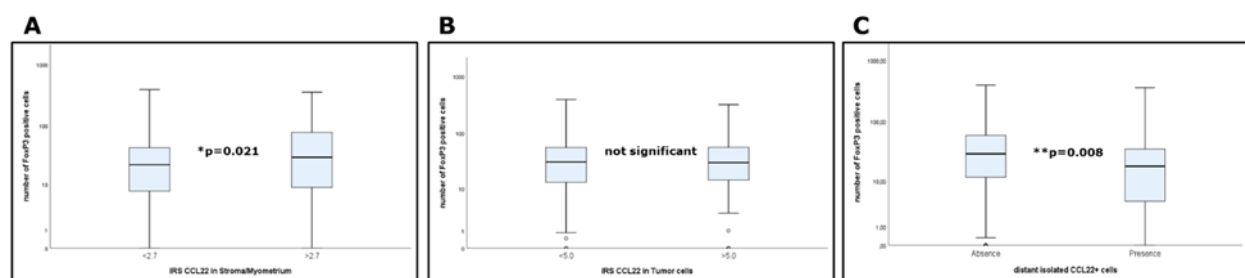


Figure 6. Correlation analysis of FoxP3 and CCL22 revealed an impact of CCL22 in S/M and distant strongly positive cells regarding Treg-invasion. In contrast to CCL22 in tumor cells (B), associations between number of FoxP3+ cells and CCL22 in S/M (A) and the presence of distant CCL22+ cells (C) reached statistical significance. Objective 20x, Scale bar 100µm

Abundant production of CCL22 is hallmark of non-stimulated PBMCs, while only basal level is detected in endometrial cancer cell lines

Consistent with the existing literature [13, 30, 31] we detected large amounts of CCL22 by specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the SN of freshly isolated PBMC from blood of healthy humans.

In contrast to PBMC, spontaneous CCL22 secretion by the endometrial cancer cell lines Ishikawa+ and RL95-2 and the benign control cell line HEK293 was low to undetectable, indicating that the tumor cells themselves do not secrete the chemokine in a high amount to the SN on a basal level (**Fig. 7A**)

Marginal changes of CCL22 secretion in SN after coculture

To investigate potential effects of interaction of epithelial cells with immune cells on the CCL22 regulation, coculture experiments were performed in insert coculture with a physical separation by a membrane with a pore size of 0.4µm, that allows medium exchange.

The addition of PBMCs to the benign control cell line HEK293, that served as negative control, resulted in a marginal reduced CCL22- concentration in SN after coculture compared to PBMC alone (Mann-Whitney-U test $p=0.546$).

CCL22 levels in SN of PBMC cocultured with EC cell lines increased statistically significant.

To exclude a further late upregulation of CCL22 secretion, the same experiment was performed for 72h and 96h. Levels of CCL22 in SN of the cocultures decreased below the level of control PBMC after 72h and even further after 96h. This revealed 48h as the best period of time to investigate CCL22 induction (**Supplement 10**).

PBMC responsible for CCL22 secretion in coculture-SN

To confirm the hypothesis, that PBMC are the main source of CCL22 secretion in coculture-SN, each cell fraction was incubated in cell-free SN of the other cell fraction.

While tumor-SN are devoid of CCL22 secretion, addition of PBMC to these SN led to a significant induction of CCL22-production (**Fig. 7C**), thus suggesting PBMC being the main source of CCL22. To exclude that, inversely, CCL22 is induced in tumor cells through SN of PBMC, we incubated EC cell lines in PBMC culture SN. No upregulation of CCL22 in tumor cells was observed. Culture of tumor cells in cell-free SN of PBMC resulted in a reduced CCL22 level. (**Fig. 7D**), suggesting either a consumption or uptake of CCL22 by tumor cells or an enhanced degradation of protein in the presence of tumor cells. We thus concluded that CCL22 production is restricted to the PBMC fraction, demonstrating that these cells represent the main source of secreted CCL22 in EC.

