

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



**Rolle der Makrophagendifferenzierung und -interaktion  
mit regulatorischen T-Zellen bei der Progression und  
Regression der HPV-induzierten Zervixdysplasie**

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

vorgelegt von  
Nadine Kremer  
aus  
Bad Soden am Taunus  
Jahr  
2023

---

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

Erster Gutachten: Prof. Dr. med. Thomas Kolben

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Dr. Stefanie Corradini

Drittes Gutachten: Prof. Dr. Tobias Weißenbacher

Promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Aurelia Vattai

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2023

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	IX
1 Zusammenfassung .....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Überblick .....	3
2.2 HPV-Infektion als wesentlicher Risikofaktor.....	4
2.3 Diagnostik.....	7
2.4 Risiken der operativen Therapie .....	8
2.5 Immunantwort im Karzinomgeschehen .....	9
2.6 Regulatorische T-Zellen.....	10
2.7 CCL22 .....	13
2.8 Makrophagen.....	15
2.9 PPAR $\gamma$ .....	17
2.10 RIG I.....	19
2.11 SIRT-1 .....	21
2.12 Immuntherapie im Zervixkarzinom .....	24
2.13 Stand der Forschung – weitere Beispiele für prognostische Marker.....	25
3 Fragestellung und Zielsetzung .....	27
4 Material und Methoden .....	28
4.1 Material.....	28
4.1.1 Chemikalien.....	28
4.1.2 Hergestellte Verdünnungen, Puffer und Lösungen .....	29
4.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterial .....	30
4.1.4 Softwares .....	30
4.1.5 Primärantikörper für die Immunhistochemie.....	31
4.1.6 Antikörper und Fluorochrome für die Immunfluoreszenz.....	31
4.2 Patientinnenkollektiv .....	32

## Inhaltsverzeichnis

4.3	Aufbereitung der Paraffinschnitte.....	33
4.4	Immunhistochemie.....	33
4.5	Doppelimmunfluoreszenz .....	35
4.6	Auswertung.....	35
4.7	Statistische Analyse.....	36
5	Ergebnisse.....	37
5.1	Dysplasiegehalt und Auswertbarkeit der Schnitte .....	37
5.2	FoxP3-positive Zellen (Tregs).....	37
5.2.1	FoxP3-positive Zellen in der zervikalen Dysplasie .....	37
5.2.2	FoxP3-Expression in CIN I-III .....	38
5.2.3	FoxP3-Expression in Regression und Progression der CIN II .....	39
5.2.4	FoxP3-positive Zellen im dysplastischen Epithel.....	40
5.3	CCL22 .....	41
5.3.1	Epitheliale CCL22-Expression in CIN I-III .....	42
5.3.2	Epitheliale CCL22-Expression in Regression und Progression der CIN II 43	
5.3.3	CCL22-positive Zellen in Dysplasie-umgebenden Stroma .....	44
5.3.4	CCL22-positive Zellen in Dysplasie-umgebenden Stroma: CIN I-III .....	45
5.3.5	CCL22-positive Zellen in Dysplasie-umgebenden Stroma: Regression und Progression der CIN II .....	46
5.4	Korrelation CCL22 und FoxP3 .....	48
5.5	PPAR $\gamma$ .....	48
5.6	RIG-I.....	50
5.7	SIRT-1 .....	52
5.8	Doppelimmunfluoreszenz .....	55
5.8.1	CD68 und CCL22 .....	55
5.8.2	CD68 und PPAR $\gamma$ .....	57
5.8.3	CD68 und FoxP3 .....	58
5.9	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	60
6	Diskussion .....	62
6.1	FoxP3-positive T-regs in der CIN.....	62

## Inhaltsverzeichnis

6.2	Epitheliale CCL22-Expression/CCL22-Expression in Stroma-infiltrierenden Immunzellen.....	64
6.3	Doppelimmunfluoreszenzen .....	66
6.3.1	CD68 und CCL22 .....	66
6.3.2	CD68 und PPAR $\gamma$ .....	67
6.3.3	CD68 und FoxP3.....	68
6.4	Epitheliale PPAR $\gamma$ -Expression in der CIN .....	69
6.5	RIG-I Expression in der CIN .....	70
6.6	SIRT-1-Expression in der CIN .....	71
6.7	Diagnostische und therapeutische Relevanz der vorliegenden Ergebnisse ..	72
6.8	Einschränkungen der Studie.....	73
7	Resümee und Ausblick .....	74
8	Kongressbeiträge und Publikationen.....	75
	Literaturverzeichnis.....	76
	Danksagung .....	95

## Abkürzungsverzeichnis

### A

AML	Akute myeloische Leukämie
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
ASC-US	Atypical squamous cells of undetermined significance

### C

CARD	Caspase recruitment domain
CCL	C-C-chemokine ligand
CCR	C-C-chemokine receptor
CD	Cluster Differentiation
CDK	Cycline-dependent kinase
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia
CPS	Combined positive Score
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein
Cy-2, Cy-3	Cyanine-2,-3

### D

DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBC1	Deleted in Breast Cancer
DDX58-Gen	DExD/H-Box Helicase 58
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DNA	Desoxyribonucleic acid
DsRNA	Double-stranded-RNA

### F

FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
Foxo	Forkhead-Box-Protein O3
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3

### G

GITR	Glucocorticoid-induzierter TNF-Rezeptor
GM-CSF/HB-EGF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor

### H

HER2	Human epidermal growth factor receptor 2, offizieller Name: ERBB2
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen

## Abkürzungsverzeichnis

HPV	Humanes Papillomavirus
HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion
<b>I</b>	
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPEX-Syndrom	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
IRF	Interferon regulatory factor
IRS-Score	Immunreaktiver Score
<b>L</b>	
LAG	Lymphocyte Activating
LAST	The Lower Anogenital Squamous Terminology
LCor	Ligand-dependent (Nuclear Receptor) Corepressor
LEEP/LEETZ	Loop Electrosurgical Procedure/Large loop excision of the transformation zone
LPS	Lipopolysaccharid
LSIL	Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion
<b>M</b>	
MAVS	Mitochondrial Antiviral Signalling
MDA5	Melanom-Differenzierungsantigen 5
MDC	Macrophage-derived chemokine
MHC	Major histocompatibility Complex
MiR	MicroRNA
MMP	Matrix-Metalloproteinase
<b>N</b>	
NF-kB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	Natürliche Killerzellen
NSCLC	Non-small cell lung cancer
<b>P</b>	
Pap-Abstrich	Papanicolau-Abstrich
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell Death
PGE-2	Prostaglandin E
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PRR	Pattern Recognition Receptor



## Abkürzungsverzeichnis

### **R**

Rb/pRB	Retinoblastom(protein)
RIG-I	Retinoic Acid Inducible Gene I
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RXR	Retionid-X-Rezeptor

### **S**

SIRT-1	Sirtuin-1
SKP2-Gen	S-Phase Kinase Associated Protein 2-Gen
SLeA	Sialyl Lewis A
Smad2/3	Leitet sich ab von den Genen MAD (mothers against decapentaplegic) und Sma (small body size)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
STIKO	Ständige Impfkommission

### **T**

TCR	T-cell Receptor
TFNR	TNF-Rezeptor
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor
TPS (Score)	Tumor proportion score
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

### **V**

VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIN	Vulväre intraepitheliale Neoplasie

### **W**

WHO	World Health Organization
-----	---------------------------

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Onkoproteine E6/E7 der Humanen Papillomaviren (Quelle: Eigene Darstellung) .....	6
Abbildung 2: Interaktion von Makrophagen via CCL22 mit Tregs (Quelle: Eigene Darstellung) .....	13
Abbildung 3: PPAR $\gamma$ als Transkriptionsfaktor (Quelle: Eigene Darstellung) .....	17
Abbildung 4: RIG-I - Signalkaskaden und Funktionen (Quelle: Eigene Darstellung) .....	21
Abbildung 5: Interaktionen von SIRT-1 (Quelle: Eigene Darstellung) .....	24
Abbildung 6: Anzahl FoxP3-positiver Zellen in den Dysplasiegraden CIN I-III. 38	
Abbildung 7: FoxP3-positive Zellen in CIN I-III (Beispielaufnahmen) .....	39
Abbildung 8: Anzahl FoxP3-positiver Zellen in Regression und Progression der CIN II. ....	40
Abbildung 9: FoxP3-positive, Epithel-infiltrierende Zellen in Regression und Progression der CIN II (Beispielaufnahmen) .....	40
Abbildung 10: Anzahl FoxP3-positiver Zellen im Epithel in Regression und Progression der CIN II. ....	41
Abbildung 11: Immunreaktiver Score der CCL22-Expression in den Dysplasiegraden CIN I-III. ....	42
Abbildung 12: Immunreaktiver Score der CCL22-Expression in Regression und Progression der CIN II. ....	43
Abbildung 13: CCL22-Expression in CIN I-III sowie Regression und Progression der CIN II (Beispielaufnahmen) .....	44
Abbildung 14: CCL22-positive Zelle im Dysplasie-umgebenden Stroma. ....	44
Abbildung 15: Anzahl CCL22-positiver Zellen im Dysplasie-umgebenden Stroma CIN I-III. ....	45
Abbildung 16: CCL22-positive, stroma-infiltrierende Zellen in CIN I-III sowie Regression und Progression der CIN II (Beispielaufnahmen) .....	46
Abbildung 17: Anzahl CCL22-positiver Zellen in Regression und Progression der CIN II - 1 .....	47
Abbildung 18: Anzahl CCL22-positiver Zellen in Regression und Progression der CIN II - 2 .....	47
Abbildung 19: Immunreaktiver Score epithelialer PPAR $\gamma$ -Expriemierung in CIN I-III sowie Regression und Progression der CIN II .....	49

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: PPAR $\gamma$ -Expression in CIN I-III (Beispielaufnahmen) .....	50
Abbildung 21: Immunreaktiver Score epithelialer RIG-I-Exprimierung in CIN I-III sowie Regression und Progression der CIN II.....	51
Abbildung 22: RIG-I-Expression in CIN I-III (Beispielaufnahmen) .....	52
Abbildung 23: Immunreaktiver Score epithelialer SIRT-1-Exprimierung in CIN I- III sowie Regression und Progression der CIN II.....	53
Abbildung 24: SIRT-1-Expression in CIN I-III sowie in Regression und Progression der CIN II (Beispielaufnahmen) .....	54
Abbildung 25: Doppelimmunfluoreszenz CD68/CCL22 (Beispielaufnahme) ....	56
Abbildung 26: Doppelimmunfluoreszenz CD68/PPAR $\gamma$ (Beispielaufnahme)....	58
Abbildung 27: Doppelimmunfluoreszenz CD68/FoxP3 (Beispielaufnahme).....	59
Abbildung 28: Transkriptionsunabhängige Apoptose durch SIRT-1 (Quelle: Eigene Darstellung).....	72

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histologie und Zytologie der präkanzerösen Vorstufen des Zervixkarzinoms (In Anlehnung an Schiffman und Wentzsen, 2013). .....	4
Tabelle 2: Studienlage zur FoxP3-Expression im Karzinomgeschehen .....	13
Tabelle 3: Studienlage zur CCL22-Expression im Karzinomgeschehen .....	15
Tabelle 4: Studienlage zur M2-Infiltration im Karzinomgeschehen.....	16
Tabelle 5: Studienlage zur PPAR $\gamma$ -Expression im Karzinomgeschehen .....	18
Tabelle 6: Studienlage zur RIG-I-Expression im Karzinomgeschehen .....	20
Tabelle 7: Studienlage zur SIRT-1-Expression im Karzinomgeschehen .....	23
Tabelle 8: Auflistung verwendeter Chemikalien.....	29
Tabelle 9: Auflistung selbst hergestellter Mixturen aus Chemikalien aus Tabelle 1 .....	29
Tabelle 10: Auflistung verwendeter Geräte und Materialien.....	30
Tabelle 11: Auflistung verwendeter Softwares .....	30
Tabelle 12: Auflistung verwendeter Primärantikörper für die Immunhistochemie .....	31
Tabelle 13: Auflistung verwendeter Antikörper für die Doppelimmunfluoreszenz .....	32
Tabelle 14: Übersicht über die Zusammensetzung des untersuchten Patientinnenkollektives. ....	37
Tabelle 15: Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenz CD68/CCL22 .....	56
Tabelle 16: Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenz CD68/PPAR $\gamma$ .....	57
Tabelle 17: Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenz CD68/FoxP3.....	59

# 1 Zusammenfassung

Die zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) ist die Vorläuferläsion des HPV-induzierten Zervixkarzinoms. Sie tritt besonders bei jungen Frauen im gebärfähigen Alter auf (Paraskevaidis et al., 1992).

Wird histologisch eine CIN bestätigt, hängt das weitere Prozedere vom Ausmaß der Läsion ab: Bei einer CIN I folgen aufgrund des extrem geringen Progressionsrisikos zu fortgeschritteneren Dysplasiegraden lediglich regelmäßige Kontrollen; bei einer CIN III wird die Läsion außerhalb der Schwangerschaft operativ entfernt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Die LAST-Nomenklatur (Lower Anogenital Squamous Terminology Project) stuft die CIN II als „hochgradige squamöse intraepitheliale Läsion“ ein. Dies hat die operative Versorgung der CIN II in den meisten Ländern zur Folge (Darragh et al., 2012; Hsieh et al., 2019). Die CIN II-Läsionen stellen sich hinsichtlich ihres prognostischen Verhaltens sehr heterogen dar, sodass die Indikation zur Operation, insbesondere bei Frauen im gebärfähigen Alter, hier zurückhaltender gestellt werden sollte (Tainio et al., 2018; Wilkinson et al., 2015). Zur Entscheidung für oder gegen ein operatives Vorgehen werden daher weitere Faktoren wie Kinderwunsch oder der HPV-Status (Humane Papillomaviren) herangezogen (Vattai et al., 2021).

Von entscheidendem Vorteil wäre es, immunhistologische Marker zu evaluieren, die den Verlauf einer CIN II vorhersagen können. So könnten bei jenen Patientinnen, die eine relevante Regressionschance aufweisen, eine Übertherapie mit den einhergehenden Operationsrisiken, wie die Frühgeburtlichkeit, verhindert werden (Athanasίου et al., 2019). Zeigen die Marker ein hohes Progressionsrisiko an, könnte die Indikation zur operativen Therapie gestützt werden (Vattai et al., 2021)

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden potentiellen Biomarker untersucht: FoxP3 als Marker für regulatorische T-Zellen (Tregs) (Rudensky, 2011), CCL22 als Treg-rekrutierendes Chemokin (Wang et al., 2019), PPAR $\gamma$  als Transkriptionsfaktor und M2-Polarisationsmarker für Makrophagen (Kolben et al., 2017), RIG-I als Pattern Recognition Rezeptor (Xu et al., 2018) sowie SIRT-1 als in den Zellzyklus eingreifende Deacetylase (Zhang und Kraus, 2010).

## Zusammenfassung

Darüber hinaus wurden die CCL22-sezernierenden Zellen mittels Doppelimmunfluoreszenz charakterisiert und abschließend die Interaktion zwischen den CCL22-sezernierenden Zellen und den Tregs untersucht.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Patientinnen mit progredientem Krankheitsverlauf eine signifikant höhere Infiltrationsdichte FoxP3-positiver Tregs sowie eine höhere CCL22-Expression im Epithel aufwiesen. Die CCL22-sezernierenden Zellen konnten überwiegend als CD68/PPAR $\gamma$ -positive Makrophagen identifiziert werden. Makrophagen und Tregs waren vorwiegend in denselben dysplasienahen Geweberegionen (ko)lokalisiert. RIG-I- und SIRT-1 wiesen jeweils einen Trend zu höheren Expressionsraten in fortgeschritteneren Dysplasiegraden auf (Vattai et al., 2021).

Zusammenfassend ergänzen die vorliegenden Ergebnisse die - in diversen Tumorentitäten bereits beschriebene - negativ prognostische Rolle der Tregs insbesondere im Hinblick auf Regression und Progression der CIN (Adurthi et al., 2008). Die Ergebnisse stützen zudem die Annahme, dass CCL22, welches die Tregs zur spezifischen Einwanderung in die Läsion anlockt, überwiegend von M2-polarisierten CD68-positiven Makrophagen sezerniert wird. Darüber hinaus werden Hinweise gewonnen, dass auch RIG-I und SIRT-1 mit der Progression der CIN assoziiert sein könnten. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass sowohl FoxP3 als auch CCL22 als prognostische Marker in der CIN II herangezogen werden könnten. Ferner stellen beide Antigene potenzielle Angriffspunkte für medikamentöse Therapien dar (Vattai et al., 2021).

## 2 Einleitung

### 2.1 Überblick

Nach Brust-, Lungen- und Darmkrebs ist das Zervixkarzinom mit einer geschätzten Inzidenz von 570.000 Fällen pro Jahr die vierthäufigste Krebserkrankung von Frauen weltweit (Bray et al., 2018; World Health Organization, 2022). Die Inzidenz des invasiven Zervixkarzinoms ist aufgrund der Primär- und Sekundärprävention (vgl. Kapitel 2.2; 2.3) stark rückläufig (Drolet et al., 2019; Lei et al., 2020; Nauth, 2002; Schiffman und Wentzensen, 2013).

Etwa 80 Prozent der Zervixkarzinome entwickeln sich aus dem Plattenepithel; die direkte Vorstufe des invasiven Karzinoms ist die zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN), von welcher typischerweise Frauen im gebärfähigen Alter betroffen sind (Paraskevaidis et al., 1992). Bei der CIN werden, abhängig davon, welche Schichten des Epithels in die dysplastische Veränderungen involviert sind, folgende Schweregrade unterschieden: leichte Dysplasie (CIN I), mittlere (CIN II) und schwere Dysplasie (CIN III).

Mit einer Inzidenz von 1,2/1000 (CIN I) bzw. 0,8/1000 und 0,7/1000 (CIN II und CIN III) kommen die Karzinomvorstufen weitaus häufiger vor als das invasive Karzinom. Unter den 20-24-jährigen Frauen beträgt die Inzidenz der CIN I sogar 5,1/1.000; die höchste Inzidenz für CIN II und CIN III fanden sich mit 3,8 bzw. 4,1/1.000 unter den 25-29-Jährigen (Insinga et al., 2004; Nauth, 2002).

Im Jahr 2014 wurde eine weitere Nomenklatur eingeführt, welche an die US-amerikanische zytologische „Bethesda-Klassifikation“ angelehnt ist: Die LAST-Nomenklatur differenziert zwischen „low grade squamous intraepithelial lesion“ (LSIL, entspricht CIN I) und „high grade squamous intraepithelial lesion“ (HSIL, entspricht CIN II und III) (Kurman et al., 2014). Die verschiedenen Klassifikationsmodelle sind in Tabelle 1 gegenübergestellt.

	Histologie: <b>CIN-</b> Nomenklatur	Histologie: <b>LAST-</b> Nomenklatur	Zytologie: <b>Papanicolau-</b> klassifikation	Zytologie: <b>Bethesda-</b> Klassifikation
Negativ			I	NLM
Squamöse Atypie			II	ASC-US
Milde Dysplasie	CIN I	LSIL	III	LSIL
Moderate Dysplasie	CIN II	HSIL	IV	HSIL
Schwere Dysplasie/ Carcinoma in situ	CIN III	HSIL	V	HSIL
Karzinom				

*Tabelle 1: Histologie und Zytologie der präkanzerösen Vorstufen des Zervixkarzinoms (In Anlehnung an Schiffman und Wentzsen, 2013).*

Grundsätzlich ist anzumerken, dass jede CIN ein statistisches Risiko der Entartung mit sich bringt. Während sich eine CIN I in 10 % und eine CIN II bereits in 20 % der Fälle in eine CIN III umwandeln, entwickeln sich mindestens 12 % einer CIN III in ein invasives Karzinom (Arends et al., 1998). Andererseits liegen besonders bei CIN I und CIN II Chancen zur Regression vor. Je nach Studiendesign und Unterscheidungskriterien zwischen "Regression" und „Persistenz“ liegt bei einer CIN II die Regressionschance zwischen 40 und 90 % (Silver et al., 2018). So beschreiben Tainio et al., dass sich die Gruppe der CIN II-Patientinnen nach zwei Jahren wie folgt entwickelt hat: 50 % der CIN II-Patientinnen weisen eine Regression auf, 32 % zeigen keine Veränderung und 18 % der CIN II-Patientinnen entwickelten eine Progression der Dysplasie (Tainio et al., 2018). Es gilt, jene Patientinnen mit einer relevanten Regressionschance vor einer Übertherapie und den damit einhergehenden Risiken wie Frühgeburtlichkeit (Athanasίου et al., 2019; Kolben et al., 2017) zu bewahren (vgl. Kapitel 2.4).

## 2.2 HPV-Infektion als wesentlicher Risikofaktor

Als Hauptursache für die Entstehung zervikaler intraepithelialer Neoplasien wurde die persistierende Infektion mit Humanen Papillomaviren (HPV), welche der Gruppe der unbehüllten DNA-Viren angehören, identifiziert (Schiffman und



## Einleitung

Wentzensen, 2013; Walboomers et al., 1999). HP-Viren werden hauptsächlich sexuell übertragen (Workowski und Bolan, 2015). Unterschieden wird zwischen den HP-Viren der sogenannten „low-risk Gruppe“ (vor allem HPV 6 und 11) und der sogenannten „high-risk Gruppe“ (vor allem HPV 16 und 18). Die low-risk Gruppe ist für etwa 90 % der auftretenden Genitalwarzen, *Condylomata acuminata*, verantwortlich (Bosch und de Sanjosé, 2003). Die HP-Viren der high-risk Gruppe begünstigen die Entstehung dysplastischer Zellveränderungen (Arends et al., 1998; Ramachandran, 2017; Walboomers et al., 1999). Die meisten Frauen - etwa 80 % - infizieren sich im Laufe ihres Lebens mindestens einmal mit HPV. Die Infektion bleibt jedoch in den überwiegenden Fällen symptomlos und die Viren werden innerhalb von ein bis zwei Jahren aus den betroffenen Haut- und Schleimhautarealen eliminiert (Workowski und Bolan, 2015).