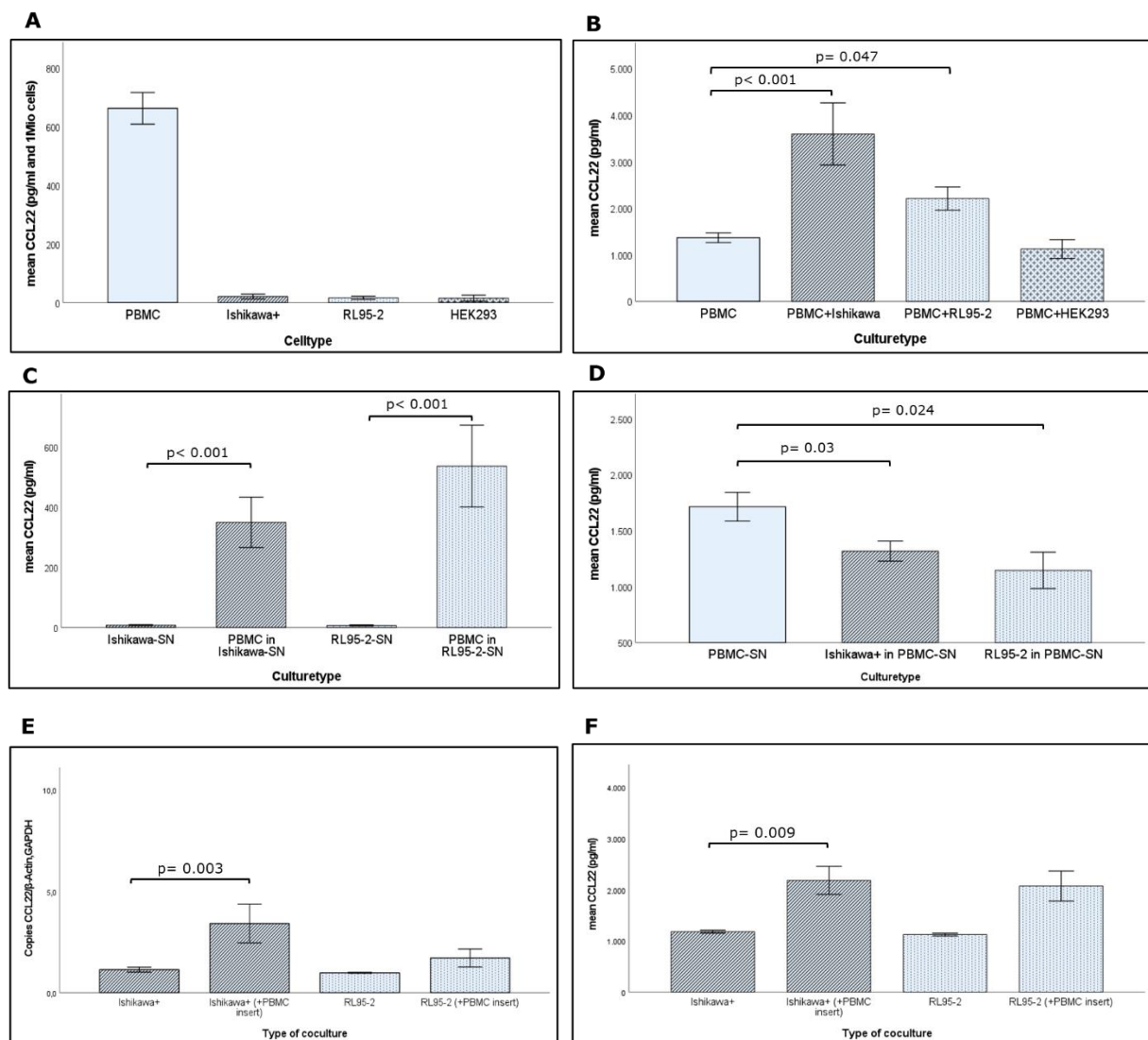


Figure 7. Coculture experiments for CCL22 analysis. High CCL22 secretion by freshly isolated PBMC in contrast to EC cell lines without any stimulation (A). HEK293 served as control cell line. Results of coculture experiments revealed significantly increased CCL22 in SN after coculture of PBMC and EC cell lines. Kruskal-Wallis test determined for coculture conditions with RL95-2 $p=0.047$, and for Ishikawa+ $p<0.001$. PBMC were identified as major CCL22-secreting cell fraction, as addition of tumor-SN to PBMC led to a significant increase of CCL22-levels (C), while incubation of tumor cells with PBMC-SN resulted in a decrease of CCL22 levels (D). mRNA levels of tumor cells after coculture revealed a significant increase in CCL22 of Ishikawa+ with PBMC (E). Results of intracellular CCL22 by ELISA analysis confirmed qPCR data: CCL22 levels of tumor RIPA lysates also revealed a significant increase after coculture (F). All experiments are performed in biological and technical triplicates with the two housekeeping genes GAPDH and β -Actin.