Bleibt die Besiedlung mit HPV hingegen bestehen, wird das Auftreten dysplastischer Zellveränderungen begünstigt: Das Onkoprotein E6 deaktiviert ATP- und ubiquitinabhängig das Tumorsuppressorgen p53, wodurch Apoptosevorgänge gehemmt werden (Arends et al., 1998; Gupta et al., 2003; Scheffner et al., 1990). Zudem aktiviert E6 den Transkriptionsfaktor TRIP-Br1, der den Komplex aus den Transkriptionsfaktoren E2F1 und DP1 verstärkt (Gupta et al., 2003). Das Onkoprotein E7 bindet wiederum das Tumorsuppressorgen Rb (Retinoblastom) und sorgt für die Dissoziation dessen vom Protein E2F, wodurch Rb seine Funktion als Kontrollpunkt im Zellzyklus vor dem Eintritt in die S-Phase verliert (Boyer et al., 1996; Chellappan et al., 1992). Auch p16INK4a, welches als HPV-Marker bekannt ist (Klaes et al., 2002), vgl. Kapitel 2.3 und Kapitel 7, trägt über Zyklin-abhängige Kinasen (CDK) zur gesteigerten Zellproliferation bei (Arends et al., 1998; Boyer et al., 1996; Chellappan et al., 1992; Gupta et al., 2003). Die Wirkmechanismen der viralen Onkoproteine E6 und E7 sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Derzeit liegen in Deutschland zwei gängige Impfstoffe gegen HPV vor, Cervarix® und Gardasil®9: Cervarix® ist ein bivalenter Impfstoff gegen die Hochrisikotypen HPV 16 und HPV 18; während Gardasil®9 einen neunvalenten Impfstoff darstellt, der zusätzlich gegen fünf weitere high-risk Typen sowie gegen die low-risk Typen 6 und 11 schützt (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2021). Es gilt, dass die Impfstoffe ihre Wirkung nur dann gänzlich entfalten, wenn es noch nicht zu einer persistierenden

## Einleitung

Infektion der jeweiligen HPV-Typen gekommen ist (Muñoz et al., 2009), weshalb die Impfung vor dem ersten Geschlechtsverkehr im Alter zwischen 9 und 14 Jahren empfohlen wird (Robert Koch Institut, 2018). Der konsequente Gebrauch von Kondomen verringert das Risiko einer HPV-Übertragung, stellt jedoch keinen gänzlich zuverlässigen Schutz dar (Winer et al., 2006).

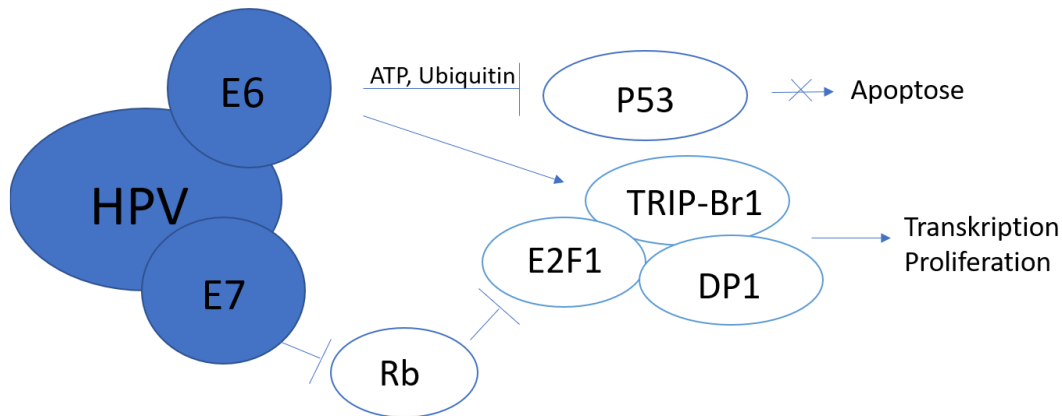


Abbildung 1: Onkoproteine E6/E7 der Humanen Papillomaviren (Quelle: Eigene Darstellung)

Das Onkoprotein E6 hemmt ATP-/ubiquitinabhängig p53, wodurch in der Folge weniger Zellapoptose eingeleitet wird. E7 hemmt die Funktion des Tumorsuppressorgens Rb, welches bestimmte Transkriptionsfaktoren wie E2F1/DP1 nicht mehr regulieren kann.

Neben der persistierenden HPV-Infektion gibt es weitere Risikofaktoren, welche die Progression zervikaler Dysplasien fördern (Castellsagué et al., 2002):

1. Risikofaktoren für den *Erwerb* einer HPV-Infektion
2. Risikofaktoren für das *Entstehen einer LSIL* auf dem Grund einer HPV-Infektion
3. Risikofaktoren für die *Progression der LSIL* zur HSIL.

Zu Ersterem zählt das Alter beim ersten Geschlechtsverkehr, die Anzahl der Sexualpartner sowie Kondomgebrauch, Beschneidung des Mannes und allgemeine Intimhygiene (Castellsagué et al., 2002). Entscheidend für die Entstehung einer LSIL auf der Grundlage einer HPV-Infektion sind der HPV-Genotyp und die Viruslast sowie die Konstitution des eigenen Immunsystems (Castellsagué et al., 2002). Risikofaktoren, welche das Voranschreiten der Zelltypen von einer LSIL zu einer HSIL begünstigen, sind das Rauchen oder der langjährige Gebrauch oraler Kontrazeptiva (Appleby et al., 2006; Luhn et al.,

2013; Smith et al., 2003). Auch mehrfache Schwangerschaften sowie Koinfektionen mit anderen sexuell übertragbaren Krankheiten wie Herpes

Simplex Virus 2, Chlamydia trachomatis oder Humane Immundefizienz-Virus stellen Risikofaktoren dar (Castellsagué et al., 2002). Es wird zudem diskutiert, ob die Ernährung der Patientin Einfluss auf die Progression zervikaler Dysplasien hat; so könnte die Zufuhr von Vitaminen wie Vitamin B6 oder Vitamin B12 protektiv wirken (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Castellsagué et al., 2002).

### 2.3 Diagnostik

In Deutschland gibt es ein Organisiertes Krebsfrüherkennungsprogramm zur Prävention des Zervixkarzinoms: Bei Patientinnen zwischen 20 und 34 Jahren erfolgt einmal jährlich ein zytologischer Abstrich nach Papanicolau (Pap-Abstrich) zur Früherkennung intraepithelialer Läsionen; ab einem Alter von 35 Jahren erfolgt alle drei Jahre eine Kotestung, bestehend aus HPV-Test und Pap-Abstrich (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Anhand des Ergebnisses des primären Screenings erfolgt das weitere Prozedere (vgl. Leitlinienprogramm Onkologie, 2022):

- Ist das Risiko für die Entwicklung einer hochgradigen Dysplasie gering (Pap I-IIa), folgen lediglich ggf. regelmäßige klinische und zytologische Kontrollen.
- In grenzwertigen oder unklaren Fällen (Pap IIp, IIID, IIIp oder IIIx) sind nach 6 Monaten eine erneute zytologische Untersuchung bzw. ein HPV-Test angezeigt; gegebenenfalls folgt nach weiteren 3 Monaten eine Kolposkopie.
- Bei einem Pap Stadium von IIID2, IVa und aufwärts erfolgt eine kolposkopische Untersuchung, bei der eine Biopsie zur histologischen Beurteilung entnommen wird. Es wird der CIN-Grad identifiziert sowie zwischen LSIL und HSIL unterschieden.

Durch die Screeningprogramme zur Sekundärprävention ist die Inzidenz des Zervixkarzinoms stark rückläufig. Allein zwischen 1990 und 2000 sank die Inzidenz über 42 % (Herbert, 2000; Schiffman et al., 2011). Anzumerken ist, dass bei den zytologischen Screeningverfahren eine geringe

Interobserverübereinstimmung besteht (Klaes et al., 2002; Schmidt, 2016). Zudem birgt der Einsatz von HPV-Tests im Primärscreening das Risiko einer Überversorgung, da junge Frauen häufig eine transiente und nicht behandlungsdürftige HPV-Besiedlung aufweisen (Workowski und Bolan, 2015). Aktuell wird intensiv an der Etablierung neuer Biomarker geforscht, um die Unterscheidung reaktiver und reparativer Veränderungen zu erleichtern, um zudem kleine Läsionen besser erkennen zu können sowie darüber hinaus prognostische Aussagen zu treffen. Für den Einsatz von Biomarkern im primären Screening ist die Datenlage bislang noch nicht ausreichend (Klaes et al., 2002; Schmidt, 2016).

### 2.4 Risiken der operativen Therapie

Wird histopathologisch eine CIN bestätigt, hängt das weitere Prozedere vom Grad der Dysplasie ab: Bei einer CIN I folgen regelmäßige Kontrollen im Abstand von 3-6 Monaten. Das Vorgehen bei CIN II-Patientinnen kann aufgrund der statistisch relevanten Chance zur Regression (vgl. Kapitel 1, 2.1) sowohl chirurgisch als auch konventionell erfolgen. Zur Entscheidungsfindung werden weitere Parameter wie das Alter der Patientin, Einsehbarkeit und Persistenz der Läsion sowie ein eventuell vorhandener Kinderwunsch herangezogen (Vattai et al., 2021). Bei einer CIN III besteht bei Patientinnen über 24 Jahren außerhalb der Schwangerschaft in der Regel die Indikation zur Konisation. Diese kann als vollständige Schlingenkonisation der Transformationszone (LEEP, Loop Electrical Excision Procedure / LLETZ, Large Loop Excision of the Transformation Zone) erfolgen; weitere therapeutische Möglichkeiten stellen die Laserexzision, Laserkonisation, Messerkonisation, Laservaporisation und die Kryotherapie dar (Kolben et al., 2019).

Neben allgemeinen Operationsrisiken wie Blutung, Infektion, Thrombosen, Verletzung umliegender Strukturen ist nach einer Operation an der Zervix uteri besonders auf das Risiko der Frühgeburtlichkeit hinzuweisen (Athanasίου et al., 2019; Kyrgiou et al., 2016). Weitere Operationsrisiken sind ein vorzeitiger Blasensprung, niedriges Geburtsgewicht, Chorioamnionitis, perinatale Morbidität sowie Mortalität und Stenosen der Zervix uteri (Arbyn et al., 2008; Kyrgiou et al., 2016). Je nach gewähltem Behandlungsverfahren sind die Risiken

## Einleitung

unterschiedlich stark ausgeprägt: Ablative Verfahren sowie kleinere Exzisionen bringen geringere Wahrscheinlichkeiten für Frühgeburtlichkeit mit sich als besonders tiefe (>10-12mm) oder mehrfach durchgeführte Konisationen (Kyrgiou et al., 2016). Darüber hinaus ist anzumerken, dass ohnehin das Bestehen einer CIN ein gewisses Basisrisiko für Frühgeburtlichkeit mit sich bringt (Kyrgiou et al., 2017).

Kolben et al. zeigten, dass die limitierte Exzision, welche lediglich die dysplastischen Areale entfernt, der herkömmlichen Large Loop Exzision der Transformationszone (LLETZ) hinsichtlich der Operationsergebnisse nicht unterlegen zu sein scheint (Kolben et al., 2019). Die limitierte Exzision stellt somit einen Ansatz dar, der die schwerwiegenden Operationsrisiken der LLETZ vermindern könnte. Eine weitere Maßnahme, die Häufigkeit der Komplikationen zu minimieren, stellt natürlich die gezieltere Indikationsstellung für oder wider ein operatives Verfahren mithilfe prognostischer Biomarker dar. Auch medikamentöse Therapien könnten eine Alternative zur operativen Therapie darstellen (Vattai et al., 2021). Die vorliegende Arbeit soll sowohl zur Identifizierung prognostischer Marker als auch zur Etablierung medikamentöser Therapien einen Beitrag leisten.

## 2.5 Immunantwort im Karzinomgeschehen

Viele Tumoren besitzen die Fähigkeit, sich einer spezifischen Immunantwort zu entziehen und dadurch ihr Wachstum zu begünstigen. Tumoren zeigen häufig eine reduzierte Expression von Oberflächenantigenen oder sie exprimieren Autoantigene (De Visser et al., 2003). Im Tumormilieu liegen häufig wenig aktivierte Antigen-präsentierende-Zellen (APC) vor, welche T-Zellen zu Effektor- oder Gedächtniszellen heranreifen lassen können (Bandola-Simon und Roche, 2019). T-Zellen können darüber hinaus durch inhibitorische Rezeptoren wie PD-1 oder CTLA-4 inaktiviert werden (Dyck und Mills, 2017; Peggs et al., 2008). Tumorzellen sind in der Lage, immunsupprimierende Moleküle wie IDO, PGE2 und IL-10 zu sezernieren (Whiteside, 2006). Auch M2-polarisierte Makrophagen, Fibroblasten und regulatorische T-Zellen können an der Modifizierung des Immunsystems zugunsten der Tumorprogression beteiligt sein (Adurthi et al., 2008; Baitsch, Fuertes-Marraco et al., 2012; Chen et al., 2017; Wang et al., 2019).

## 2.6 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung einer ausbalancierten Immunhomöostase im gesunden Organismus beteiligt. Liegt ein Defizit an Tregs vor oder sind diese nicht funktionsfähig, kann dies die Entstehung schwerwiegender Autoimmunerkrankungen zur Folge haben (Colamatteo et al., 2020; Setoguchi et al., 2005). Im Mausmodell führte ein Treg-Mangel zur sogenannten „Scurfy mouse“, einem Autoimmunphänotyp (Godfrey et al., 1991). Auch beim Menschen kann eine verringerte Anzahl an Tregs im Rahmen des IPEX-Syndroms („immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked“) dramatische Autoimmunerkrankungen zur Folge haben (Park et al., 2020).

Tregs stellen eine Subpopulation CD4-positiver T-Zellen dar, welche bei stabiler immunsuppressiver Funktion das Oberflächenprotein CD25 aufweist (Setoguchi et al., 2005; Workman, Szymczak-Workman et al., 2009). Unterschieden werden, je nach ihrem Entstehungsort, „natürliche Tregs“ und „induzierte Tregs“. Die „natürlichen Tregs“ entwickeln sich im Thymus, während sich die induzierten Tregs aus naiven T-Zellen mittels Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) in der Peripherie ausbilden (Workman et al., 2009). Die Mechanismen, welche zur Herunterregulierung des Immunsystems durch Tregs beitragen, sind bereits vielfältig analysiert worden: Tregs können ihre immunsuppressive Funktion einerseits über direkte Interaktion mit anderen Immunzellen, beispielsweise über den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4, LAG3 oder die Fas/Fas-Liganden-Achse, ausüben, andererseits kann die Immunsuppression indirekt über von Tregs sezernierte Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10), TGF- $\beta$ , Granzym A/B oder Perforin erfolgen (Adurthi et al., 2008; Jørgensen et al., 2019; Kojima et al., 2013; Miyara und Sakaguchi, 2007; Ohue und Nishikawa, 2019; Rudensky, 2011; Strauss et al., 2009; Walker, 2013; Yano et al., 2019; Yu et al., 2005). Darüber hinaus kann durch die IL2R $\alpha$ -Kette des CD25 in der Umgebung vorhandenes IL-2 gebunden werden, welches in der Folge nicht mehr zur tumorspezifischen T-Zell-Aktivierung zur Verfügung steht (Adurthi et al., 2008; Workman et al., 2009). Für eine stabile Funktion der Tregs ist unter anderem Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2), ein Rezeptor für TNF $\alpha$ , von Bedeutung (Adurthi et al., 2008; Yang et al., 2018; Teng Zhang et al., 2017).

## Einleitung

Forkhead box protein 3 (FoxP3) gilt als spezifischer Marker für aktivierte Tregs. Das Protein spielt eine Schlüsselrolle in ihrer immunsuppressiven Funktion (Park et al., 2020). Darüber hinaus zeigt die FoxP3-Expression, ebenso wie TNFR2, eine stabile Funktion der Tregs an (Loddenkemper et al., 2009; Rudensky, 2011). Eine spezifische Migration von Tregs kann über Zytokine wie beispielsweise TGF- $\beta$  oder IL-10 erfolgen (Workman et al., 2009). Auch Chemokingradienten, welche von anderen Immunzellen generiert werden, können Tregs rekrutieren (Li et al., 2013) (vgl. Kapitel 0). Karzinomzellen können ebenfalls FoxP3 exprimieren (Hinz, 2007). In HPV-induzierten Dysplasien wurde eine p16ink4a-induzierte FoxP3-Expression beobachtet, welche mit der Persistenz des Virus korrelierte (Bashaw et al., 2019; Bonin et al., 2019; Zeng et al., 2013). Virale Antigene riefen die Migration FoxP3-positiver Tregs in der Zervix besonders stark hervor, verglichen mit anderen Tumorentitäten wie dem Kolonkarzinom (Loddenkemper et al., 2009).

Eine hohe Infiltrationsdichte regulatorischer T-Zellen kann im Karzinomgeschehen zu Immuntoleranz und infolgedessen zur Tumorprogression führen (Zeng et al., 2013). Die Assoziation zwischen gesteigerter Treg-Infiltration und schlechterer Prognose, d.h. gesteigerter Lymphangiogenese, kürzerem Gesamtüberleben, erhöhter Tumorgröße, vermehrter Stromainvasion sowie kürzerem progressionsfreiem Überleben ist in vielen Tumorentitäten gezeigt worden; so im Magenkarzinom, im kutanen Melanom, im Mammakarzinom, im Ovarialkarzinom, im Zervixkarzinom und zahlreichen anderen Tumorentitäten (Adurthi et al., 2008; De Jong & al., 2009; Fu et al., 2019; Galon et al., 2006; Jang, 2008; Sato et al., 2005; Tang et al., 2017; Zhang et al., 2016; Teng Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2019). Im Mammakarzinom sowie im Prostatakarzinom wird die prognostische Rolle des FoxP3 kontrovers diskutiert, da das FoxP3-Gen dort auch als Tumorsuppressor identifiziert wurde (Wang et al., 2010; Zuo et al., 2007) und eine gesteigerte Expression beispielsweise zu einer verminderten Angiogenese im Bereich des Karzinoms führen kann (Li et al., 2018).

Die überwiegende Anzahl an Studien legt jedoch die negative prognostische Rolle FoxP3-positiver Zellen, besonders FoxP3-positiver Tregs, dar. Repräsentative Studien aus diversen Tumorentitäten sind in Tabelle 2 aufgelistet. Einen Überblick über die Interaktionen von Tregs mit anderen Immunzellen wie Makrophagen gibt Abbildung 2.

<b>Tumorentität</b>	<b>Pos*</b>	<b>Neg*</b>	<b>Besonderheiten</b>
<b>Blasenkarzinom</b>		<i>Horn et al. 2016</i>	Betrachtet wurde das FoxP3/CD3 bzw. FoxP3/CD8-Verhältnis.
<b>Endometriumkarzinom</b>		<i>De Jong et al. 2009</i>	
<b>Hepatozelluläres Karzinom</b>		<i>Kobayashi et al. 2007</i>	
<b>Hepatozelluläres Karzinom</b>	<i>Shi et al. 2017</i>		
<b>Hepatozelluläres Karzinom</b>		<i>Zhang et al. 2016</i>	
<b>Kolorektales Karzinom</b>		<i>Deng et al. 2010</i>	
<b>Kolorektales Karzinom</b>		<i>Galon et al. 2006</i>	
<b>Magenkarzinom</b>		<i>Perrone et al. 2008</i>	
<b>Mammakarzinom</b>		<i>Bailur et al. 2015</i>	
<b>Mammakarzinom</b>		<i>Demir et al. 2013</i>	
<b>Mammakarzinom</b>	<i>Li et al. 2018</i>		Negative Korrelation mit VEGF-Expression
<b>Mammakarzinom</b>		<i>Peng et al. 2019</i>	
<b>Mammakarzinom</b>	<i>Wang et al. 2010</i>		X-linked Tumorsuppressor
<b>Mammakarzinom</b>		<i>Zhao et al. 2019</i>	
<b>Mammakarzinom</b>	<i>Zuo et al. 2007</i>		SKP2-Suppressor
<b>Melanom</b>		<i>Fu et al. 2019</i>	
<b>Ovarialkarzinom</b>		<i>Curiel et al. 2008</i>	
<b>Ovarialkarzinom</b>		<i>Knutson et al. 2015</i>	Betrachtet wurde das CD8/Treg bzw. CD4/Treg-Verhältnis
<b>Ovarialkarzinom</b>		<i>Sato et al. 2005</i>	Betrachtet wurde das CD8/Treg Verhältnis.
<b>Pankreaskarzinom</b>		<i>Hinz et al. 2007</i>	
<b>Prostatakarzinom</b>	<i>Wu et al. 2019</i>		
<b>Spinozelluläres Karzinom</b>		<i>Jang et al. 2008</i>	
<b>Zervikale intraepitheliale Neoplasie</b>		<i>Kojima et al. 2013</i>	
<b>Zervikale intraepitheliale Neoplasie/Zervixkarzinom</b>		<i>Adurthi et al. 2008</i>	CIN: Tregs eher in Stroma, Zervizitis intraepithelial
<b>Zervikale intraepitheliale Neoplasie/Zervixkarzinom</b>		<i>Zhang et al. 2017</i>	Untersucht wurden TNFR2+ Tregs



<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Bonin et al. 2019</i>	
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Tang et al. 2017</i>	Positive Korrelation mit VEGF-c-Expression
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Visser et al. 2007</i>	Tregs im peripheren Blut erhöht
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Yang et al. 2020</i>	
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Zeng et al. 2013</i>	
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Zhao et al. 2017</i>	

Tabelle 2: Studienlage zur FoxP3-Expression im Karzinomgeschehen

\*Pos=Im Karzinom weniger FoxP3 vorhanden als im gesunden Gewebe/besserer Outcome bei erhöhter FoxP3-Expression. Neg= Im Karzinom mehr FoxP3 vorhanden als im gesunden Gewebe/schlechterer Outcome bei erhöhter FoxP3-Expression.

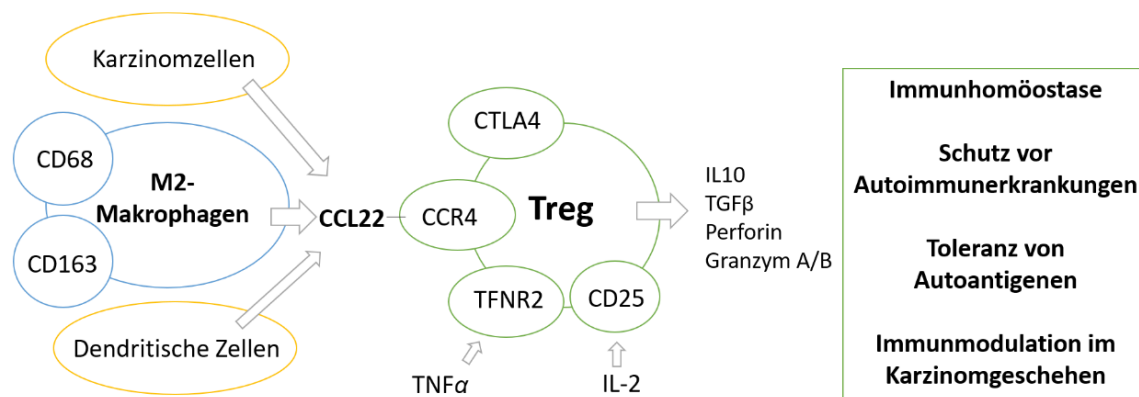


Abbildung 2: Interaktion von Makrophagen via CCL22 mit Tregs (Quelle: Eigene Darstellung)

Sowohl Karzinomzellen als auch M2-polarisierte Makrophagen und dendritische Zellen können CCL22 sezernieren, welches über den Chemokinrezeptor CCR4 Tregs gewebespezifisch anlocken und so zur gesteigerten Immunsuppression führen kann. Nähere Informationen sind im Text enthalten (vgl. Kapitel 0 und 2.8).

## 2.7 CCL22

Chemokine gehören zur Gruppe der Zytokine und können durch Konzentrationsgradienten andere Immunzellen, welche entsprechende Chemokinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche tragen, gewebespezifisch anlocken. Das Chemokin CCL22 wurde zunächst mit dem Namen „Macrophage-Derived Cytokine“ (MDC) beschrieben (Yamashita und Kuroda, 2002). Der Name „CCL22“ steht für im Chemokin enthaltene Cystein-Aminosäuren, die untereinander Disulfidbrücken ausbilden (Altmeyers Enzyklopädie, 2017). CCL22 wird hauptsächlich von Makrophagen, dendritischen Zellen und lymphatischem Gewebe sezerniert bzw. exprimiert (Human Protein Atlas, 2021; Qun Wang et al., 2019; Yashiro et al., 2019). CCL22 wirkt chemotaktisch auf

## Einleitung

natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, Monozyten und T-Lymphozyten (Godiska et al., 1997; Schaniel et al., 1998; Scheu et al., 2017).

Über CCR4, einen G-Protein-gekoppelten zellmembranständigen Chemokinrezeptor, kann CCL22 regulatorische T-Zellen rekrutieren (Curiel et al., 2004; Scheu et al., 2017; Zhao et al., 2017). Dies kann physiologisch und für die gesunde Immunbalance unabdingbar sein. So können Tregs beispielsweise in die Haut migrieren, um dort eine überschießende Immunantwort zu verhindern (Günther und Pfeiffer, 2007).

Im Karzinomgeschehen ist durch verschiedenartige Stimuli eine gesteigerte CCL22-Expression und damit eine vermehrte Migration von Tregs möglich. Diese spezifische Migration stellt einen Mechanismus dar, durch den Tumorzellen eine spezifische Immunantwort vermindern können (Curiel et al., 2004; Huang et al., 2019; Li et al., 2013). In Abbildung 2 ist dieser Mechanismus schematisch dargestellt. Zu den Stimuli, welche die Expression von CCL22 erhöhen können, gehören IL-1, Interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) und TNF $\alpha$  (Faget et al., 2011; Iellem et al., 2001).

In diversen Tumorentitäten wurde beobachtet, dass eine erhöhte CCL22-Expression mit einem schlechteren Outcome einhergeht. Dazu gehören beispielsweise das Mammakarzinom und das Mundbodenkarzinom (Huang et al., 2019; Li et al., 2013). Im Zervixkarzinom wurde eine positive Korrelation zwischen erhöhter CCL22-Expression und vermehrten Lymphknotenmetastasen, hohem FIGO-Stadium und verkürzter Überlebenszeit beschrieben (Qun Wang et al., 2019; Zhao et al., 2017).

In der CIN und insbesondere in Betrachtung ihrer Regression und Progression ist die Rolle von CCL22 bislang wenig untersucht. Tabelle 3 gibt einen Überblick über repräsentative Studien zur CCL22-Expression in verschiedenen Tumorentitäten.

Entität	Pos*	Neg*	Besonderheiten
<b>Gliom</b>	<i>Zhou et al. 2015</i>		
<b>Lungenkarzinom</b>	<i>Nakanishi et al. 2006</i>		
<b>Mammakarzinom</b>		<i>Li et al. 2013</i>	

<b>Mundbodenkarzinom</b>		<i>Huang et al. 2019</i>	Korrelation mit FoxP3-positiven Tregs
<b>Ovarialkarzinom</b>		<i>Curiel et al. 2004</i>	
<b>Vulväre intraepitheliale Neoplasie</b>		<i>Santegoets et al. 2008</i>	
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Wang et al. 2019</i>	Korrelation mit FoxP3-positiven Tregs
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Zhao et al. 2017</i>	

Tabelle 3: Studienlage zur CCL22-Expression im Karzinomgeschehen

\*Pos=Im Karzinom weniger CCL22 vorhanden als im gesunden Gewebe/besserer Outcome bei erhöhter CCL22-Expression. Neg= Im Karzinom mehr CCL22 vorhanden als im gesunden Gewebe/schlechterer Outcome bei erhöhter CCL22-Expression.

## 2.8 Makrophagen

Cluster Differentiation Protein 68 (CD68) ist ein immunhistochemischer Makrophagenmarker (Jiang et al., 2016; Kolben et al., 2018). Abhängig von ihrer Polarisation übernehmen Makrophagen in der Immunhomöostase verschiedene Funktionen: Während M1-polarisierte Makrophagen vorwiegend proinflammatorisch agieren und so beispielsweise die Immunantwort gegen Tumoren fördern, haben M2-polarisierte Makrophagen antiinflammatorische Funktionen wie die Toleranz gegenüber Autoantigenen oder die Erhaltung einer Schwangerschaft inne (Fujisaka et al., 2009; Heublein et al., 2013; Kolben et al., 2018; Slukvin et al., 2004; Stremmel et al., 2018).

M2-polarisierte Makrophagen können durch PPAR $\gamma$  differenziert und aktiviert werden (Kolben et al., 2018); siehe hierzu auch Kapitel 2.9. Karzinomzellen können darüber hinaus Moleküle wie Il-6 oder PGE-2 sezernieren, welche zur Heranreifung M2-polarisierter Makrophagen beitragen (Heusinkveld et al., 2011; Kim und Bae, 2016).

Makrophagen, insbesondere jene vom M2-Polarisationstyp, können zur Immunsuppression im Karzinomgeschehen und infolgedessen zur Tumorprogression beitragen (Hartwig et al., 2017; Mantovani et al., 2008; Rigo et al., 2010). So sezernieren M2-Makrophagen wie dendritische Zellen und Karzinomzellen das Treg-rekrutierende Zytokin CCL22 (Liu et al., 2020; Qun Wang et al., 2019; Yashiro et al., 2019), was in Abbildung 2 schematisch dargestellt ist. Zudem sezernieren M2-Makrophagen IL-10, welches die Treg-

## Einleitung

Differenzierung induziert (Bolpetti et al., 2010; Qun Wang et al., 2019). Darüber hinaus sind M2-polarisierte Makrophagen in der Lage, die Anzahl HPV-spezifischer T-Zellen zu reduzieren (Bolpetti et al., 2010; Lepique et al., 2009; Walentowicz-Sadlecka et al., 2013). Das negative prognostische Potenzial von M2-Makrophagen wurde in vielen Tumorentitäten wie dem Magenkarzinom, dem hepatozelluläre Karzinom und dem Prostatakarzinom beschrieben (Hu et al., 2015; Jeremiasen et al., 2020; Yao et al., 2018). Auch im Zervixkarzinom sind, verglichen mit gesundem Gewebe der Zervix, deutlich erhöhte Zahlen M2-polarisierter Makrophagen zu finden (Li et al., 2017). Chen et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen hoher Infiltration M2-polarisierter Makrophagen und schlechterem Outcome wie einem fortgeschritteneren FIGO-Stadium und vermehrten Lymphknotenmetastasen (Chen et al., 2017). In der CIN wurden bislang keine erhöhten Infiltrationsraten M2-polarisierter Makrophagen beschrieben. Repräsentative Studien, welche die Rolle M2-polarisierter Makrophagen in verschiedenen Tumorentitäten beleuchten, sind in Tabelle 4 gelistet.

Entität	Pos*	Neg*	Besonderheiten
<b>Gastoesophageales Adenokarzinom</b>		<i>Jeremiasen et al. 2020</i>	
<b>Hepatozelluläres Karzinom</b>		<i>Yang et al. 2018</i>	Karzinomzellen induzieren die M2-Polarisation von Makrophagen
<b>Hepatozelluläres Karzinom</b>		<i>Yao et al. 2018</i>	
<b>Mammakarzinom</b>		<i>Sousa et al. 2015</i>	Karzinomzellen induzieren die M2-Polarisation von Makrophagen
<b>Ösophaguskarzinom</b>		<i>Hu et al. 2017</i>	
<b>Prostatakarzinom</b>		<i>Comito et al. 2014</i>	
<b>Prostatakarzinom</b>		<i>Hu et al. 2015</i>	
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Bolpetti et al. 2010</i>	M2-Makrophagen induzieren die Treg-Differenzierung über IL-10
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Chen et al. 2017</i>	
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Heusinkveld et al. 2011</i>	
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Li et al. 2017</i>	

Tabelle 4: Studienlage zur M2-Infiltration im Karzinomgeschehen

\*Pos=Positive prognostische Rolle M2-polarisierter Makrophagen. Neg= Negative prognostische Rolle M2-polarisierter Makrophagen.

## 2.9 PPAR $\gamma$

Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) gehört zur Gruppe nukleärer Hormonrezeptoren (Gillespie et al., 2011). Liganden für PPAR $\gamma$  sind beispielsweise Fettsäuren und Eicosanoide (Youssef und Badr, 2011). Bei Aktivierung bilden PPAR im Zellkern ein Heterodimer mit dem Retinsäurerezeptor RXR, was die Transkription diverser Gene zur Folge hat (Michalik et al., 2006). Die Heterodimerbildung ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Bekannt sind PPAR vor allem als Regulatoren für die  $\beta$ -Oxidation und die Ketonkörpersynthese sowie als Mediator im Glukosemetabolismus (Shao et al., 2016).

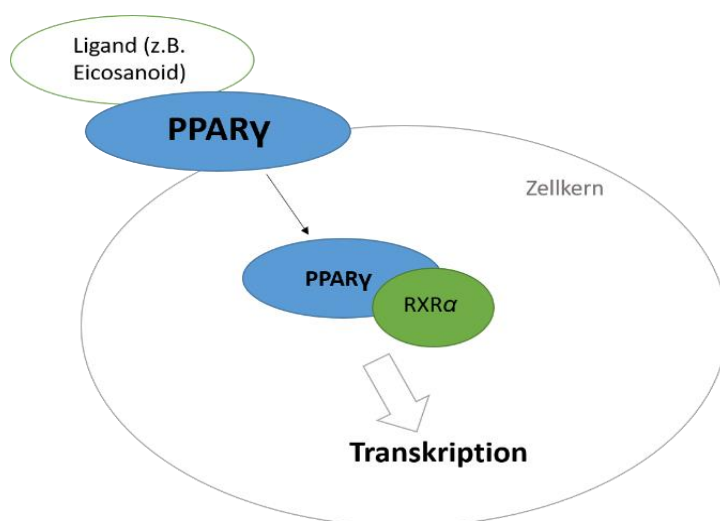


Abbildung 3: PPAR $\gamma$  als Transkriptionsfaktor (Quelle: Eigene Darstellung)

Bei Aktivierung bilden PPAR im Zellkern mit RXR $\alpha$  ein Heterodimer, was die Transkription diverser Gene induziert.

Neben PPAR $\gamma$  sind zwei weitere Unterformen der PPAR-Gruppe bekannt, PPAR $\alpha$  und PPAR $\beta$ - $\delta$ . PPAR $\gamma$  wird ubiquitär exprimiert und wurde darüber hinaus in hohen Konzentrationen im Verdauungstrakt, den weiblichen Geschlechtsorganen und der Plazenta nachgewiesen (Human Protein Atlas, 2021). In zahlreichen Studien wurde die antiinflammatorische Wirkung von PPAR $\gamma$  beschrieben (Griffiths et al., 2017; Narala et al., 2014). Diese findet in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II bereits therapeutische Anwendung (Scheen et al., 2015). Auch im Autoimmungeschehen können PPAR $\gamma$ -Agonisten zu einer ausbalancierteren Immunmodulation beitragen (Liu et al., 2020). Die verringerte PPAR $\gamma$ -Expression im Abortgeschehen spiegelt die antiinflammatorische Wirkung der PPAR $\gamma$ -Rezeptoren wider (Kolben et al., 2018).

## Einleitung

Neben seiner Funktion im Fett- und Glukosemetabolismus trägt PPAR $\gamma$  zur Differenzierung von unpolarisierten Makrophagen in M2-polarisierte Makrophagen bei, weshalb eine PPAR $\gamma$ -Expression auf Makrophagen mit dem ebenfalls antiinflammatorischen M2-Polarisationszustand assoziiert ist (Bouhlef et al., 2007; Kolben et al., 2018; Li et al., 2011; Tontonoz und Spiegelman, 2008; Xu et al., 2016). Die Rolle von PPAR $\gamma$  in Karzinomen wurde vielfach untersucht. Die antiinflammatorischen Eigenschaften lassen zunächst vermuten, dass eine erhöhte PPAR $\gamma$ -Expression mit einer verminderten Immunantwort und infolgedessen mit vermehrtem Tumorwachstum assoziiert ist. Erhöhte Expressionlevels des PPAR $\gamma$ -Rezeptors finden sich jedoch nur in wenigen Tumorentitäten wie beispielsweise dem Blasenkarzinom (Cheng et al., 2019). Die große Mehrheit der Studienergebnisse legt einen positiven Zusammenhang zwischen erhöhter PPAR $\gamma$ -Expression und besserer Prognose dar. So wurde durch Applikation von PPAR $\gamma$ -Agonisten ein reduziertes Tumorwachstum beschrieben (Gionfriddo et al., 2020; Wang et al., 2017; Wuertz et al., 2017). Repräsentative Studien aus verschiedenen Tumorentitäten finden sich in Tabelle 5. Insbesondere in der CIN ist der prognostische Wert von PPAR $\gamma$  noch unklar.

Entität	Pos*	Neg*	Besonderheiten
<b>Blasenkarzinom</b>		<i>Cheng et al. 2019</i>	Sowohl auf Transkriptions- als auf Translationseben
<b>Endometriumkarzinom</b>	<i>Huang et al. 2020 (R. Huang et al., 2020)</i>		
<b>Mammakarzinom</b>	<i>Gionfriddo et al. 2020</i>		Interaktion mit Makrophagen
<b>NSCLC</b>		<i>Li et al. 2011</i>	PPAR $\gamma$ in myeloiden Zellen
<b>Zervixkarzinom</b>	<i>Hyun et al. 2015</i>		PPAR $\gamma$ -Agonisten induzierten Apoptose
<b>Zervixkarzinom</b>	<i>Jung et al. 2005</i>		
<b>Zervixkarzinom</b>	<i>Wuertz et al. 2017</i>		PPAR $\gamma$ -Agonisten reduzierten Tumorwachstum

Tabelle 5: Studienlage zur PPAR $\gamma$  -Expression im Karzinomgeschehen

\*Pos= Im Karzinom weniger PPAR $\gamma$  vorhanden als im gesunden Gewebe/besserer Outcome bei erhöhter PPAR $\gamma$  -Expression. Neg= Im Karzinom mehr PPAR $\gamma$  vorhanden als im gesunden Gewebe/schlechterer Outcome bei erhöhter PPAR $\gamma$  -Expression.

## 2.10 RIG I

RIG I ist ein zytosolischer Pattern Recognition Receptor (PRR), welcher für die Erkennung von RNA- und kurzen DNA-Viren zuständig ist (Dixit und Kagan, 2013). Dazu gehören das Influenza A und -B Virus, das Hepatitis C Virus, Respiratorische Synzytial Virus, Herpes Simplex Virus und weitere (Chiu et al., 2009; Kato et al., 2006; Loo et al., 2008; Saito et al., 2007). Es handelt sich bei RIG-I um eine ATP-abhängige RNA-Helikase mit einer Repressordomäne am C-Terminus und zwei CARD-Strukturen (caspase activation and recruitment domains) am N-Terminus (Dixit und Kagan, 2013). Aktiviert wird RIG-I, indem eine zumeist doppelsträngige RNA (dsRNA) mit einem 5`-Triphosphatende an die Repressordomäne bindet. Daraufhin können die CARDS an die CARD-Domäne des mitochondrialen antiviralen Signal Proteins (MAVS) binden, wodurch proinflammatorische Signalkaskaden (z.B. IFN1-Weg, NFkB) eingeleitet werden (Dixit und Kagan, 2013).

Abgesehen von der Erkennung viraler RNA/DNA hat RIG-I weitere Funktionen (Xu et al., 2018), wie beispielsweise die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen (Imaizumi et al., 2007). In wenigen Tumorentitäten wurde RIG-I als Tumorsuppressor identifiziert, so im Hepatozellulären Karzinom (Xu et al., 2018), im Kolorektalen Karzinom, im Pankreaskarzinom und der Akuten Myeloischen Leukämie (Ellermeier et al., 2013; Ruzicka et al., 2020; Zhu et al., 2017). Die tumorsupprimierende Funktion resultiert unter anderem aus einer STAT1-Aktivierung, welche wiederum über IFN antiproliferativ wirkt (Xu et al., 2018). RIG-I kann die Apoptose (prä)kanzeröser Zellen über die Aktivierung CD8-positiver T-Zellen induzieren (Żeromski et al., 2019).

In anderen Tumorentitäten wie beispielsweise dem Ovarialkarzinom ist RIG-I mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Wolf et al., 2020). Im Mammakarzinom kann eine erhöhte RIG-I-Expression das Ansprechen auf medikamentöse Therapien verschlechtern (Boelens et al., 2014). Als zugrundeliegender Mechanismus wird vermutet, dass die Erkennung eigener nichtkodierender RNA hier eine Rolle spielt (Xu et al., 2018). Die verschiedenen Wirkmechanismen bzw. Funktionen von RIG-I sind in Abbildung 4 graphisch dargestellt.

Für das Zervixkarzinom sind die folgenden Erkenntnisse über die Rolle von RIG-I gewonnen worden: Micro-RNA34a konnte die Expression von RIG-I *in vitro*

## Einleitung

hochregulieren, was den Zellzyklus verlangsamte und die Apoptose von Karzinomzellen unterstützte (Wang et al., 2016). So könnte RIG-I also tumorsupprimierend agieren. Auch die Aktivierung von RIG-I mittels modifizierter 5'-Triphosphat RNA (ppp-GLS) hatte die Aktivierung proapoptotischer Signalwege zur Folge (Meng et al., 2014). Mutationen im MAVS-Gen können eine höhere Vulnerabilität für HPV-induzierte präkanzeröse Läsionen zur Folge haben (Xiao et al., 2019). Zusammenhänge zwischen mutierten PRR-Genen und der Tumorprogression in der Zervix wurden bereits mehrfach beobachtet (Kutikhin und Yuzhalin, 2012; Pandey et al., 2009). In HPV-infizierten Zellen lag in einer Studie von Reiser et al. eine verminderte RIG-I-Expression vor (Reiser et al., 2011). Zudem reduziert das virale Onkoprotein E6 die Bindung von RIG-I an MAVS (Chiang et al., 2018). Karim et al. beobachteten in ihrer Studie keine Beeinträchtigung der RIG-I-Expression durch HPV (Karim et al., 2011). In der CIN und insbesondere ihrer Regression und Progression ist die Rolle von RIG-I derzeit noch nicht abschließend geklärt. Tabelle 6 fasst einschlägige Studien aus verschiedenen Tumorentitäten zusammen.