Coculture leads to significant increased mRNA- and intracellular protein expression in Ishikawa+ cells

To elucidate the CCL22 expression on mRNA level, we performed a quantitative RT-PCR of tumor cells after coculture. Because no sufficient separation of PBMC and tumor cells could be guaranteed in direct coculture in this experimental setting, we continued with investigating conditions in insert coculture.

When EC cells were stimulated with PBMCs in advance, CCL22-mRNA-production was remarkably enhanced in both EC cell lines, but reached statistical significances only for the Ishikawa+ cell line (Fig.

7E). To confirm our data from qPCR on protein level, we performed an ELISA analysis of RIPA-lysates after 48h of coculture. Results of lysated tumor cells showed an identical significant increase of CCL22 levels expressed by Ishikawa+ cells, while the CCL22 level in the RL95-2 coculture resulted in increased CCL22 levels, but without statistical significance (**Fig. 7F**).

Discussion

Tumor cells form various mechanisms to escape from the host immune system by creating an immunosuppressive microenvironment [32–34]. The chemokine CCL22 contributes to the recruitment of Treg and is therefore associated with poor prognosis in several types of cancer [20, 21, 33, 35, 36]. Treg suppress antitumor T cell immunity and contribute to tumor growth [37]. Therefore, preventing Treg accumulation at the tumor site by understanding the mechanism of Treg migration is required to overcome immune evasion.

In the present study, we were able to detect CCL22 expression by EC tumor cells as well as in the surrounding TME and found correlations especially for survival prognosis: While high CCL22 expression in S/M areas close to the tumor is associated with a poorer OS, the presence of CCL22+ M1 macrophages in distant myometrium and the CCL22 expression by tumor cells is linked to a better OS. Generally, the level of expression was higher in tumor cells than surrounding stroma cells.

The findings from the control group with healthy endometrium are in accordance with these results. Again, CCL22 levels in glandular cells were significantly higher than in S/M and correlated linearly. Further, comparing the control cohort and EC patients, it was found, that the level in glandular cells was higher in the control group than in EC cells and correspondingly in stroma, the level was higher in the cancer specimens. Consequently, this is in line in regard to the association with the survival explained above.

There are no publications on CCL22 in EC to date, only a few on endometriosis [38] and healthy endometrium [39], which describe an increased CCL22 level in combination with progesterone treatment. Again, an expression in both, stromal and glandular cells is mentioned. Although CCL22 was originally described in immune cells only [14, 15, 40], there is increasing evidence for its specific expression in epithelial cells in benign as well as malignant conditions. [17]. This suggests a CCL22 involvement in normal physiology in the balance of local inflammation and also immune control via suppression. The endometrium plays a special role in this context: in pregnancy it has to allow implantation of the semi-allogeneic fetus by immunosuppression and provide sufficient defense against external pathogens at the same time [41]. Therefore, CCL22 expression is also reasonable in healthy endometrium.

Though many studies have revealed the role of CCL22 in Treg accumulation and an impact on OS in cancer, the cellular source of CCL22 and its distribution in cancer tissue is still widely discussed. Initially being reported in immune cells of the macrophage-lineage [42], some studies describe CCL22 as exclusively expressed by immune cells like macrophages [43] and DC [30, 44, 45]. Others authors also report an expression by tumor cells, like in oral squamous cell carcinoma [46], gastric cancer [35] and breast cancer [13], mostly after activation. This implicates that a crosstalk between immune cells and tumor cells is ongoing and that, at least for some tumor entities, CCL22 expression is not restricted to immune cells. Abundant CCL22 expression was reported by tumor cells after combined crosstalk with NK cells and macrophages via IFN- γ , TNF- α and IL1 β [13, 17, 47]. This was also mentioned by Huang et al. [48] concerning CCL22 expression in oral cancer cells. However, TNF- α IL1 β , IL1 α and IFN- α are

suggested to play a role in immune cell derived CCL22 expression [16, 30, 43, 45]. In summary, immune cells and tumor cells seem to cooperate in driving production of CCL22 via proinflammatory cytokines.