Entität	Pos*	Neg*	Besonderheiten
<b>Akute myeloide Leukämie</b>	<i>Ruzicka et al. 2020</i>		Therapeutisches Potenzial von RIG-I-Agonisten
<b>Hepatozelluläres Karzinom</b>	<i>Xu et al. 2018</i>		RIG-I wirkt protektiv
<b>Mammakarzinom</b>		<i>Boelens et al. 2014</i>	RIG-I-Aktivierung verschlechtert Therapieansprechen
<b>Kolorektales Karzinom</b>	<i>Zhu et al. 2017</i>		
<b>Ovarialkarzinom</b>		<i>Wolf et al. 2020</i>	
<b>Pankreaskarzinom</b>	<i>Ellermeier et al. 2013</i>		Therapeutisches Potenzial von RIG-I-Agonisten
<b>Zervixkarzinom</b>	<i>Meng et al. 2014</i>		Agonisten steigern Apoptose
<b>Zervixkarzinom</b>	<i>Wang et al. 2016</i>		Agonisten steigern Apoptose

Tabelle 6: Studienlage zur RIG-I-Expression im Karzinomgeschehen

\* Pos=Im Karzinom weniger RIG-I vorhanden als im gesunden Gewebe/besserer Outcome bei erhöhter RIG-I-Expression. Neg= Im Karzinom mehr RIG-I vorhanden als im gesunden Gewebe/schlechterer Outcome bei erhöhter RIG-I-Expression.



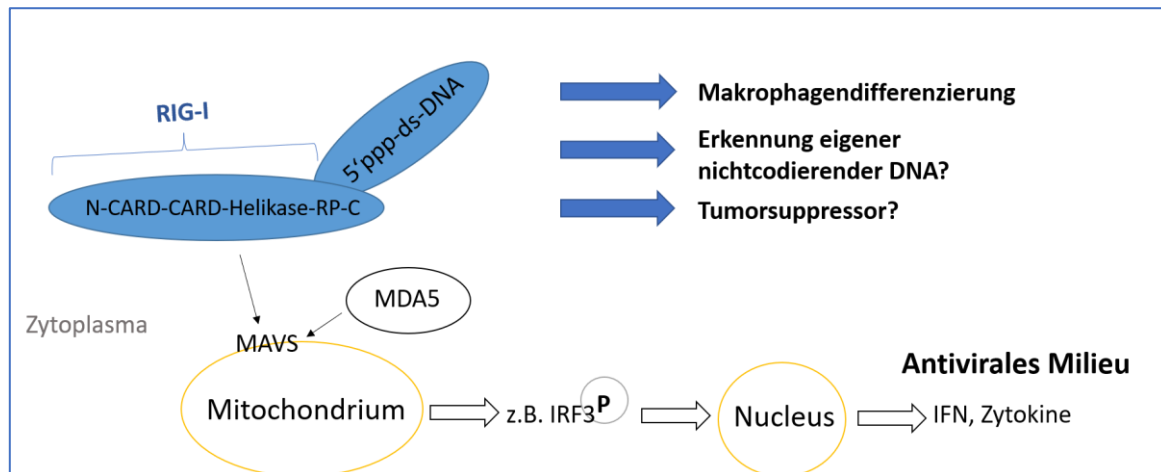


Abbildung 4: RIG-I - Signalkaskaden und Funktionen (Quelle: Eigene Darstellung)

RIG-I aktiviert das Signalprotein MAVS, welches beispielsweise über Interferon regulatory factor 3 (IRF3) zur Etablierung eines antiviralen Milieus beiträgt. Weitere diskutierte Wirkungen von RIG-I sind rechts oben in der Abbildung aufgelistet.

## 2.11 SIRT-1

Sirtuin-1 (SIRT-1) gehört, wie sechs weitere Enzyme, zur Familie der Sirtuine. Es handelt sich bei SIRT-1 um ein NAD<sup>+</sup>-abhängiges Enzym, das mehrere Regulationsproteine durch Deacetylierung oder Komplexbildung modifiziert (Yi und Luo, 2010). So deacetyliert SIRT-1 beispielsweise Histone, was die Zugänglichkeit der entsprechenden Gene beeinflusst (Zhang und Kraus, 2010). Auch Nicht-Histone wie p53 oder PPAR $\gamma$  werden durch SIRT-1 über Deacetylierung oder Komplexbildung modifiziert (Luo et al., 2001). So greift SIRT-1 durch Modifizierung von Proteinen wie p53, welche unmittelbar Einfluss auf apoptotische Vorgänge haben, in den Zellzyklus ein. SIRT-1 liegt intrazellulär vor; zumeist im Zellkern, teilweise auch zytoplasmatisch (Bai und Zhang, 2016). Als natürlicher Antagonist für SIRT-1 ist der Tumorsuppressor DBC1 (deleted in breast cancer 1) bekannt (Zhao et al., 2008).

SIRT-1 trägt, ebenso wie PPAR $\gamma$ , zur Regulation des Zucker- und Fettstoffwechsels bei. Durch direkte Bindung an PPAR $\gamma$  wird Fett aus den Adipozyten mobilisiert sowie die Lipolyse verstärkt (Picard et al., 2004). Zudem wird die Neubildung von Adipozyten gehemmt (Zhou et al., 2016). Diese Effekte können in der Prävention und der Behandlung des Diabetes Typ II eingesetzt werden (Pacifici et al., 2019). SIRT-1 spielt zudem eine protektive Rolle in der Zellalterung und bei degenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Lee et al.,

## Einleitung

2019; Rizzi und Roriz-Cruz, 2018). Das Enzym erhöht die Stabilität von Zellen: SIRT-1 kann über Deacetylierung von p53 zur Verlangsamung der Apoptose führen (Yi und Luo, 2010) und durch direkte Bindung an FOXO Zellen effektiver gegen oxidativen Stress schützen (Hori et al., 2013). Darüber hinaus stabilisiert SIRT-1 die immunsuppressive Funktion von Tregs (Beier et al., 2011; van Loosdregt et al., 2011). Abbildung 5 fasst die beschriebenen Interaktionen von SIRT-1 mit Histonen und Nicht-Histon-Proteinen zusammen.

Je nach Tumorentität kann SIRT-1 als Tumorsuppressor oder Tumorpromotor agieren (Alves-Fernandes und Jasiulionis, 2019). Die Funktion des Enzyms als Tumorsuppressor wird vergleichsweise weniger referiert als die des Tumorpromotors (Wu et al., 2017); ersteres ist beispielsweise im Kolorektalen Karzinom der Fall (Sun et al., 2017). Dong Hoon Shin et al. differenzieren zwischen dem Tumor-umgebenden Stroma und den Karzinomzellen selbst: Sie stellten in ihrer Studie fest, dass eine hohe SIRT-1-Expression im Stroma über erhöhte MMP3-Levels (Matrix-Metalloproteinase 3) zum Tumorwachstum beiträgt, eine hohe SIRT-1-Expression im Tumor selbst jedoch das Wachstum hemmt (Shin et al., 2016). Die Literatur zeigt überwiegend auf, dass eine hohe SIRT-Expression mit einem erhöhten Malignitätspotential einhergeht (Asaka et al., 2015; Velez-Perez, Wang et al., 2017; Wu et al., 2017). Im Zervixkarzinom besteht eine Assoziation zwischen SIRT-1-Überexpression und einem schlechteren Outcome (So et al., 2018). Die mikroRNA MiR-29a wurde als Inhibitor für SIRT-1 im Zervixkarzinom identifiziert und so ist das Outcome bei Patientinnen mit hohen MiR-29a-Spiegeln besser als bei niedrigen Spiegeln (Nan et al., 2019). Der Knock-out von SIRT-1 stoppte die Zellproliferation und unterstützte die Apoptose Paclitaxel-resistenter Zellen im Zervixkarzinom (Xia & Zhou, 2018). Auch in der zervikalen Dysplasie wurden erhöhte Expressionslevel von SIRT-1 beschrieben (Singh et al., 2015; Velez-Perez et al., 2017). Hierzu trägt unter anderem das Onkoprotein E7 bei (Allison et al., 2009). SIRT-1 wiederum kann die viralen Onkoproteine E1 und E2 regulieren (Das et al., 2017). Repräsentative Studien zur Rolle von SIRT-1 in verschiedenen Tumorentitäten sind in Tabelle 7 aufgelistet.

## Einleitung

<b>Entität</b>	<b>Pos*</b>	<b>Neg*</b>	<b>Besonderheiten</b>
<b>Endometriumkarzinom</b>		<i>Asaka et al. 2015</i>	
<b>Hepatozelluläres Karzinom</b>		<i>Wu et al. 2017</i>	
<b>Kolonkarzinom</b>	<i>Firestein et al. 2008</i>		SIRT-1 reduziert Tumorwachstum
<b>Kolorektales Karzinom</b>	<i>Sun et al. 2017</i>		SIRT-1 reduziert Metastasierung
<b>Magenkarzinom</b>		<i>Wu et al. 2017</i>	
<b>Prostatakarzinom</b>		<i>Huffman et al. 2007</i>	
<b>Zervikale intraepitheliale Neoplasie</b>		<i>Singh et al. 2015</i>	
<b>Zervikale intraepitheliale Neoplasie/Zervixkarzinom</b>		<i>Velez-Perez et al. 2017</i>	
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Nan et al. 2019</i>	
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Ou et al. 2018</i>	
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>So et al. 2018</i>	
<b>Zervixkarzinom</b>		<i>Xia und Zhou 2018</i>	Knockdown von SIRT-1 bewirkte eine Wachstumshemmung sowie gesteigerte Apoptose in Tumorzellen

Tabelle 7: Studienlage zur SIRT-1-Expression im Karzinomgeschehen

\*Pos=Im Karzinom weniger SIRT-1 vorhanden als im gesunden Gewebe/besserer Outcome bei erhöhter SIRT-1-Expression. Neg= Im Karzinom mehr SIRT-1 vorhanden als im gesunden Gewebe/schlechterer Outcome bei erhöhter SIRT-1-Expression.

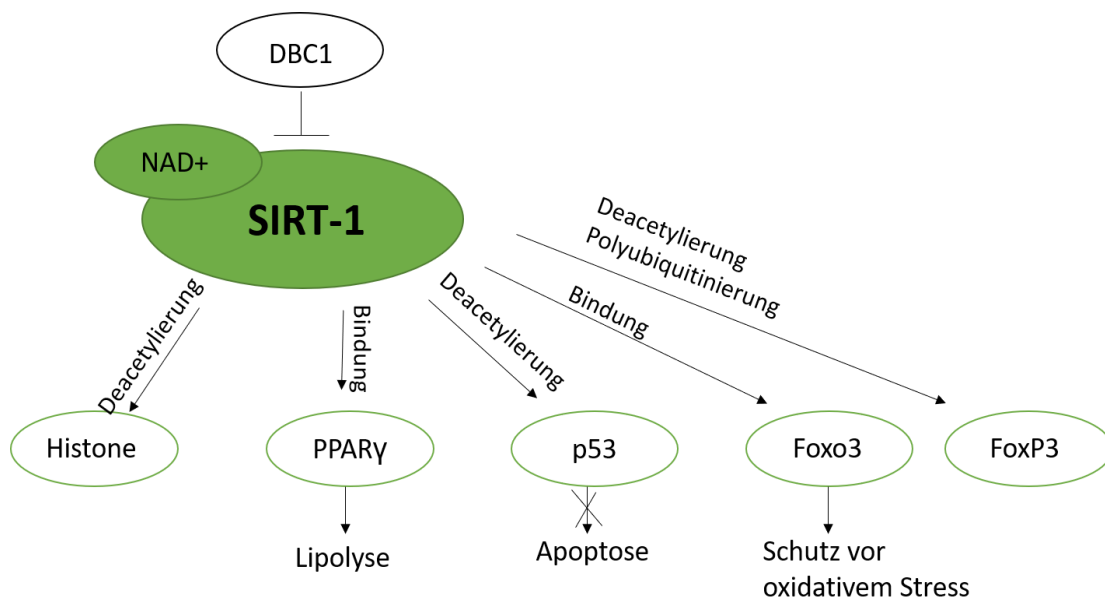


Abbildung 5: Interaktionen von SIRT-1 (Quelle: Eigene Darstellung)

SIRT-1 führt über Modifizierung verschiedener Proteine/Histone zur gesteigerten Lipolyse, zu verminderter Apoptose, zu gesteigertem Schutz vor oxidativem Stress. Natürlicher Inhibitor ist DBC1. Weitere Informationen sind im Text enthalten.

## 2.12 Immuntherapie im Zervixkarzinom

Immun-Checkpoints sind Rezeptoren bzw. Liganden, die im gesunden Organismus T-Zellen und andere Immunzellen so modulieren, dass überschießende Immunreaktionen verhindert werden (Fischer und Heinemann, 2020). Immun-Checkpoints können auch von Tumorzellen genutzt werden, um sich vor T-Zell-assoziierten Immunangriffen zu schützen (Darvin et al., 2018; Fischer und Heinemann, 2020). Um diesen sogenannten Escape-Mechanismus auszuschalten, werden im Rahmen der Tumorthherapie zunehmend mehr Checkpoint-Inhibitoren eingesetzt. Ein Beispiel hierfür sind PD-(L)1-Inhibitoren, welche beispielsweise in HNO-Tumoren (HPV-assoziierte Plattenepithelkarzinome) therapeutisch angewandt werden (Topalian et al., 2015). Im Zervixkarzinom gibt es bereits eine Reihe an klinischen Studien, die den Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab oder Nivolumab prüfen: Die Studien KEYNOTE-028 (Phase Ib-Studie) sowie KEYNOTE-158 (Phase II) und CheckMate-358 (Phase I/II) zeigen bei PD-1/PD-L1-positiven Zervixkarzinomen Ansprechraten zwischen 12,2 und 26,3 % (Chung et al., 2019; Frenel et al., 2017; Naumann et al., 2019). Der PD-1-Inhibitor

## Einleitung

Cemiplimab wurde bereits in einer Phase III Studie – EMPOWER - Cervical 1 – getestet, in der Cemiplimab eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens von Zervixkarzinom Patientinnen zeigte (Tewari et al., 2021). Die NCCN Guidelines® empfehlen Pembrolizumab nach Progression während/nach Chemotherapie bei PD-L1-positiven Zervixkarzinomen, wofür es in der EU auch bereits eine Zulassung gibt (National Comprehensive Cancer Network 2020; Colombo, 2021; Europäische Kommission, 2022; Vattai et al., 2021).

Beim Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren gilt es stets, jene Patienten zu identifizieren, welche in besonderem Maße von der Immuntherapie profitieren können. Hierbei ist die Anwendung verschiedener Scores (TPS, CPS) als Selektionskriterium von großer Bedeutung. Der Forschung kommt zur weiteren Etablierung von Biomarkern ein hoher Stellenwert zu, um Nutzen sowie potentielle immunassoziierte Nebenwirkungen von Immuntherapien besser einschätzen zu können (Fischer und Heinemann, 2020; Vattai et al., 2021).

### 2.13 Stand der Forschung – weitere Beispiele für prognostische Marker

Zahlreiche Studien beleuchten Expressionsunterschiede von Proteinen zwischen den verschiedenen CIN-Stadien. Es wurden die verschiedenen Gruppen untereinander verglichen - CIN I mit CIN II, CIN II mit CIN III usw -, um anschließend eine Aussage über die Möglichkeit des Markers als Prädiktor für Regression und Progression zu treffen (Velez-Perez et al., 2017).

Ein signifikanter Unterschied in der Markerexpression zwischen Regression und Progression der Läsion muss sich jedoch nicht zwangsläufig in signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen CIN-Stadien ohne Berücksichtigung der Dynamik niederschlagen (Adurthi et al., 2008). Um eine Aussage über den prognostischen Wert von Markern zur Progression und Regression der CIN II zu treffen, erscheint es somit äußerst sinnvoll, die Follow-Up-Untersuchungen von CIN II Patientinnen zu berücksichtigen und diese je nach Dynamik ihrer CIN in eine Gruppe mit Regression und eine Gruppe mit Progression einzuteilen. Unterschiede in der Markerexpression werden dann zwischen diesen beiden Gruppen evaluiert. Die Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Kolben der Ludwig-

## Einleitung

Maximilians-Universität München hat diese differenzierte Einteilung des Kollektives in „CIN II mit anschließender Regression“ und „CIN II mit anschließender Progression“ beispielsweise in folgenden Studien vorgenommen:

1. Prostaglandin E2-Rezeptor 3 (EP3): Bei Patientinnen mit einer CIN II, welche im Verlauf einen Progress zur CIN III zeigten, war EP3 signifikant niedriger exprimiert als bei den Patientinnen mit anschließender Regression (Hester et al., 2019).
2. Sialyl Lewis a (sLeA): Bei Patientinnen mit einer CIN II, welche im Verlauf einen Progress zur CIN III zeigten, war sLeA signifikant höher exprimiert als bei den Patientinnen mit anschließender Regression (Kolben et al., 2017).
3. Ligand dependent corepressor (LCoR): Die nukleäre LCoR-Expression war positiv mit der Progression der CIN II korreliert (Vogelsang et al., 2020).

### 3 Fragestellung und Zielsetzung

Die Vorläuferläsion des Zervixkarzinoms, die zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN), ist besonders häufig bei jungen Frauen im gebärfähigen Alter zu beobachten (Paraskevaidis, 1992). Da sich nicht jede CIN zu einem invasiven Karzinom entwickelt, sondern vor allem CIN I- und CIN II-Patientinnen eine statistisch relevante Chance eines regredienten Krankheitsverlaufs aufweisen (Tainio et al., 2018), gilt es, jene Patientinnen mit hoher Regressionschance zu identifizieren, um diese vor einer Übertherapie zu bewahren. Primäres Ziel dieser Arbeit war es, prognostische Marker zu evaluieren, mithilfe derer in Zukunft eine fundiertere Entscheidung für oder wider eine operative Therapie der CIN II getroffen werden kann (Vattai et al., 2021).

FoxP3-positive Tregs können eine tumorspezifische Immunantwort unterdrücken (Workman et al., 2009). Es sollte untersucht werden, ob Tregs auch in der CIN vermehrt zu finden sind (1). Des Weiteren sollte evaluiert werden, ob CCL22, ein Treg-rekrutierendes Chemokin (Qun Wang et al., 2019), in der progredienten CIN vermehrt exprimiert wird (2). Die Charakterisierung der Zellen, welche eine starke CCL22-Sezernierung zeigen, stellte ein weiteres Ziel dieser Arbeit dar (4,5,6). Darüber hinaus sollten die Expressionslevels von PPAR $\gamma$ , RIG-I und SIRT-1 untersucht werden (7,8,9). Es wurden folgende Versuche durchgeführt:

1. Immunhistochemische Analyse der **FoxP3**-Expression
2. Immunhistochemische Analyse der **CCL22**-Expression
3. Korrelation der CCL22-Expression mit der Infiltration FoxP3-positiver Zellen
4. Doppelimmunfluoreszenz mit **CCL22** und **CD68** als Makrophagenmarker
5. Doppelimmunfluoreszenz mit **PPAR $\gamma$**  als M2-Marker und **CD68** als Makrophagenmarker (Theresa Maria Kolben et al., 2018)
6. Doppelimmunfluoreszenz mit **FoxP3** und **CD68** als Makrophagenmarker
7. Immunhistochemische Analyse der **PPAR $\gamma$** -Expression
8. Immunhistochemische Analyse der **RIG-I**-Expression
9. Immunhistochemische Analyse der **SIRT-1**-Expression

Neben der Funktion als prognostische Marker könnten die Antigene als Angriffspunkte für medikamentöse Therapien dienen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>
0.1M Zitronensäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)	1.002444.0500
0.1M Na-Citrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)	1.06448.1000
Aqua destillata	Firma Noll (München, Deutschland)	
Aquatex	Merck (Darmstadt, Deutschland)	
Blocking Serum	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)	
DAB+ (3,3Diaminobenzidin; Liquid DAB+ Substrate Chromogen System)	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)	K3468
DAKO Verdünnungsmedium	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)	S3022
Detektionssystem MACH 3 Mouse AP Polymer Detection	Biocare (Pacheco, CA, USA)	M3M532
Epitope Retrieval Solution pH8	Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK)	RE7116
Ethanol (100 %, 70 %, 50 %)	CLN GmbH (Langenbach, Deutschland)	
Haematoxylin Gill's Formula	Vector Lab (Burlingame, CA, USA)	H-3401
ImmPRESS Anti-Mouse IgG Polymer Kit	Vector Lab (Burlingame, CA, USA)	MP-7402
ImmPRESS Anti-Rabbit IgG Polymer Kit	Vector Lab (Burlingame, CA, USA)	MP-7401
Methanol	Sigma Aldrich (St. Louis, Mississippi, USA) / Merck (Darmstadt, Deutschland)	
Mounting medium for fluorescence mit DAPI	Vector Lab (Burlingame, CA, USA)	Vectashield H-1200



Roti-Mount	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	HP68.1
Roticlear	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	A538
Saures Hämalaun	Sigma Aldrich (St. Louis, Mississippi, USA) / Merck (Darmstadt, Deutschland)	
Steriles PBS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	
Target Retrieval Solution	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)	S1699
Target Retrieval Solution Citrate pH6	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)	S2369
TRIS-Puffer	Sigma Aldrich (St. Louis, Mississippi, USA) / Merck (Darmstadt, Deutschland)	
UltraVision-Protein-Block (Ultra-V-Block)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	TA-060-PBQ
Vector Red Substrate Kit	Vector Lab (Burlingame, CA, USA)	SK-5100
ZytoChem Plus HRP Polymer Systems (Mouse/Rabbit)	Zytomed Systems GmbH (Berlin, Deutschland)	POLHRP-100

Tabelle 8: Auflistung verwendeter Chemikalien

## 4.1.2 Hergestellte Verdünnungen, Puffer und Lösungen

Hergestellte Chemikalie	Inhalt
3%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6ml 30%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 194ml Methanol
Lösung A	21.01g 0.1M Citronensäure in 1 Liter Aqua dest
Lösung B	29.41g 0.1M Na-Citrat in 1 Liter Aqua dest
Na-Citratpuffer (pH 6.0)	18ml Lösung A + 82 ml Lösung B + 900ml Aqua dest

Tabelle 9: Auflistung selbst hergestellter Mixturen aus Chemikalien aus Tabelle 1

4.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Abzug	SR Medizintechnik GmbH (München, Deutschland)
Beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus)	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Brutschrank	IGLER (München, Deutschland)
Deckgläser Menzel	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Einbettungsautomat Citadel 2000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Eisfach -20°C	Robert Bosch GmbH (Stuttgart, Deutschland)
Formalin	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kamera - Immunhistochemie (Flexacam C1)	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Kühlplatte	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Kühlschrank -4°	Robert Bosch GmbH (Stuttgart, Deutschland)
Kühlschrank -70°C	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Mikroskop – Immunfluoreszenz	Axiophot, Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop - Immunhistochemie	Leitz (Wetzlar, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Schlittenmikrotom	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Schnellkochtopf	Fissler (Idar-Oberstein, Deutschland)
Vortex „mini spin“	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Waage (AE 100)	Mettler Toledo (Columbus, OH, USA)
Zentrifuge (Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 10: Auflistung verwendeter Geräte und Materialien

4.1.4 Softwares

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
Microsoft Power Point 2021	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Software-Immunfluoreszenz	AxioVision 4.8.1 Image Capture for Fluorescent Dyes
SPSS 26	PASW Statistic, SPSS Inc., IBM, IL, USA

Tabelle 11: Auflistung verwendeter Softwares

4.1.5 Primärantikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Spezies Isotyp	Firma	Konzentration	Verdünnung	DAB+
<b>CCL22</b>	Rabbit IgG, polyklonal	Peprotech 500-P107	1mg/ml	1:400	1 Minute
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Rabbit IgG, polyklonal	Abcam ab59256	1mg/ml	1:100	30 Sekunden
<b>FoxP3</b>	Mouse IgG monoklonal 236A/E7	Abcam ab20034	1mg/ml	1:60	20 Minuten (Vector Red Substrate Kit)
<b>RIG-I</b>	Mouse IgG	LSBio LS- C344928	1mg/ml	1:100	3 Minuten
<b>SIRT-1</b>	Rabbit IgG, polyklonal	Sigma Aldrich HPA006295	0,2mg/ml	1:250	3 Minuten

Tabelle 12: Auflistung verwendeter Primärantikörper für die Immunhistochemie

4.1.6 Antikörper und Fluorochrome für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Spezies Isotyp	Firma	Konzentration	Verdünnung in DAKO
<b>CCL22</b>	Rabbit IgG, polyklonal	Peprotech 500-P107	1 mg/ml	1:400
<b>CD68 (1.)</b>	Mouse IgG, monoklonal	Sigma Aldrich AMAb90874	0,1 mg/ml	1:500
<b>CD68 (2.)</b>	Rabbit IgG, polyklonal	Sigma Aldrich HPA048982	0,5 mg/ml	1:1000
<b>FoxP3</b>	Mouse IgG1, monoklonal, 236A/E7	Invitrogen 14-4777-82	0,5 mg/ml	1:50
<b>Goat-Anti- Mouse Alexa Fluor 488 Goat-anti- mouse (wie Cy 2)*</b>	Goat IgG, polyklonal	Dianova 115-545-062	1,5 mg/ml	1:100

<b>Goat-Anti-Rabbit Cy3*</b>	Goat IgG, polyklonal	Dianova 111-165-144	1,5 mg/ml	1:500
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Rabbit IgG, polyklonal	Abcam ab59256	1 mg/ml	1:500

Tabelle 13: Auflistung verwendeter Antikörper für die Doppelimmunfluoreszenz

\*Sekundärantikörper

## 4.2 Patientinnenkollektiv

Zunächst wurden 169 Patientinnen, die sich wegen eines auffälligen Pap-Abstriches im Sinne einer Pap IIID, IVa oder IVb zwischen 2002 und 2019 mindestens zweimal in der Dysplasiesprechstunde der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgestellt hatten, identifiziert. Bei allen Patientinnen wurde mindestens zweimal eine histologische Sicherung durchgeführt, die von gynäkologischen Pathologen bezüglich des CIN-Grades beurteilt wurde. Entsprechend der vorliegenden Histologie wurden die Patientinnen folgenden Gruppen zugeteilt: 37 Patientinnen mit CIN I, 47 Patientinnen mit CIN II und histologisch gesicherter Regression, 49 Patientinnen mit CIN II und gesicherter Progression, 36 Patientinnen mit CIN III (Vattai et al., 2021).

Etwaige anamnestische Zusatzdaten wie Alter, Follow-Up-Untersuchungen, HPV-Status, Vorerkrankungen, Voroperationen, Medikamenteneinnahme oder zum Zeitpunkt der Biopsie bestehende Schwangerschaft wurden der Patientenakte entnommen. Das mittlere Follow-Up-Intervall betrug 5 Monate mit einer Spannweite von 1-27 Monaten. Das mittlere Alter der Patientinnen betrug 31 Jahre mit einer Spannweite von 18-58 Jahren. Als Regression der Dysplasie wurde eine Dynamik von CIN II zu CIN I oder unauffälligem Befund definiert. Als Progression wurde eine Dynamik von einer CIN II zu einer CIN III oder zu einem Carcinoma in situ definiert. Alle Patientinnen wurden bei Erstvorstellung in der Klinik HPV-positiv getestet (Hybrid capture 2, Quiagen) (Vattai et al., 2021).

Nach ausführlicher Aufklärung aller Patientinnen wurde ein schriftliches Einverständnis eingeholt. Alle Verfahren entsprachen den ethischen Standards des institutionellen Forschungsausschusses sowie der Helsinki-Erklärung von 1964 und ihren späteren Änderungen oder vergleichbaren ethischen Standards

(Vattai et al., 2021). Das Studiendesign wurde von der örtlichen Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt (Referenznummer: 167-14).

### 4.3 Aufbereitung der Paraffinschnitte

Die routinemäßig entnommenen Gewebeproben der CIN-Patientinnen wurden in 4%igem Formalin für 24h bei Raumtemperatur fixiert. Es erfolgte die Passage einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Dehydrierung des Gewebes mit anschließender Gabe der Schnitte in Xylol sowie in 60°C warmes flüssiges Paraffin. Die hergestellten Gewebeblöcke wurden auf einer Kühlplatte abgekühlt, um danach mit einem Mikrotom Schnitte einer Dicke von 1µm anzufertigen. Schließlich wurden die Schnitte auf Objektträgern aufgezogen und für 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Die ungefärbten Gewebeschnitte des Patientinnenkollektivs wurden vom Pathologischen Institut der LMU zur Verfügung gestellt (Vattai et al., 2021).

### 4.4 Immunhistochemie

**FoxP3, RIG-I sowie SIRT-1:** Die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden zunächst für 30 Minuten in Roticlear entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Es folgte eine Hitzevorbehandlung der Schnitte in der Mikrowelle bei 750 Watt für 2x15 Minuten (Target Retrieval Solution (FoxP3); Epitope Retrieval Solution (RIG-I); Target Retrieval Solution Citrate pH6 (SIRT-1). Anschließend wurden die Schnitte in TRIS-Puffer (pH 7,5) gespült. Die Blockierung der endogenen Peroxidasen erfolgte für 10 Minuten in 7,5%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bevor zwei weitere Waschschrte in Leitungswasser sowie in TRIS-Puffer folgten. Anschließend wurden mittels Blocking Serum elektrostatische Ladungen, die zu unspezifischen Anfärbungen führen könnten, im Gewebe abgesättigt. Danach wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Tabelle 12) inkubiert. Es erfolgte erneut ein Waschvorgang in TRIS-Puffer. Folgende Detektionskits wurden verwendet: MACH 3 Mouse AP Polymer Detection (FoxP3); ImmPRESS Anti-Mouse IgG Polymer Kit (RIG-I); ImmPRESS Anti-Rabbit IgG Polymer Kit (SIRT-1). Anschließend folgte die Substratfärbung mit

DAB+ Substrate Chromogen System bzw. Vector Red Substrate Kit (FoxP3). Die hierfür gültigen Zeitangaben finden sich in Tabelle 12. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von destilliertem Wasser gestoppt. Schließlich wurden die Schnitte 10 Sekunden lang mit Haematoxylin Gill's Formula gegengefärbt und für 5 Minuten in Leitungswasser gebläut. Es erfolgte eine Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe. Zuletzt wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt. Proben von Lymphknotengewebe (FoxP3 und SIRT-1) bzw. von Pankreaskarzinomgewebe (RIG-I) wurden zur Positiv- und Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) verwendet (Vattai et al., 2021).

**CCL22 und PPAR $\gamma$** : Die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden zunächst für 20 Minuten in Roticlear entparaffiniert. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen durch eine 20-minütige Inkubation in 3 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol. Die Schnitte wurden nun mittels einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 75 %, 50 %, destilliertes Wasser) rehydriert, bevor sie für 6 Minuten im Schnellkochtopf (Natriumcitratpuffer pH 6: 18ml Lösung A, 82 ml Lösung B) gekocht wurden, um die Antigene zu demaskieren. Die Schnitte wurden danach in destilliertem Wasser gespült und zweimal in PBS (pH=7,4) gewaschen. Anschließend wurden für 5 Minuten mittels Reagenz 1 (ZytoChemPlus HRP Polymer System) elektrostatische Ladungen, die zu unspezifischen Anfärbungen führen könnten, im Gewebe abgesättigt. Danach wurden die Schnitte für 16 Stunden bei 4°C mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Tabelle 12) inkubiert. Es erfolgte erneut ein Waschvorgang in PBS; danach wurden die Schnitte mit einem Post Block (Reagent 2, 20 Minuten), sowie dem HRP-Polymer (Reagent 3, 30 Minuten) inkubiert, bevor sie erneut in PBS gewaschen wurden. Anschließend folgte die Substratfärbung mit DAB+ Substrate Chromogen System. Die hierfür gültigen Zeitangaben finden sich in Tabelle 12. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von destilliertem Wasser gestoppt. Schließlich wurden die Schnitte 2 Minuten lang mit Haemalaun gegengefärbt und für 5 Minuten in Leitungswasser gebläut. Es erfolgte eine Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe. Zuletzt wurden die Schnitte mit RotiMount eingedeckt. Proben von Plazentagewebe (CCL22) bzw. Vaginalepithel (PPAR $\gamma$ ) wurden zur Positiv- und Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) verwendet (Vattai et al., 2021).

## 4.5 Doppelimmunfluoreszenz

Mithilfe von Doppelimmunfluoreszenzfärbungen können zwei Antigene gleichzeitig sichtbar gemacht werden, indem mit Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper spezifisch an zwei verschiedene Primärantikörper unterschiedlicher Spezies binden. Zur Visualisierung und Charakterisierung der CCL22-exprimierenden Zellen wurden Doppelimmunfluoreszenzen wie folgt durchgeführt:

Die Schnitte wurden durch eine 20-minütige Inkubation in Roticlear entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert, in einem Natriumcitratpuffer (pH = 6,0, bestehend aus 18ml Lösung A und 82 ml Lösung B) 5 Minuten lang zur Antigendemaskierung gekocht und zweimal in PBS gewaschen. Eine Blockierungslösung, der Ultra-Vision-Block, wurde für 5 Minuten hinzugefügt, um die unspezifischen Bindungsstellen des Primärantikörpers zu blockieren. Die Schnitte wurden über Nacht (16 h) bei 4 °C entweder mit

- a) CD68 (1.) und CCL22;
- b) CD68 (1.) und PPAR; oder
- c) CD68 (2.) und FoxP3 inkubiert (siehe Tabelle 13).

Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Sekundärantikörper (polyklonal Cy-2- und polyklonal Cy-3-konjugierte Antikörper, siehe Tabelle 13) für 30 Minuten bei Raumtemperatur hinzugefügt. Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper wurden in DAKO Verdünnungsmedium nach Schema (siehe Tabelle 13) verdünnt. Die luftgetrockneten Proben wurden mit Mounting medium for fluorescence mit DAPI eingedeckt (Vattai et al., 2021).

## 4.6 Auswertung

**Immunhistochemie:** Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung wurden zweimal von unabhängigen Beobachtern unter Verwendung eines Leitz-Mikroskops (Wetzlar, Deutschland; Typ 307-148.001 514686) analysiert. Die Quantifizierung der Antigenexpression erfolgte anhand des semiquantitativen immunreaktiven Scores (IRS) von Remmele und Stegner, welcher zwei Parameter berücksichtigt: Erstens die Farbintensität (Staging Intensity = SI), die Werte zwischen 0 = keine Färbereaktion, über 1 = schwache Färbereaktion und

2 = mäßige Färbereaktion bis 3 = starke Färbereaktion annehmen kann. Darüber hinaus berücksichtigt der IRS den Prozentsatz der Zellen, die das gesuchte Antigen exprimieren. Der Prozentsatz positiver Zellen kann Werte zwischen 0 = keine positiven Zellen, 1 = <10 % positive Zellen, über 2 = 10-50 % positive Zellen und 3 = 51-80 % positive Zellen bis 4 = >80 % positive Zellen annehmen. Der IRS-Score errechnet sich aus dem Produkt der beiden genannten Parameter. Dies führt zu einer Skala von 0-1 (keine Expression) bis 12 (sehr hohe Expression) (Remmele und Stegner, 1987). Darüber hinaus wurden bei entsprechenden Fragestellungen (vgl. Kapitel 5) die Anzahl der Antigen-positiven Zellen in einer 10x-Vergrößerung in drei verschiedenen Gesichtsfeldern pro Schnitt gezählt und die Mittelwerte berechnet. Fotos wurden mit der Flexacam C1-Kamera von Leica aufgenommen (Vattai et al., 2021).

**Doppelimmunfluoreszenz:** Die Doppelimmunfluoreszenz wurde mit dem Axioskop-Fluoreszenzphotomikroskop analysiert. Dies gibt mit einer Quecksilberlampe Lichtspektren bestimmter Wellenlängen ab, welche die verschiedenen Fluorochrome jeweils zur Fluoreszenz in ihrer charakteristischen Farbe anregen.

Pro Schnitt wurden 5 Gesichtsfelder ausgezählt (20x Linse, 40x Linse) und anschließend die Verhältnisse zwischen Einfach- und Doppelantigenexpression berechnet. Fotos wurden mit dem AxioCam-Kamerasystem aufgenommen (Vattai et al., 2021).

### 4.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit SPSS 26 durchgeführt. Unter Verwendung des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Rang-Summen-Tests und des Mann-Whitney-U-Tests wurden die Expressionen der immunhistochemisch analysierten Marker zwischen den verschiedenen Gruppen verglichen. Um die Korrelation zwischen der CCL22-Expression und der FoxP3-Expression sowie die Korrelation zwischen FoxP3-positiven Zellen im Epithel und im Stroma zu analysieren, wurde die Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Grafiken wurden mit SPSS 26 und Microsoft Power Point 2021 entworfen (Vattai et al., 2021).



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Dysplasiegehalt und Auswertbarkeit der Schnitte

Ursprünglich wurden 169 Patientinnen rekrutiert und in die Studie eingeschlossen. Auf den 169 histologischen Präparaten war in 20 Fällen kein Epithel oder keine Dysplasie vorhanden; der Verlust an auswertbaren Fällen war gleichmäßig auf die verschiedenen Gruppen aufgeteilt. Tabelle 14 fasst die Anzahl der Studienteilnehmer in den verschiedenen Gruppen zusammen.

<i>Dysplasiegrad</i>	<i>N=Ursprünglich</i>	<i>N=Verlust</i>	<i>N=Auswertbare Schnitte</i>
CIN I	37	8	29
CIN II mit Regression	47	1	46
CIN II mit Progression	49	7	42
CIN III	26	4	32
	<b>169</b>	<b>20</b>	<b>149</b>

Tabelle 14: Übersicht über die Zusammensetzung des untersuchten Patientinnenkollektives.

### 5.2 FoxP3-positive Zellen (Tregs) (vgl. Vattai et al., 2021)

In zahlreichen Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass eine hohe Infiltrationsrate FoxP3-positiver Tregs mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist (Fu et al., 2019). In der nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchung sollte die Infiltrationsdichte FoxP3-positiver Zellen in der zervikalen Dysplasie genauer beschrieben werden. Des Weiteren sollte evaluiert werden, ob die Anzahl FoxP3-positiver Zellen in CIN II mit anschließender Progression signifikant höher ist als in den regredienten Fällen. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Zellzahlen auf eine 10x-Vergrößerung.

#### 5.2.1 FoxP3-positive Zellen in der zervikalen Dysplasie

FoxP3 wurde ausschließlich nukleär exprimiert. Positiv angefärbte Zellen waren hauptsächlich im Dysplasie-umgebenden Stroma lokalisiert. Es war auffällig, dass die FoxP3-positiven Zellen in unmittelbarer Nähe jener Epithelabschnitte lokalisiert waren, welche die am weitesten fortgeschrittenen Zelltypen aufwiesen. Insgesamt wiesen 122 Schnitte eine FoxP3-Expression auf, was einen Anteil von 83 % der Schnitte ausmacht. 25 Schnitte waren FoxP3-negativ. Dies entspricht 17 % der Proben. Der errechnete Mittelwert der FoxP3-positiven

## Ergebnisse

Zellen pro Gesichtsfeld belief sich auf 17,04 (Standardabweichung 14,79). Die Spannweite betrug 0 bis 76 positive Zellen pro Gesichtsfeld. Darüber hinaus konnte in der knappen Hälfte der Schnitte (44,2 %) eine Infiltration FoxP3-positiver Zellen im dysplastischen Epithel festgestellt werden. Der Mittelwert der FoxP3-positiven Zellen pro Gesichtsfeld belief sich hierbei auf 1,82 (Standardabweichung 3,63).

### 5.2.2 FoxP3-Expression in CIN I-III

Die Anzahl FoxP3-positiver Zellen nahm mit höheren Dysplasiegraden zu, wie Abbildung 6 zeigt. Während bei CIN I-Patientinnen der Mittelwert 6,06 Zellen pro Gesichtsfeld (Standardabweichung 6,89) betrug, wurden 17,92 Zellen pro Gesichtsfeld in der CIN II (Standardabweichung 12,52) und 23,75 Zellen in der CIN III (Standardabweichung 19,69) nachgewiesen. Die p-Werte beliefen sich auf  $<0,001$  für CIN I vs. CIN II und 0,227 für CIN II vs. CIN III (Mann-Whitney-U-Test). In Abbildung 7 sind repräsentative Bildaufnahmen der immunhistochemischen FoxP3-Färbung aller CIN-Grade sowie Positiv- und Negativkontrolle gezeigt.

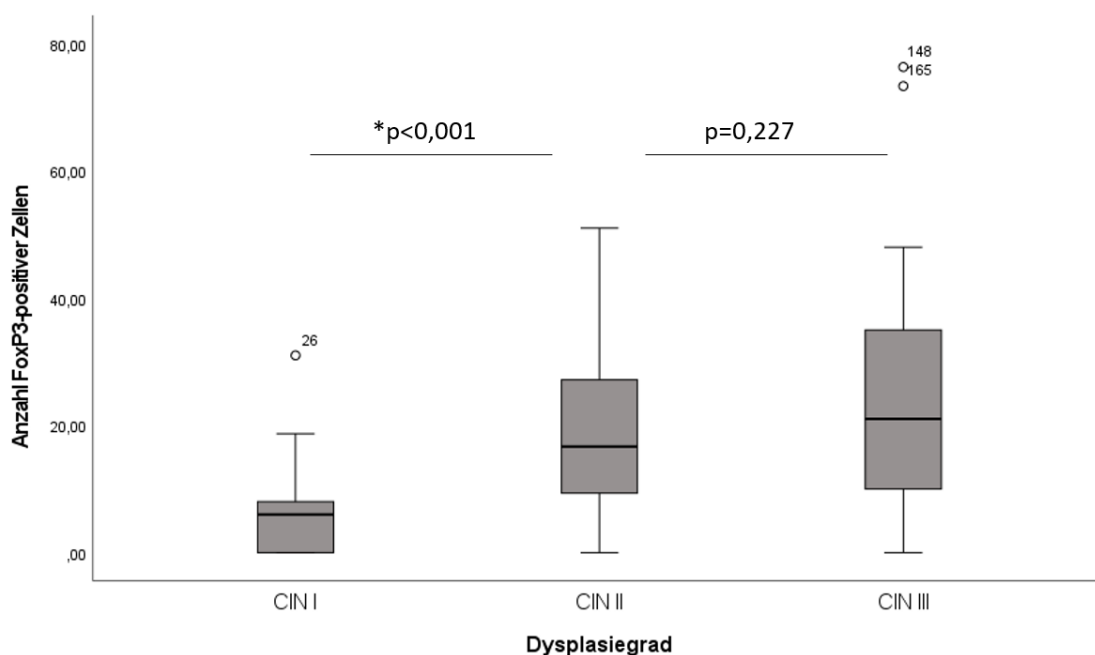


Abbildung 6: Anzahl FoxP3-positiver Zellen in den Dysplasiegraden CIN I-III.