Due to the positive correlations of the staining results, CCL22 expression was investigated in cell culture on mRNA, intracellular and extracellular protein level in order to trace the cascade of expression at each level. The results of the in vitro cell culture showed a barely measurable basal expression of CCL22 in the EC cell lines. In contrast, a significantly higher level was observed in PBMC isolated from healthy donor blood. Based on this, we investigated whether coculture of these cell types would result in an induction of CCL22. This has already been shown for several tumor cell lines [13, 30, 35, 45]. Also in EC an increase of CCL22 in the coculture SN was found and PBMC were detected as the relevant secreting cell fraction. But a closer look at the mRNA and intracellular protein levels in tumor cells revealed also an induction of CCL22 in tumor cells. These results are consistent with the results from histology, which showed a particularly high CCL22 level in the tumor cells. It is tempting to speculate, that tumor cells might be prevented from secreting CCL22 under certain circumstances, although intracellular expression is increased. Since CCL22 can only exert its effect as a Treg-attracting chemokine extracellularly, impeded secretion results in less Treg invasion and thus less tumor progression. Accordingly, CCL22 remaining in tumor cells has no effect on Treg invasion and may be associated with a better outcome. But further studies are needed and an additional study including also direct cocultures without physical separation could expand this picture regarding the importance of cell-cell contact.

PBMC were also identified as the main producer of CCL22 in SN in the context of coculture, based on the finding that PBMC incubation with cell free tumor SN induced a significant upregulation of secreted CCL22. In contrast culture of malignant cells in PBMC-SN resulted in reduced levels of CCL22, indicating a consumption or uptake by tumor cells or an enhanced degradation of the protein. When taking the strong linear correlation of CCL22 in S/M and tumor cells into consideration with higher levels in tumor cells and a diffuse staining of the stroma, the possible causes cover both a mutual stimulation of the cell types and a chemokine-uptake by tumor cells from the surrounding stroma.

Consistent with histology, CCL22 expression was also found in immune cells in the cell culture. Immunohistochemically, M1 macrophages could be identified as striking CCL22+ cells. However, they were only present in areas distant from the tumor, whereas in areas close to the tumor a uniform expression was seen in the stroma.

In contrast to CCL22, FoxP3 has been investigated in some studies for EC, but with contradictory results so far [49–52]. In a previous study we could show a clear correlation between an increased number of FoxP3+ T cells, considered to be Tregs, and a poorer OS [25]. Now, a strong correlation of CCL22 and FoxP3 in the same panel was revealed. This is in line with other studies on ovarian and breast cancer [31, 53, 54] and emphasizes the possible Treg-recruitment via CCL22.

Patients with high CCL22 in S/M also had higher FoxP3 levels in general. Additionally, the association between elevated numbers of FoxP3 positive cells and the absence of distant CCL22+ cells confirm an

impact of CCL22 expression on FoxP3+ cell infiltration into EC but without presupposing an unconditional spatial proximity.

Emerging evidence suggest that CCL22 is not the only Treg attracting chemokine, but the best known. Others like CCL1 [55, 56], CCL17 [20, 36] or CCL20 [57] are controversially discussed but need to be investigated in EC. The same is true for the CCL22-receptor CCR4 [21, 23, 58].

This study reveals the previously unknown prognostic influence of CCL22 in EC and gives insights regarding the expressing cell type. This finding is highly relevant for the understanding of immune evasion in EC and expands the previous findings and knowledge in Treg accumulation. CCL22 is an independent prognostic predictor for OS of EC patients, and it therefore may have the potential to serve as a future target of immunotherapeutic anticancer strategies in EC.