Dargestellt sind Boxplots zur Anzahl FoxP3-positiver Zellen in den verschiedenen Dysplasiegraden. Die Auswertung basierte auf immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Zervix (Vgl. Vattai et al., 2021).

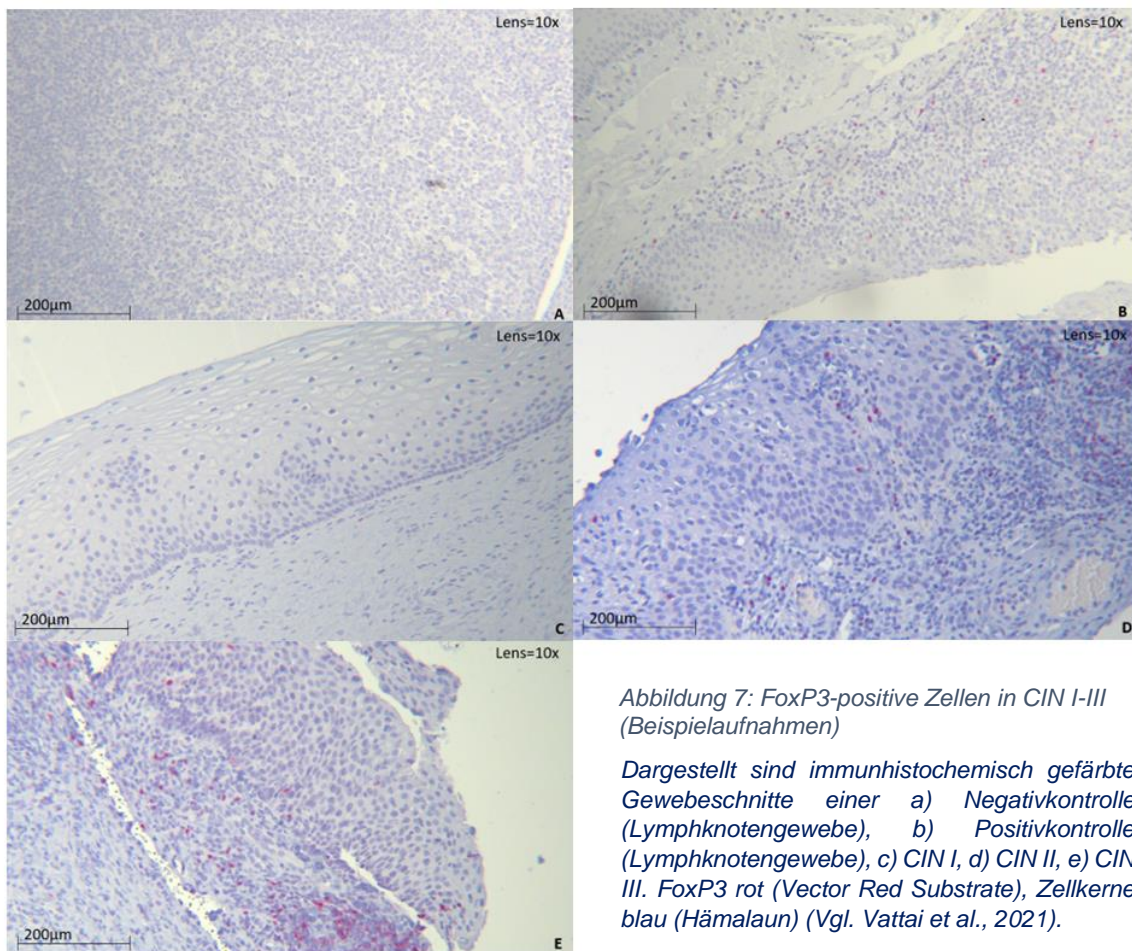


Abbildung 7: FoxP3-positive Zellen in CIN I-III (Beispielaufnahmen)

Dargestellt sind immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte einer a) Negativkontrolle (Lymphknotengewebe), b) Positivkontrolle (Lymphknotengewebe), c) CIN I, d) CIN II, e) CIN III. FoxP3 rot (Vector Red Substrate), Zellkerne blau (Hämalaun) (Vgl. Vattai et al., 2021).

### 5.2.3 FoxP3-Expression in Regression und Progression der CIN II

Um Aussagen darüber treffen zu können, ob Unterschiede hinsichtlich der FoxP3-Expression in Regression und Progression der CIN II vorliegen, wurde die Gruppe der CIN II-Patientinnen in zwei Untergruppen aufgeteilt; Patientinnen mit histologisch gesicherter Regression und Patientinnen mit histologisch gesicherter Progression der Dysplasie. Die FoxP3-Expression in den beiden Gruppen stellt Abbildung 8 in Form von Boxplots dar. Bei Patientinnen mit regredientem Krankheitsverlauf betrug der Mittelwert 13,9 Zellen pro Gesichtsfeld (Standardabweichung 8,44), während für CIN II-Patientinnen mit progredientem Krankheitsverlauf ein Mittelwert von 22,21 (Standardabweichung 14,69) errechnet wurde. Dies ist ein signifikant höherer Wert als in der Gruppe der regredienten Krankheitsverläufe (Mann-Whitney-U-Test,  $p=0,003$ ). Exemplarische Aufnahmen für die FoxP3-Färbung in Regression und Progression der CIN II sind in Abbildung 9 gezeigt.

## Ergebnisse

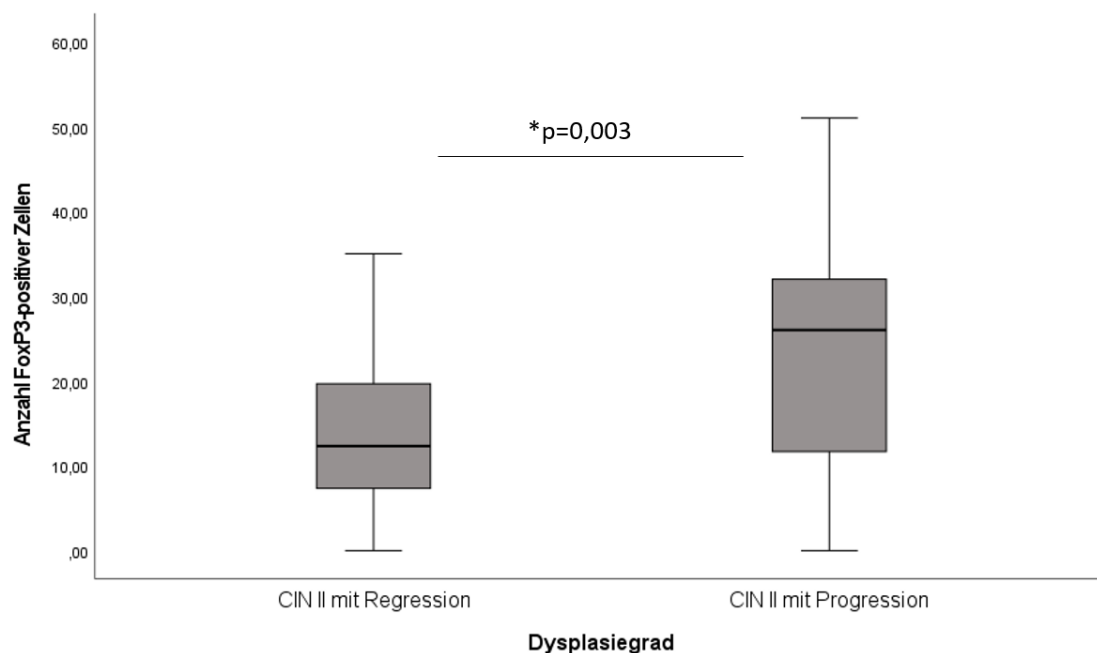


Abbildung 9: Anzahl FoxP3-positiver Zellen in Regression und Progression der CIN II.

Dargestellt sind Boxplots zur Anzahl FoxP3-positiver Zellen in CIN II mit anschließender Regression und in CIN II mit anschließender Progression. Die Auswertung basierte auf immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Zervix. (Vgl. Vattai et al., 2021).

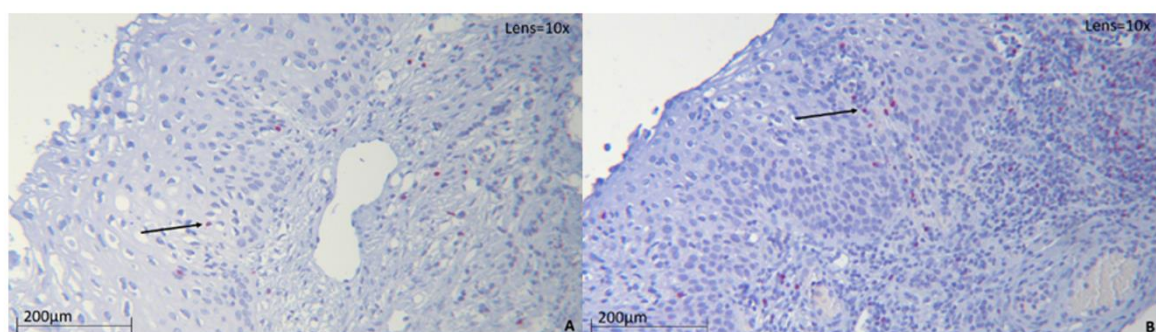


Abbildung 8: FoxP3-positive, Epithel-infiltrierende Zellen in Regression und Progression der CIN II (Beispielaufnahmen)

Dargestellt sind immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte einer a) CIN II mit anschließender Regression und b) CIN II mit anschließender Progression. FoxP3 rot (Vector Red Substrate), Zellkerne blau (Hämalaun). Die Pfeile markieren beispielhaft FoxP3-positiv Zellen (Vgl. Vattai et al., 2021).

### 5.2.4 FoxP3-positive Zellen im dysplastischen Epithel

In 44,2 %, d.h. in 65 Fällen, konnte eine Infiltration FoxP3-positiver Zellen im dysplastischen Epithel festgestellt werden (in 21 % der CIN I, in 49 % der CIN II mit regredientem Verlauf, in 79 % der CIN II mit progredientem Verlauf und in 73 % der CIN III-Schnitte). Die Anzahl dieser eingewanderten Zellen war mit einem Mittelwert von 1,82 Zellen pro Gesichtsfeld sehr gering. Es war jedoch zu beobachten, dass es hierbei einen signifikanten Unterschied zwischen der Regressions- und der Progressionsgruppe gab: Für erstere wurde ein Mittelwert

## Ergebnisse

von 1,51 Zellen pro Gesichtsfeld berechnet (Standardabweichung 2,22); in letzterer Gruppe fanden sich mehr als doppelt so viele FoxP3-positive Zellen im Epithel; hier waren es im Mittel 3,38 Zellen pro Gesichtsfeld (Standardabweichung 4,45). Der Mann-Whitney-U-Test ergab für den Unterschied zwischen den Gruppen einen p-Wert von 0,022. Abbildung 10 verdeutlicht die vorliegenden Ergebnisse in Form von Boxplots. Beispielhafte Aufnahmen sind in Abbildung 9 gezeigt.

Die Spearman-Analyse ergab, dass die Rate der FoxP3-positiven Zellen im Epithel positiv mit der Gesamtanzahl der FoxP3-positiven Zellen korreliert ist (Spearman's Rho 0,675;  $p < 0,01$ ).

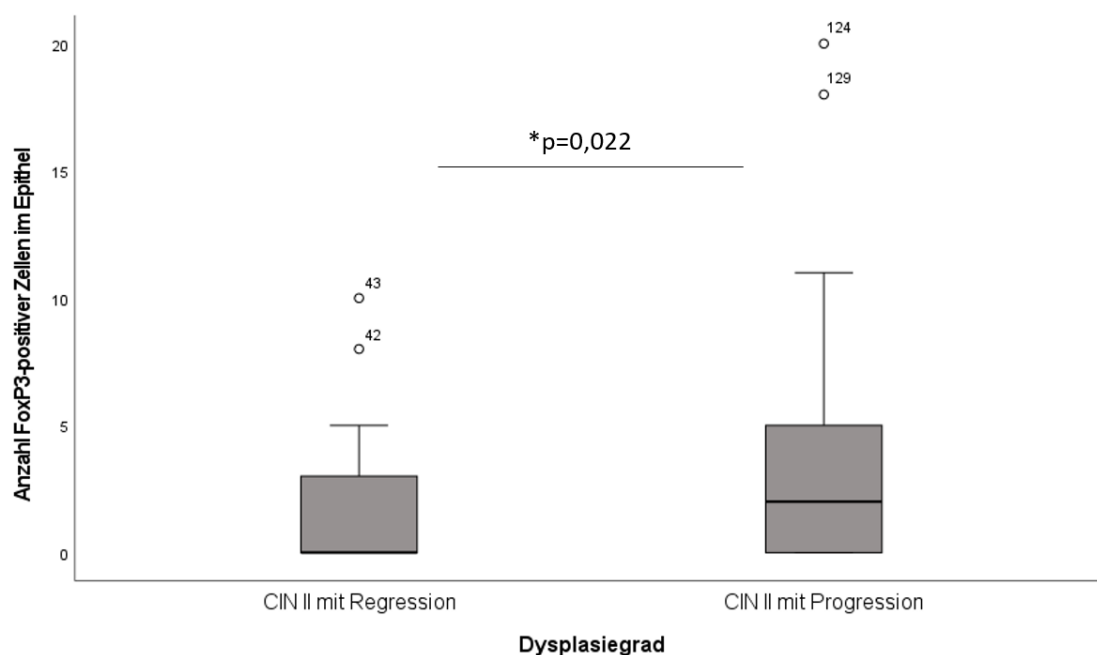


Abbildung 10: Anzahl FoxP3-positiver Zellen im Epithel in Regression und Progression der CIN II.

Dargestellt sind Boxplots zur Anzahl FoxP3-positiver Zellen im Epithel in CIN II mit anschließender Regression und CIN II mit anschließender Progression. Die Auswertung basierte auf immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Zervix (Vgl. Vattai et al., 2021).

### 5.3 CCL22 (vgl. Vattai et al., 2023)

CCL22 gilt als entscheidendes Chemokin, dass Tregs zur Einwanderung anlockt (Curiel et al., 2004). In verschiedenen Tumorentitäten wurde bereits gezeigt, dass eine erhöhte CCL22-Expression mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist (Li et al., 2013). Um die Expression von CCL22 in den verschiedenen CIN-Graden genauer darzustellen, wurde eine

## Ergebnisse

immunhistochemische Analyse durchgeführt. Hierbei war zwischen einer Färbung im dysplastischen Epithel selbst und einzelnen stark CCL22-positiven Zellen im Stroma zu differenzieren. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die ermittelten Zellzahlen auf eine 10x-Vergrößerung.

### 5.3.1 Epitheliale CCL22-Expression in CIN I-III

Insgesamt zeigten 134 (88 %) der Schnitte eine CCL22-Expression im dysplastischen Epithel. 18 Schnitte (12 %) waren CCL22-negativ. Die epitheliale CCL22-Expression nahm mit Anstieg des Dysplasiegrades zu. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 in Form von Boxplots dargestellt. Während der IRS (vgl. Kapitel 4.6) für die CCL22-Expression in CIN I im Mittel 2,69 betrug (Standardabweichung 2,71), belief sich der IRS in CIN II auf 6,48 (Standardabweichung 3,79) und in CIN III auf 6,56 (Standardabweichung 3,43). Der Mann-Whitney-U-Test zeigte zwischen CIN I und CIN II einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ).

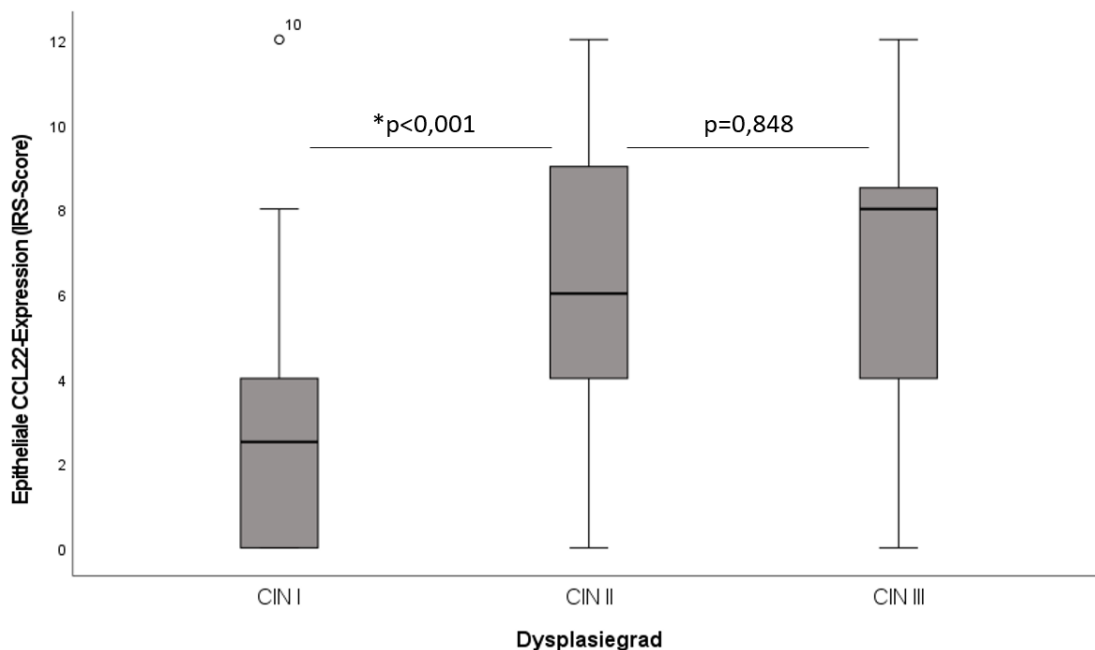


Abbildung 11: Immunreaktiver Score der CCL22-Expression in den Dysplasiegraden CIN I-III.

Dargestellt sind Boxplots zum Immunreaktiven Score (IRS) CCL22-positiven Epithels in den verschiedenen Dysplasiegraden. Die Auswertung basierte auf immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Zervix (Vgl. Vattai et al., 2023).

## Ergebnisse

5.3.2 Epitheliale CCL22-Expression in Regression und Progression der CIN II  
Anschließend wurden Unterschiede in der CCL22-Expression zwischen den CIN II-Patientinnen mit regredientem Verlauf und jenen mit progredientem Verlauf analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 gezeigt. In der Gruppe regredienter Krankheitsverläufe betrug der IRS im Mittel 5,51 (Standardabweichung 3,53), während er in den progredienten Krankheitsverläufen im Durchschnitt 7,59 (Standardabweichung 3,83) betrug. Der Mann-Whitney-U-Test zeigte hierfür einen signifikanten Unterschied an ( $p=0,006$ ).

Zu vermerken ist, dass der mittlere IRS in CIN II mit Progression mit 7,59 höher war als der mittlere IRS der CIN III-Gruppe, welcher 6,56 betrug.

Abbildung 13 zeigt repräsentative Fotos der epithelialen CCL22-Expression in allen Gruppen sowie Positiv- und Negativkontrolle.

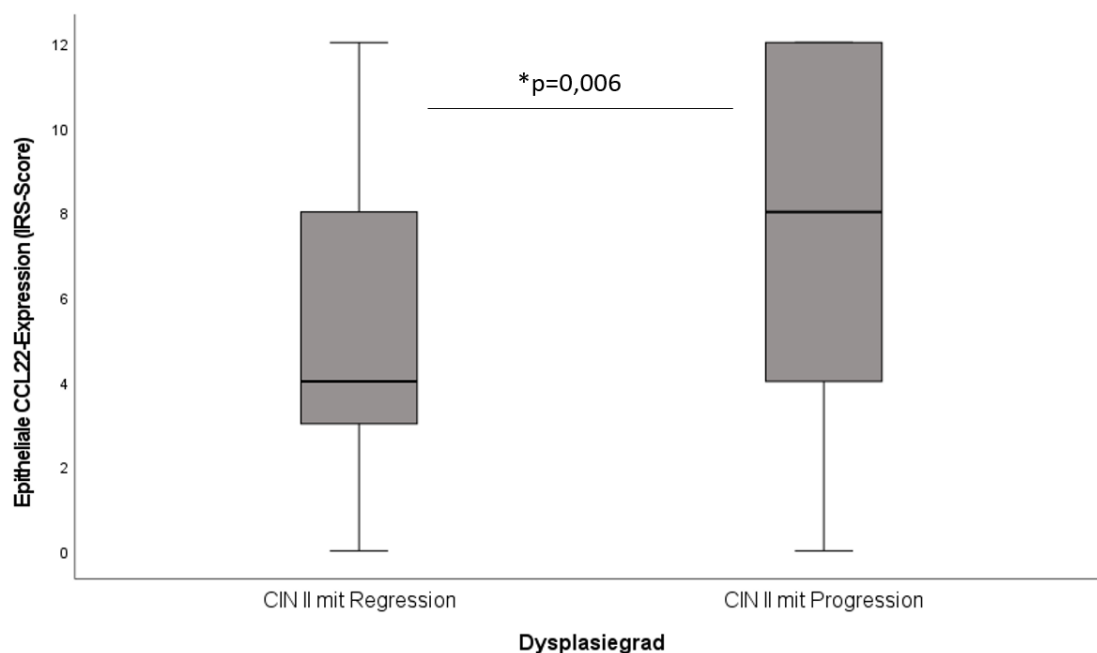


Abbildung 12: Immunreaktiver Score der CCL22-Expression in Regression und Progression der CIN II.