While the exact regulation and function of CCL22 in tumor cells needs to be further elucidated, our data suggest, that CCL22 levels in stroma and myometrium might be an important parameter for the intratumoral accumulation of immunosuppressive Treg. However, the underlying mechanism of crosstalk between tumor cells and immune cells with respect to mediating inflammatory cytokines, warrants additional confirmation by further studies. Inhibition of Treg migration can represent a future target of anticancer therapy in EC and requires further investigation.

Abbreviations

AP	Alkaline phosphatase
CCL22	CC-motif chemokine ligand 22
CCR4	CC-chemokine- receptor type 4
CI	Confidence interval
DAB	Chromogenic 3,3'-diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritic cell
EC	Endometrial carcinoma
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Estrogen receptor
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
FoxP3	Forkhead boxprotein 3
HR	Hazard ratio
HRP	Horseradish peroxidase
IRS	Immunoreactive score
MDC	Macrophage derived chemokine, CCL22
OS	Overall survival
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PD-L1	Programmed death ligand 1
PBS	Phosphate buffered saline
PFS	Progression-free survival
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of mean
S/M	Stroma/myometrium
SN	Supernatant
TMA	Tissue microarray
TME	Tumor microenvironment
Treg	Regulatory T-cell

Compliance with ethical standards

Ethics approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent: The study was approved by the ethics committee of the Ludwig-Maximilians University Munich (reference number: 048-08; 2008). Patient data were anonymized.

Consent to participate: not applicable as all data are anonymized

Consent to publish: not applicable as all data are anonymized

Availability of data and materials: All data generated or analysed during this study are included in this published article

Author Contributions: Conceptualization, T.K. and U.J.; methodology, M.M., C.P.; validation, Sa.M., L.H., So.M., E.S., C.P.; formal analysis, M.M.; investigation, M.M.; resources, Sv.M.; data curation, M.M.; writing—original draft preparation, M.M.; writing—review and editing, S.B., M.K., T.K.; visualization, M.M.; supervision, M.K., C.P., U.J.; project administration, S.C, F.T., T.K; funding acquisition, T.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Acknowledgements: We thank Dr. Johannes Heßler-Kaufmann for revising statistical analyses.

References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71:209–49. doi:10.3322/caac.21660.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68:394–424. doi:10.3322/caac.21492.
3. Constantine GD, Kessler G, Graham S, Goldstein SR. Increased Incidence of Endometrial Cancer Following the Women's Health Initiative: An Assessment of Risk Factors. *Journal of Women's Health*. 2019;28:237–43. doi:10.1089/jwh.2018.6956.
4. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497:67–73. doi:10.1038/nature12113.
5. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N, et al. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer*. 2015;113:299–310. doi:10.1038/bjc.2015.190.
6. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Yang W, Lum A, Senz J, et al. Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. *Cancer*. 2017;123:802–13. doi:10.1002/cncr.30496.
7. Jong RA de, Kema IP, Boerma A, Boezen HM, van der Want JLL, Gooden MJM, et al. Prognostic role of indoleamine 2,3-dioxygenase in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2012;126:474–80. doi:10.1016/j.ygyno.2012.05.034.
8. Jong RA de, Leffers N, Boezen HM, Hoor KA ten, van der Zee AGJ, Hollema H, Nijman HW. Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2009;114:105–10. doi:10.1016/j.ygyno.2009.03.022.

9. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Kamei T, Koike K, Inagawa H, et al. Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer research*. 2004;24:3335–42.
10. Ferguson A, Moore M, Fox H. Expression of MHC products and leucocyte differentiation antigens in gynaecological neoplasms: an immunohistological analysis of the tumour cells and infiltrating leucocytes. *Br J Cancer*. 1985;52:551–63. doi:10.1038/bjc.1985.227.
11. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331:1565–70. doi:10.1126/science.1203486.
12. Treilleux I, Blay J-Y, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla J-P, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7466–74. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0684.
13. Faget J, Biota C, Bachelot T, Gobert M, Treilleux I, Goutagny N, et al. Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer Res*. 2011;71:6143–52. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0573.
14. Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, et al. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med*. 1997;185:1595–604. doi:10.1084/jem.185.9.1595.
15. Mantovani A, Gray PA, van Damme J, Sozzani S. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol*. 2000;68:400–4.
16. Vulcano M, Albanesi C, Stoppacciaro A, Bagnati R, D'Amico G, Struyf S, et al. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur J Immunol*. 2001;31:812–22. doi:10.1002/1521-4141(200103)31:3<812::aid-immu812>3.0.co;2-l.
17. Ménétrier-Caux C, Faget J, Biota C, Gobert M, Blay J-Y, Caux C. Innate immune recognition of breast tumor cells mediates CCL22 secretion favoring Treg recruitment within tumor environment. *Oncoimmunology*. 2012;1:759–61. doi:10.4161/onci.19680.
18. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, 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 Res*. 2009;69:2000–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2360.
19. Li Y-Q, Liu F-F, Zhang X-M, Guo X-J, Ren M-J, Fu L. Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer. *PLoS One*. 2013;8:e76379. doi:10.1371/journal.pone.0076379.
20. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, Fujii H. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer*. 2008;122:2286–93. doi:10.1002/ijc.23392.
21. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004;10:942–9. doi:10.1038/nm1093.
22. Imai T, Chantry D, Raport CJ, Wood CL, Nishimura M, Godiska R, et al. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:1764–8. doi:10.1074/jbc.273.3.1764.

23. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2001;194:847–53. doi:10.1084/jem.194.6.847.
24. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, et al. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *PNAS*. 2013;110:17945–50. doi:10.1073/pnas.1316796110.
25. Kolben T, Mannewitz M, Perleberg C, Schnell K, Anz D, Hahn L, et al. Presence of regulatory T-cells in endometrial cancer predicts poorer overall survival and promotes progression of tumor cells. *Cell Oncol (Dordr)* 2022. doi:10.1007/s13402-022-00708-2.
26. Maolake A, Izumi K, Shigehara K, Natsagdorj A, Iwamoto H, Kadomoto S, et al. Tumor-associated macrophages promote prostate cancer migration through activation of the CCL22-CCR4 axis. *Oncotarget*. 2017;8:9739–51. doi:10.18632/oncotarget.14185.
27. Fu H, Li C, Yang W, Gai X, Jia T, Lei Y, Li Y. FOXP3 and TLR4 protein expression are correlated in non-small cell lung cancer: implications for tumor progression and escape. *Acta Histochem*. 2013;115:151–7. doi:10.1016/j.acthis.2012.06.002.
28. Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Der Pathologe*. 1987;8:138–40.
29. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71:7–33. doi:10.3322/caac.21654.
30. Wiedemann GM, Knott MML, Vetter VK, Rapp M, Haubner S, Fessler J, et al. Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells. *Oncoimmunology*. 2016;5:e1175794. doi:10.1080/2162402X.2016.1175794.
31. Wertel I, Surówka J, Polak G, Barczyński B, Bednarek W, Jakubowicz-Gil J, et al. Macrophage-derived chemokine CCL22 and regulatory T cells in ovarian cancer patients. *Tumour Biol*. 2015;36:4811–7. doi:10.1007/s13277-015-3133-8.
32. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39:1–10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012.
33. Birbrair A. *Tumor Microenvironment*. Cham: Springer International Publishing; 2020.
34. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:263–74. doi:10.1038/nrc1586.
35. Zhang N, Chen J, Xiao L, Tang F, Zhang Z, Zhang Y, et al. Accumulation Mechanisms of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells in EBV-associated Gastric Carcinoma. *Sci Rep*. 2015;5:18057. doi:10.1038/srep18057.
36. Maruyama T, Kono K, Izawa S, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Mimura K, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*. 2010;23:422–9. doi:10.1111/j.1442-2050.2009.01029.x.
37. Whiteside TL. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63:67–72. doi:10.1007/s00262-013-1490-y.