Dargestellt sind Boxplots zum Immunreaktiven Score (IRS) CCL22-positiven Epithels in CIN II mit anschließender Regression und CIN II mit anschließender Progression. Die Auswertung basierte auf immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Zervix (Vgl. Vattai et al., 2023).

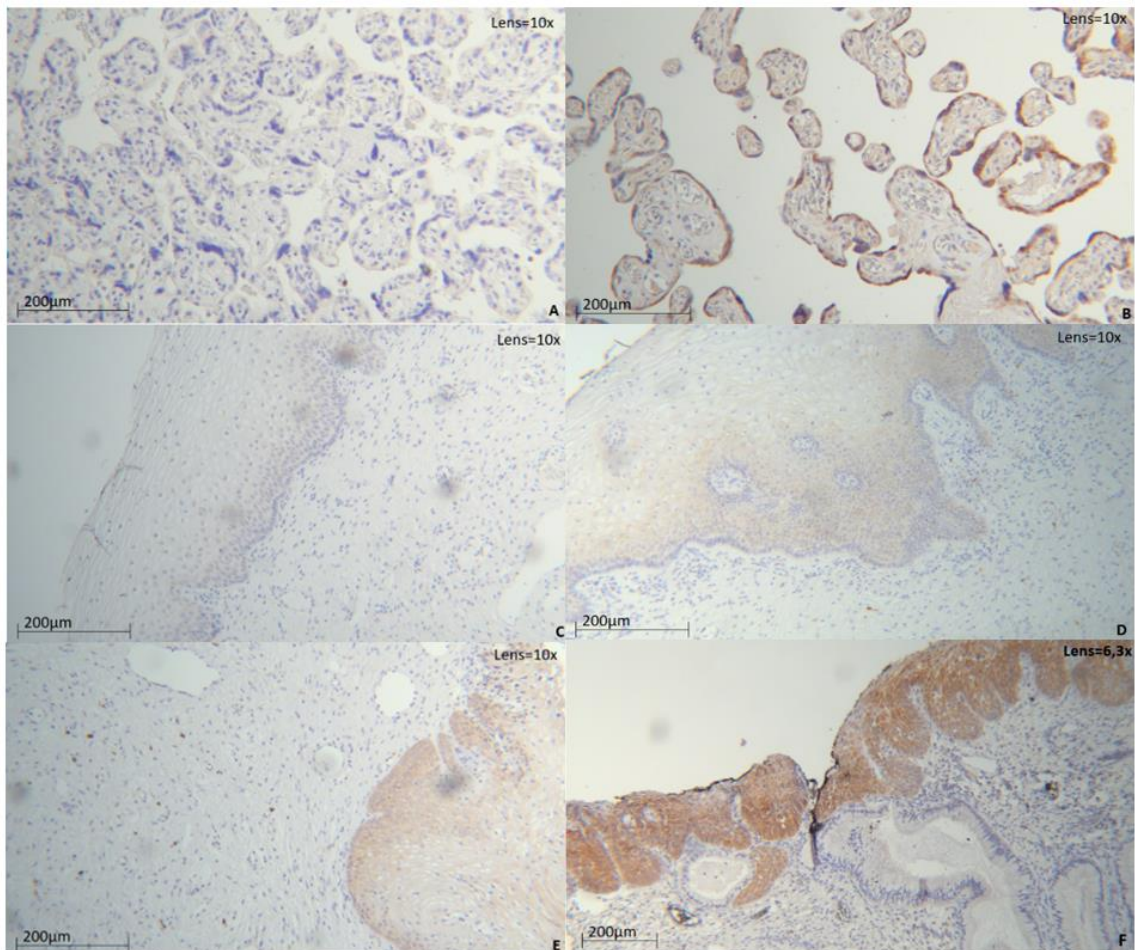


Abbildung 13: CCL22-Expression in CIN I-III sowie Regression und Progression der CIN II (Beispielaufnahmen)

Dargestellt sind immunohistochemisch gefärbte Gewebeschnitte einer a) Negativkontrolle (Plazenta), b) Positivkontrolle (Plazenta), c) CIN I, d) CIN II mit anschließender Regression, e) CIN II mit anschließender Progression, f) CIN III. CCL22 braun (DAB), Zellkerne blau (Hämalaun) (Vgl. Vattai et al., 2023).

### 5.3.3 CCL22-positive Zellen in Dysplasie-umgebenden Stroma

In 52 Fällen (34 %) waren im Dysplasie-umgebenden Stroma einzelne stark CCL22-positive Zellen zu finden. Die Zellen waren rund-oval geformt und wiesen bei starker Vergrößerung ein breites Zytoplasma auf, in welchem sich die CCL22-Färbung granulärer Form zeigte (siehe Abbildung 14).

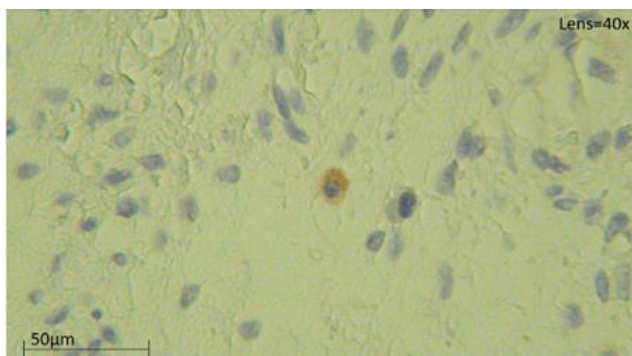


Abbildung 14: CCL22-positive Zelle im Dysplasie-umgebenden Stroma.



## Ergebnisse

### 5.3.4 CCL22-positive Zellen in Dysplasie-umgebenden Stroma: CIN I-III

Einzelne stark positive CCL22-positive Zellen waren zu finden in

- 18 % der CIN I
- 30 % der CIN II
- 47 % der CIN III.

Repräsentative Fotos hierfür finden sich in Abbildung 16.

Der Mittelwert der CCL22-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in der CIN I betrug 1,46 (Standardabweichung 4,23), in der CIN II waren es 6,95 (Standardabweichung 14,4) und in der CIN III 9,96 Zellen pro Gesichtsfeld (Standardabweichung 17,25). Der Mann-Whitney-U-Test ergab p-Werte von 0,116 (CIN I vs. CIN II) und 0,061 (CIN II vs. CIN III). Es ist ein Trend zu höheren Werten mit Zunahme des Dysplasiegrades zu vermerken (vgl. Abbildung 15).

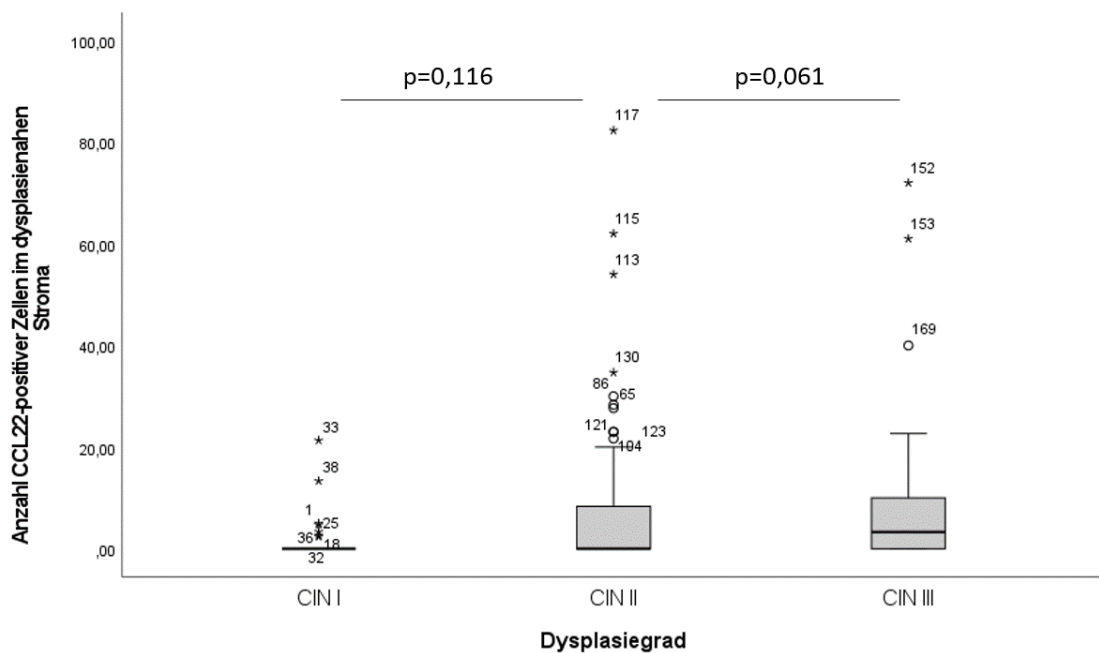


Abbildung 15: Anzahl CCL22-positiver Zellen im Dysplasie-umgebenden Stroma CIN I-III.

Dargestellt sind Boxplots zur Anzahl CCL22-positiver Zellen in den verschiedenen Dysplasiegraden. Die Auswertung basierte auf immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Zervix (Vgl. Vattai et al., 2023).

## Ergebnisse

### 5.3.5 CCL22-positive Zellen in Dysplasie-umgebenden Stroma: Regression und Progression der CIN II

26 % der CIN II mit Regression und 33 % der CIN II mit Progression zeigten einzelne stark CCL22-positive Zellen im Dysplasie-umgebenden Stroma. Im Mittel waren es 13,46 (Standardabweichung 9,09) positive Zellen pro Gesichtsfeld in den regredienten Fällen und 28,16 (Standardabweichung 21,59) positive Zellen pro Gesichtsfeld in den progredienten Fällen (vgl. Abbildungen 17 und 18 auf Seite 47). Der Mann-Whitney-U-Test zeigt einen p-Wert von  $p=0,159$  an, wenn alle Fälle berücksichtigt wurden. Wurden jene Fälle berücksichtigt, bei welchen positive Zellen im Stroma vorlagen, zeigen sich deutlich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, was Abbildung 17 verdeutlicht. Der ermittelte p-Wert beträgt 0,019. Exemplarische Aufnahmen für einzelne stark CCL22-positive Zellen sind in Abbildung 16 gezeigt.

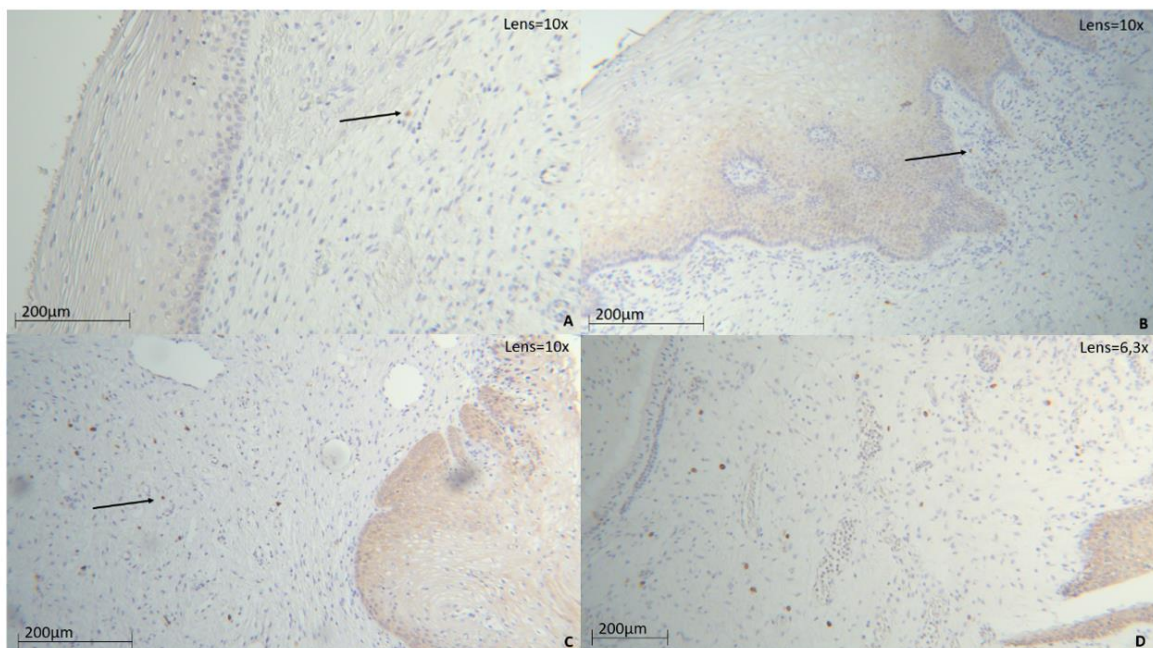


Abbildung 16: CCL22-positive, stroma-infiltrierende Zellen in CIN I-III sowie Regression und Progression der CIN II (Beispielaufnahmen)

Dargestellt sind immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte einer a) CIN I, b) CIN II mit anschließender Regression, c) CIN II mit anschließender Progression, d) CIN III. CCL22 braun (DAB), Zellkerne blau (Hämalaun). Die Pfeile deuten beispielhaft auf CCL22-positive Zellen im dysplasienahen Stroma (Vgl. Vattai et al., 2023).

## Ergebnisse

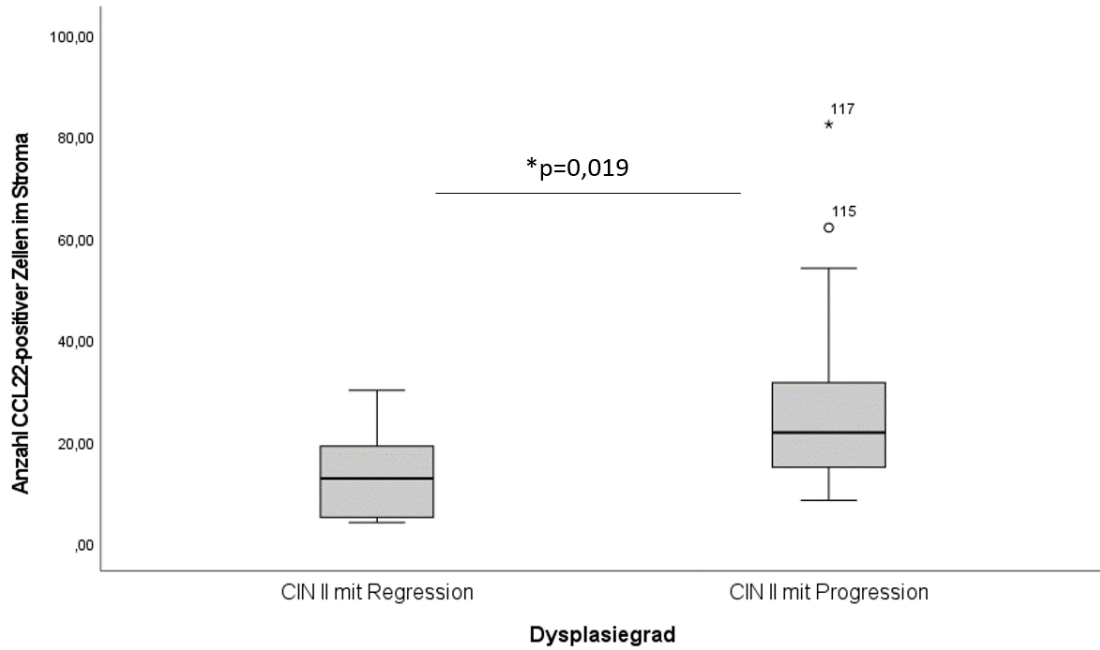


Abbildung 17: Anzahl CCL22-positiver Zellen in Regression und Progression der CIN II - 1

Dargestellt sind Boxplots zur Anzahl CCL22-positiver Zellen in CIN II mit anschließender Regression und CIN II mit anschließender Progression. Die Auswertung basierte auf immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Zervix. In dieser Darstellung wurden all jene Schnitte berücksichtigt, auf denen einzelne CCL22-positiv Zellen im Gewebe vorhanden waren (Vgl. Vattai et al., 2023).

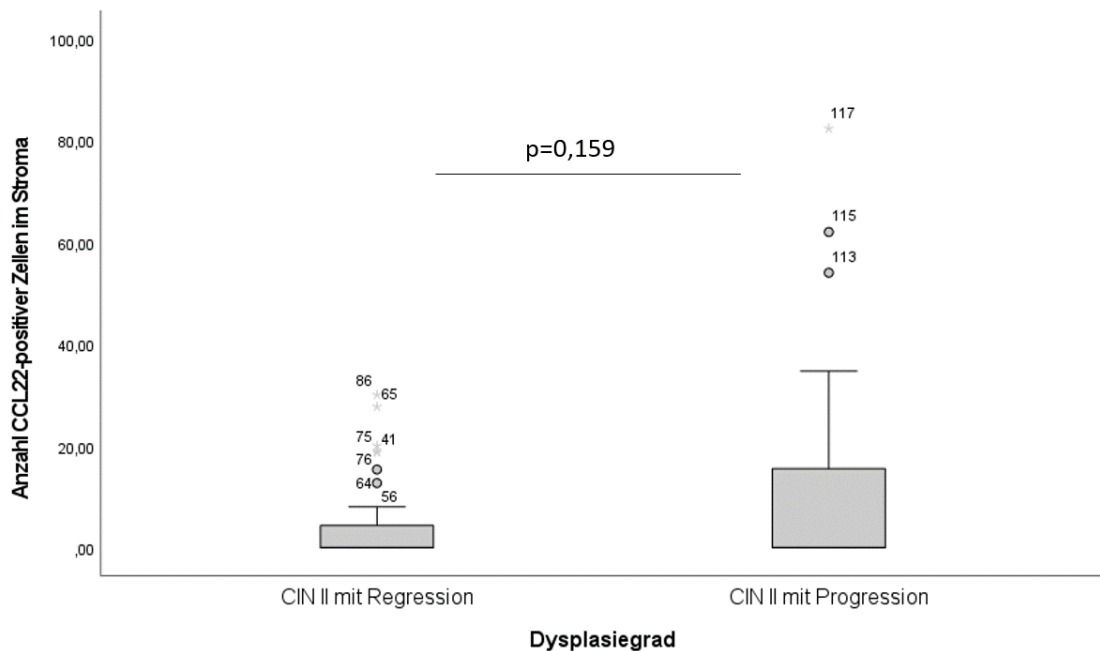


Abbildung 18: Anzahl CCL22-positiver Zellen in Regression und Progression der CIN II - 2

Dargestellt sind Boxplots zur Anzahl CCL22-positiver Zellen in CIN II mit anschließender Regression und CIN II mit anschließender Progression. Die Auswertung basierte auf immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Zervix.

#### 5.4 Korrelation CCL22 und FoxP3

Die Korrelation nach Spearman ergab eine signifikante positive Korrelation von epithelialer CCL22-Expression und Infiltrationsdichte FoxP3-positiver Zellen (Spearman's Rho 0,308;  $p < 0,01$ ) (vgl. Vattai et al., 2023).

#### 5.5 PPAR $\gamma$

Mittels Immunhistochemie sollte untersucht werden, wie sich die PPAR $\gamma$ -Expression in den verschiedenen CIN-Stadien verhält. Es handelt sich hier um die PPAR $\gamma$ -Expression im dysplastischen Epithel.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 gezeigt. Es wird hier deutlich, dass die Expression von CIN I zu CIN II zunimmt und von CIN II zu CIN III abnimmt. In CIN I betrug der IRS im Mittel 3,05 (Standardabweichung 2,38), in CIN II 4,93 (Standardabweichung 3,37) und in CIN III 3,94 (Standardabweichung 2,84). Die Unterschiede stellten sich zwischen CIN I und CIN II als signifikant dar ( $p = 0,017$ ); die Expressionsabnahme von CIN II zu CIN III war mit  $p = 0,140$  nicht signifikant. Mit  $p = 0,463$  lag kein signifikanter Unterschied zwischen den CIN II-Patientinnen mit Regression und jenen mit Progression vor (mittlerer IRS für erstere Gruppe: 4,69; Standardabweichung 3,38. CIN II mit Progression: mittlerer IRS 5,21; Standardabweichung 3,38). Abbildung 20 zeigt exemplarische Aufnahmen der PPAR $\gamma$ -Expression in CIN I-III sowie Positiv- und Negativkontrolle.