38. Wang X-Q, Zhou W-J, Luo X-Z, Tao Y, Li D-J. Synergistic effect of regulatory T cells and proinflammatory cytokines in angiogenesis in the endometriotic milieu. *Hum Reprod.* 2017;32:1304–17. doi:10.1093/humrep/dex067.
39. Jones RL, Morison NB, Hannan NJ, Critchley HOD, Salamonsen LA. Chemokine expression is dysregulated in the endometrium of women using progestin-only contraceptives and correlates to elevated recruitment of distinct leukocyte populations. *Hum Reprod.* 2005;20:2724–35. doi:10.1093/humrep/dei140.
40. Andrew DP, Chang MS, McNinch J, Wathen ST, Rihaneck M, Tseng J, et al. STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol.* 1998;161:5027–38.
41. Longoria TC, Eskander RN. Immunotherapy in endometrial cancer - an evolving therapeutic paradigm. *Gynecol Oncol Res Pract.* 2015;2:11. doi:10.1186/s40661-015-0020-3.
42. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic 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. *J Immunol.* 1995;155:1151–64.
43. Rodenburg RJ, Brinkhuis RF, Peek R, Westphal JR, van den Hoogen FH, van Venrooij WJ, van de Putte LB. Expression of macrophage-derived chemokine (MDC) mRNA in macrophages is enhanced by interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol.* 1998;63:606–11. doi:10.1002/jlb.63.5.606.
44. Piseddu I, Röhrlé N, Knott MML, Moder S, Eiber S, Schnell K, et al. Constitutive Expression of CCL22 Is Mediated by T Cell-Derived GM-CSF. *J Immunol.* 2020;205:2056–65. doi:10.4049/jimmunol.2000004.
45. Anz D, Rapp M, Eiber S, Koelzer VH, Thaler R, Haubner S, et al. Suppression of intratumoral CCL22 by type I interferon inhibits migration of regulatory T cells and blocks cancer progression. *Cancer Res.* 2015;75:4483–93. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3499.
46. Zhao X, Ding L, Lu Z, Huang X, Jing Y, Yang Y, et al. Diminished CD68+ Cancer-Associated Fibroblast Subset Induces Regulatory T-Cell (Treg) Infiltration and Predicts Poor Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Am J Pathol.* 2020;190:886–99. doi:10.1016/j.ajpath.2019.12.007.
47. Nakanishi T, Imaizumi K, Hasegawa Y, Kawabe T, Hashimoto N, Okamoto M, Shimokata K. Expression of macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 in human lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55:1320–9. doi:10.1007/s00262-006-0133-y.
48. Huang Y-H, Chang C-Y, Kuo Y-Z, Fang W-Y, Kao H-Y, Tsai S-T, Wu L-W. Cancer-associated fibroblast-derived interleukin-1 β activates protumor C-C motif chemokine ligand 22 signaling in head and neck cancer. *Cancer Sci.* 2019;110:2783–93. doi:10.1111/cas.14135.
49. Guo F, Dong Y, Tan Q, Kong J, Yu B. Tissue Infiltrating Immune Cells as Prognostic Biomarkers in Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *Dis Markers.* 2020;2020:1805764. doi:10.1155/2020/1805764.
50. Kübler K, Ayub TH, Weber SK, Zivanovic O, Abramian A, Keyver-Paik M-D, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 2014;135:176–83. doi:10.1016/j.ygyno.2014.08.028.
51. Giatromanolaki A, Bates GJ, Koukourakis MI, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL, Banham AH. The presence of tumor-infiltrating FOXP3+ lymphocytes correlates with intratumoral angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110:216–21. doi:10.1016/j.ygyno.2008.04.021.

52. Yamagami W, Susumu N, Tanaka H, Hirasawa A, Banno K, Suzuki N, et al. Immunofluorescence-detected infiltration of CD4+FOXP3+ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21:1628–34. doi:10.1097/IGC.0b013e31822c271f.
53. Freier CP, Kuhn C, Endres S, Mayr D, Friese K, Jeschke U, Anz D. FOXP3+ Cells Recruited by CCL22 into Breast Cancer Correlates with Less Tumor Nodal Infiltration. *Anticancer research*. 2016;36:3139–45.
54. Fialová A, Partlová S, Sojka L, Hromádková H, Brtnický T, Fučíková J, 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. *Int J Cancer*. 2013;132:1070–9. doi:10.1002/ijc.27759.
55. Hoelzinger DB, Smith SE, Mirza N, Dominguez AL, Manrique SZ, Lustgarten J. Blockade of CCL1 inhibits T regulatory cell suppressive function enhancing tumor immunity without affecting T effector responses. *J Immunol*. 2010;184:6833–42. doi:10.4049/jimmunol.0904084.
56. Kuehnemuth B, Piseddu I, Wiedemann GM, Lauseker M, Kuhn C, Hofmann S, et al. CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2018;18:1278. doi:10.1186/s12885-018-5117-8.
57. Chen K-J, Lin S-Z, Zhou L, Xie H-Y, Zhou W-H, Taki-Eldin A, Zheng S-S. Selective recruitment of regulatory T cell through CCR6-CCL20 in hepatocellular carcinoma fosters tumor progression and predicts poor prognosis. *PLoS One*. 2011;6:e24671. doi:10.1371/journal.pone.0024671.
58. Jackson JJ, Ketcham JM, Younai A, Abraham B, Biannic B, Beck HP, et al. Discovery of a Potent and Selective CCR4 Antagonist That Inhibits Treg Trafficking into the Tumor Microenvironment. *J Med Chem*. 2019;62:6190–213. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00506.



Eidesstattliche Versicherung

Mannewitz, Mareike

Name, Vorname

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

Die Rolle regulatorischer T-Zellen und ihres rekrutierenden Chemokins CCL22 im Uterus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen mit Fokus auf das Endometriumkarzinom

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, 29.04.2023
Ort, Datum

Mareike Mannewitz
Unterschrift

Vielen Dank...

...an meinen Doktorvater Prof. Dr. Thomas Kolben für die Ermöglichung dieser Arbeit in seiner Forschungsgruppe. Seine stets schnelle Hilfe bei Problemen in der Organisation und die konstruktive Kritik und Ratschläge, trugen das Projekt entscheidend weiter, sodass diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss kommen konnte. Ebenso gilt mein Dank Dr. Susanne Beyer für die Überlassung der spannenden Thematik, die Übernahme der Betreuung sowie das Vertrauen in mich.

...an Prof. Dr. Udo Jeschke, Dr. Mirjana Kessler und Dr. Sarah Meister für die zusätzliche Betreuung meines Projektes und ihr offenes Ohr zu jeder Zeit. Ihre umfangreiche wissenschaftliche Erfahrung und Hilfsbereitschaft haben mich auf allen Ebenen der Projektdurchführung enorm unterstützt.

...an die TAs des Labors in der Maistraße für ihre herzliche Aufnahme im Labor, die immerwährende Unterstützung bei Fragen und auch den ein oder anderen lustigen Moment.

...an die AG Immunregulation von Prof. Dr. David Anz mit Patrick Layritz, Konstantin Schnell, Antonia Beimer und Dr. Carolin Perleberg für die erfolgreiche Kooperation. Hilfe bei Durchführung der Durchflusszytometrierversuche. Es ist immer schön über „den Tellerrand“ der eigenen Arbeitsgruppe schauen zu dürfen und ich konnte von dieser Kooperation sehr profitieren. Caro, dir gilt mein spezieller Dank für deine weitreichende Unterstützung. Jedes Gespräch, jedes Troubleshooting und generell dich als Unterstützung zu haben war eine Bereicherung für mich und meine Arbeit.

...an das Graduate Center der LMU München, deren Seminar- und Beratungsangebot ich jedem anderen Doktoranden empfehlen möchte.

...an alle Doktoranden des Labors, insbesondere der „AG Kolben“. Die Promotionszeit ist immer eine sehr besondere, aber ihr habt sie für mich zu etwas ganz Besonderem gemacht. Dass dabei Freundschaften entstehen, in denen man sich nicht nur innerhalb des Labors unterstützt, sondern in jeder Lebenslage, ist ein großes Geschenk.

... an meine Freunde, die mich, wenn nötig, auf andere Gedanken bringen oder spontan einen gelungenen Versuch mit Sekt begießen; die immer wieder verrückte Ideen haben, jeder auf seine Art, und so mein Leben bereichern; die immer wieder Verständnis aufbrachten und mich motivierten, weiter zu machen.

...an meine Familie, die mitgelitten und mitgelacht hat; die mir zugehört haben, auch wenn sie an der ein oder anderen Stelle nur bedingt verstanden haben, wovon ich rede; die stets hinter mir standen und mich mit viel Liebe und Geduld bei der Verwirklichung aller meiner Träume unterstützt haben.