## Ergebnisse

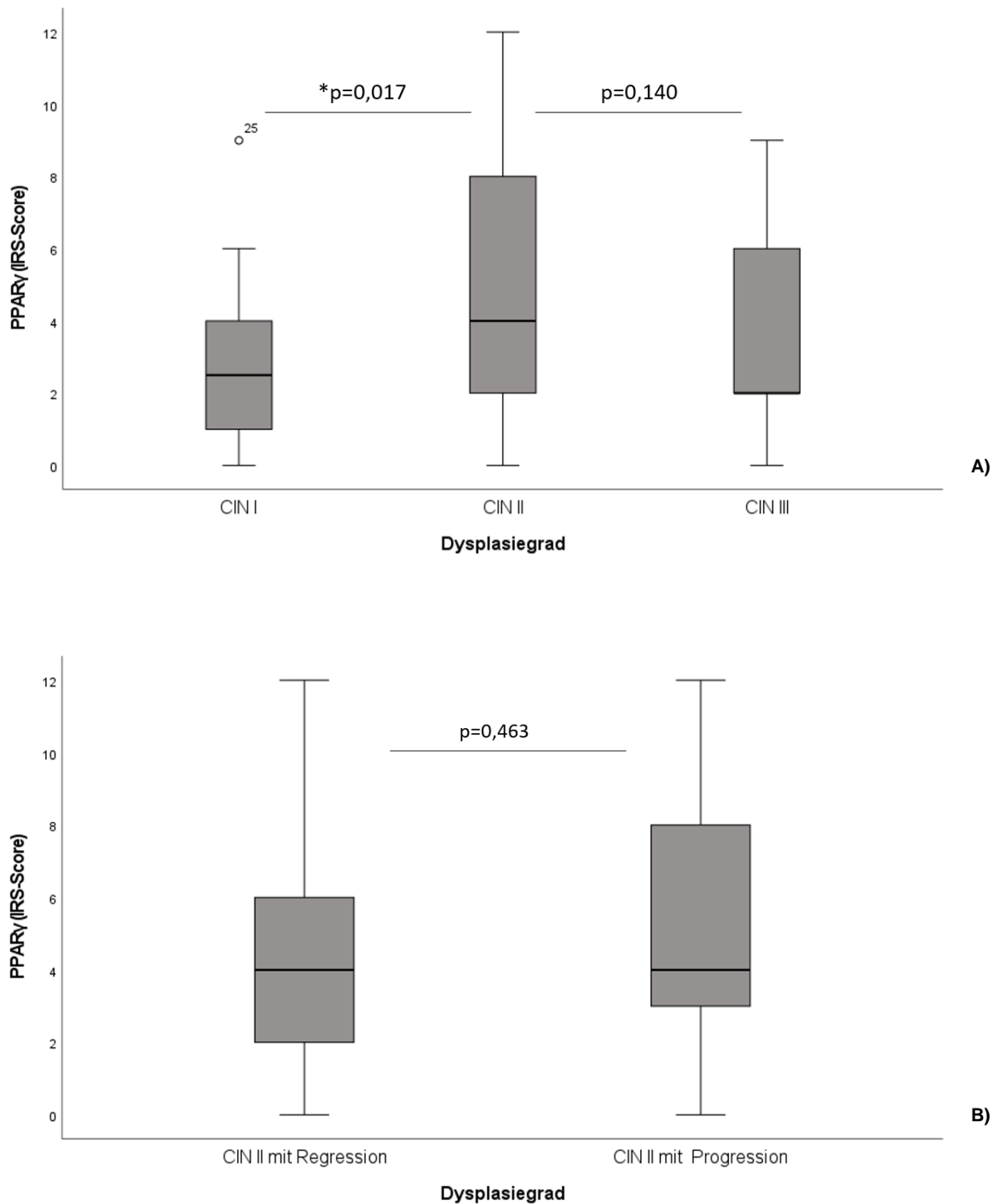


Abbildung 19: Immunreaktiver Score epithelialer PPAR $\gamma$ -Exprimierung in CIN I-III sowie Regression und Progression der CIN II

Dargestellt sind Boxplots zum immunreaktiven Score PPAR $\gamma$ -positiven Epithels in CIN I-III (A) sowie CIN II mit anschließender Regression und CIN II mit anschließender Progression (B). Die Auswertung basierte auf immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Zervix.

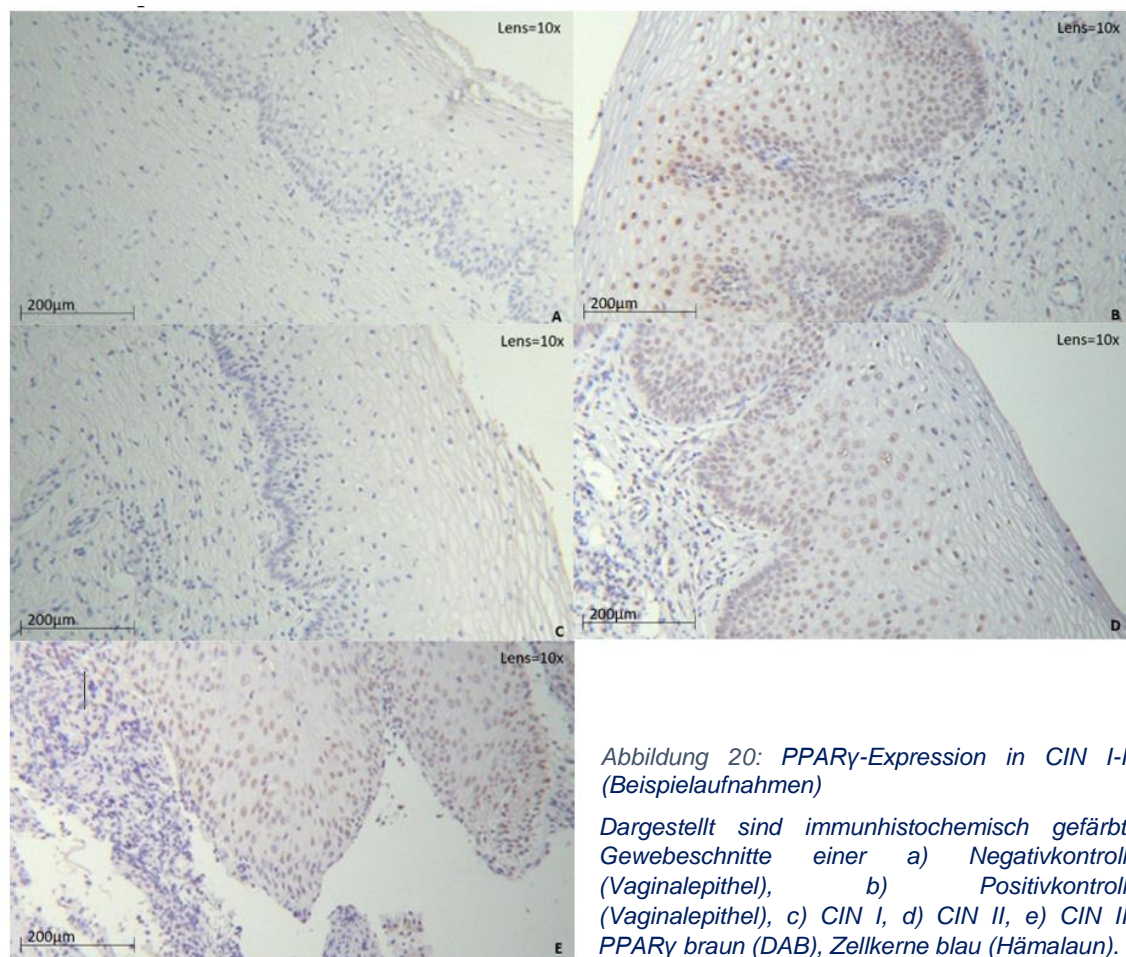


Abbildung 20: PPAR $\gamma$ -Expression in CIN I-III (Beispielaufnahmen)

Dargestellt sind immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte einer a) Negativkontrolle (Vaginalepithel), b) Positivkontrolle (Vaginalepithel), c) CIN I, d) CIN II, e) CIN III. PPAR $\gamma$  braun (DAB), Zellkerne blau (Hämalaun).

## 5.6 RIG-I

Das Expressionsmuster des Pattern Recognition Receptors RIG-I sollte mittels immunhistochemischer Analyse in der zervikalen Dysplasie und insbesondere ihrer Regression und Progression evaluiert werden.

Festzustellen war, dass RIG-I insgesamt eine sehr starke zytosolische Expression zeigte. Mit Fortschreiten der Dysplasie nahm die RIG-I-Expression zu (vgl. Abbildung 21). Der mittlere IRS für CIN I betrug 4,0 (Standardabweichung 2,92), für CIN II war es 4,87 (Standardabweichung 2,67) und für CIN III 5,18 (Standardabweichung 2,35). Es ergaben sich p-Werte von  $p=0,084$  für CIN I versus CIN II und  $p=0,402$  für CIN II versus CIN III. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren somit nicht signifikant. Auch zwischen Regression und Progression der CIN II konnte hinsichtlich der RIG-I-Expression kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In den regredienten Fällen betrug der Mittelwert für den IRS 4,93 (Standardabweichung 2,58), während er sich bei den progredienten Fällen auf 4,8 belief (Standardabweichung 2,77). Die Ergebnisse

## Ergebnisse

für den Vergleich zwischen Regression und Progression sind in Abbildung 21 dargestellt. Exemplarische Aufnahmen aller CIN-Grade finden sich in Abbildung 22.

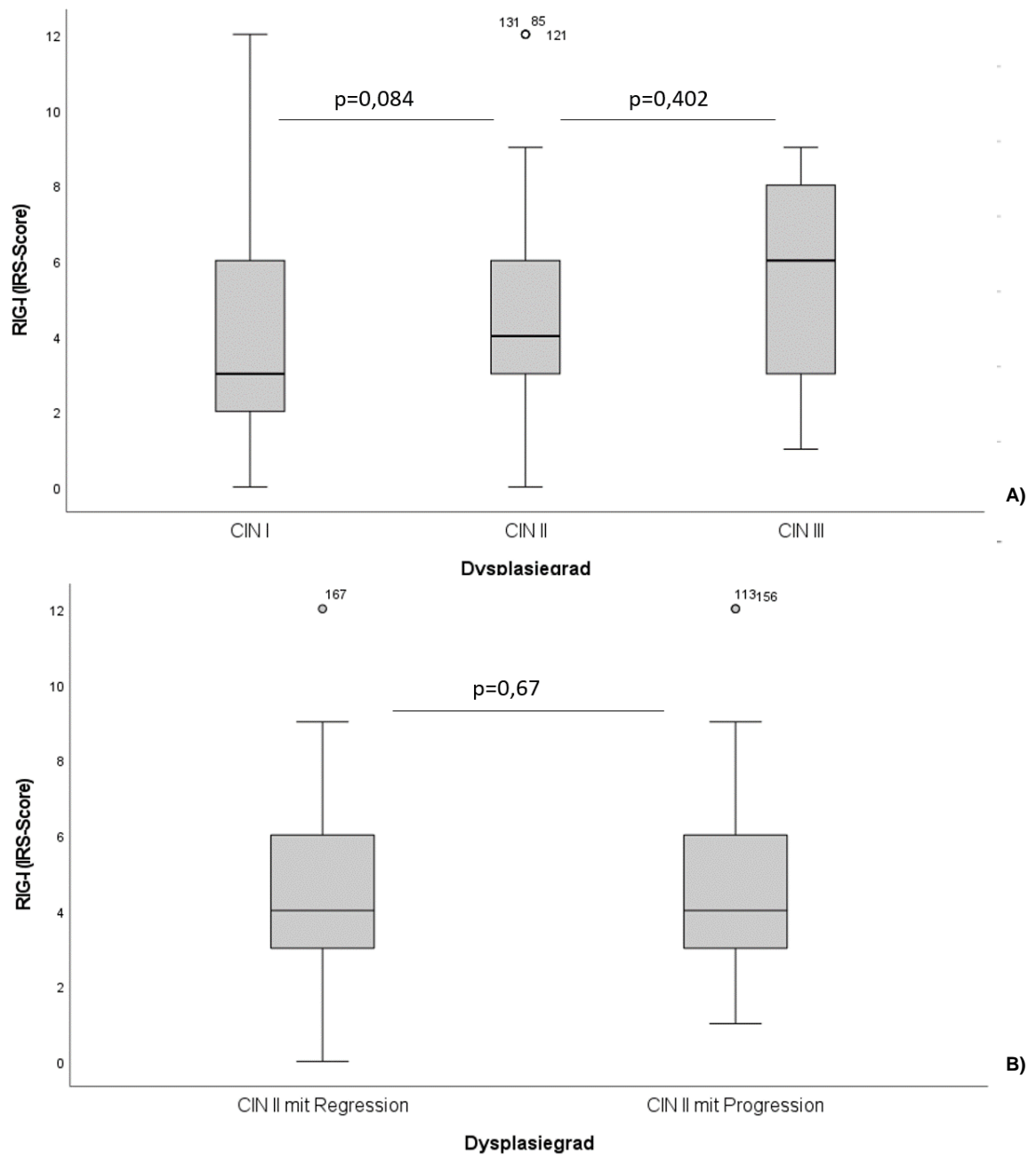


Abbildung 21: Immunreaktiver Score epithelialer RIG-I-Expriemung in CIN I-III sowie Regression und Progression der CIN II

Dargestellt sind Boxplots zum immunreaktiven Score RIG-I-positiven Epithels in CIN I-III (A) sowie CIN II mit anschließender Regression und CIN II mit anschließender Progression (B). Die Auswertung basierte auf immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Zervix.

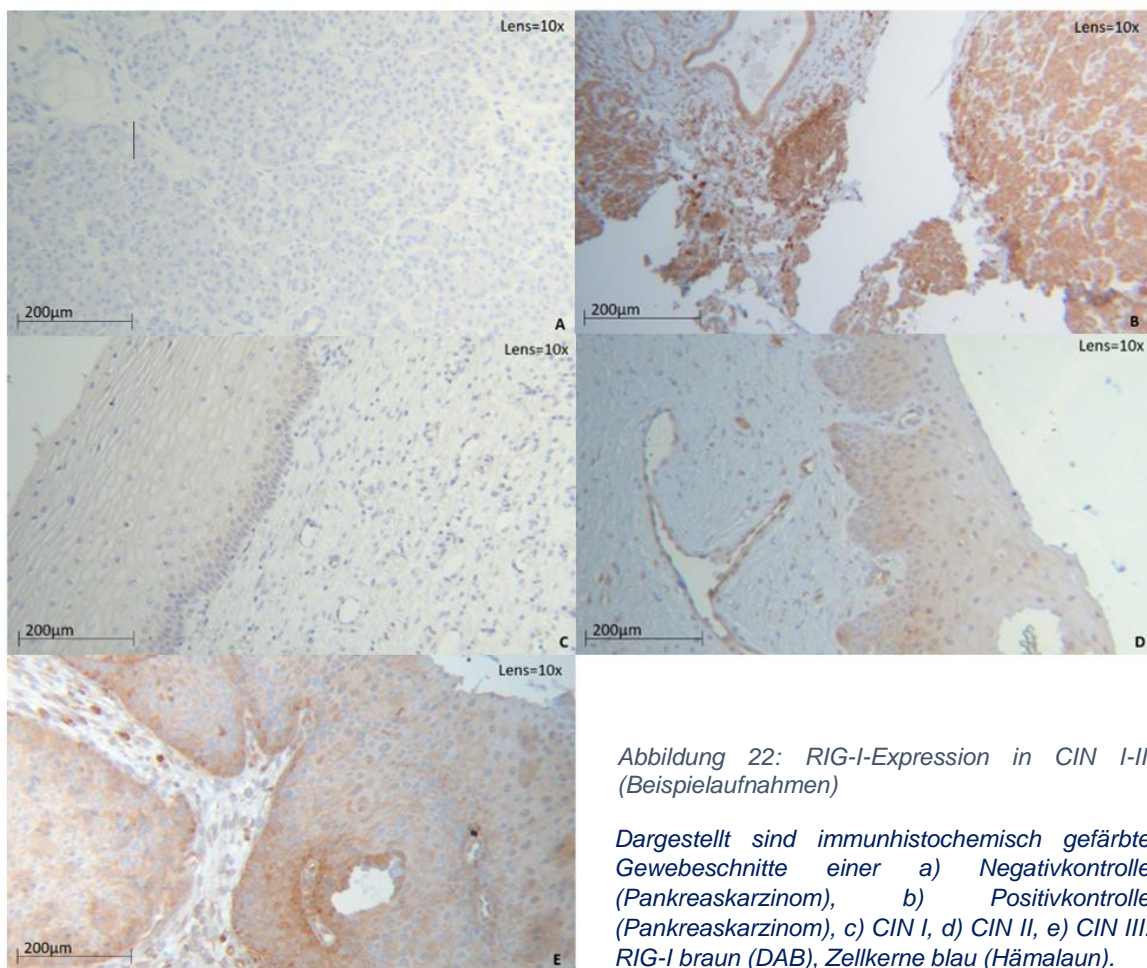


Abbildung 22: RIG-I-Expression in CIN I-III (Beispielaufnahmen)

Dargestellt sind immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte einer a) Negativkontrolle (Pankreaskarzinom), b) Positivkontrolle (Pankreaskarzinom), c) CIN I, d) CIN II, e) CIN III. RIG-I braun (DAB), Zellkerne blau (Hämalaun).

## 5.7 SIRT-1

In der folgenden immunhistochemischen Untersuchung sollte die Expression der Deacetylase SIRT-1 (Zhang & Kraus, 2010) in der zervikalen Dysplasie analysiert und die verschiedenen Gruppen miteinander verglichen werden.

SIRT-1 wurde im Epithel exprimiert. Insgesamt wiesen 93 % der Schnitte eine nukleäre SIRT-1-Expression auf. Darüber hinaus zeigten 19 % der Schnitte eine schwache zytoplasmatische Expression.

Es zeigte sich eine Expressionszunahme mit Ansteigen des Dysplasiegrades. In der CIN I betrug der mittlere IRS 5,39 (Standardabweichung 3,13), in CIN II 6,14 (Standardabweichung 3,00) und in CIN III 7,39 (Standardabweichung 3,06). Die p-Werte beliefen sich auf 0,3 für CIN I verglichen mit CIN II und 0,066 für CIN II verglichen mit CIN III und waren somit nicht signifikant. Von CIN II mit Regression zu CIN II mit Progression war ebenfalls eine nicht-signifikante Zunahme der SIRT-1-Expression zu beobachten ( $p=0,262$ ). Der mittlere IRS in den



## Ergebnisse

regredienten Fällen betrug 5,70 (Standardabweichung 2,70); in den progredienten Fällen belief er sich auf 6,63 (Standardabweichung 3,28). Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 in Form von Boxplots dargestellt. Abbildung 24 zeigt exemplarische Aufnahmen der SIRT-1-Expression in den verschiedenen CIN-Graden sowie Positiv- und Negativkontrolle.

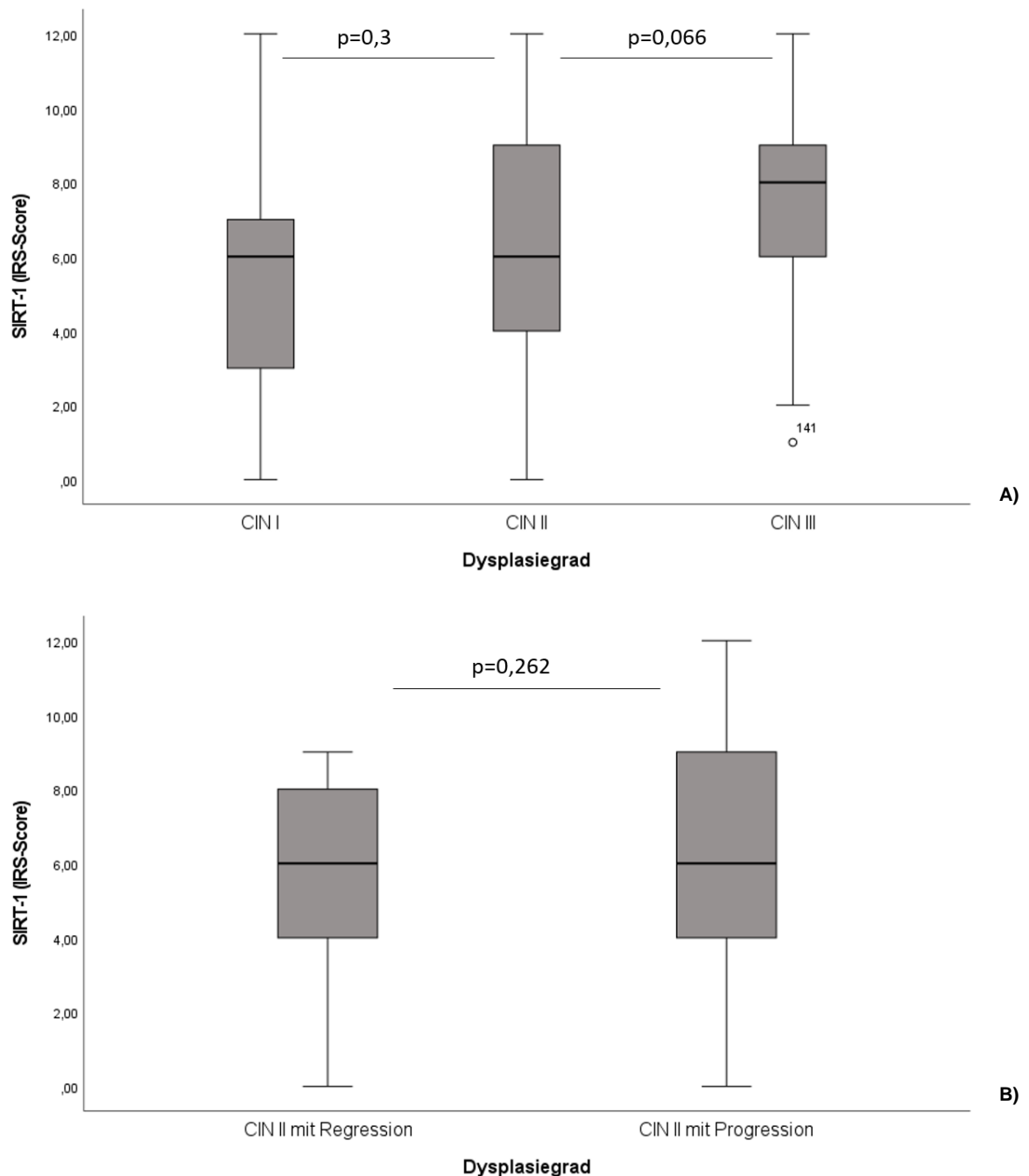


Abbildung 23: Immunreaktiver Score epithelialer SIRT-1-Exprimierung in CIN I-III sowie Regression und Progression der CIN II

Dargestellt sind Boxplots zum immunreaktiven Score SIRT-1-positiven Epithels in CIN I-III (A) sowie CIN II mit anschließender Regression und CIN II mit anschließender Progression (B). Die Auswertung basierte auf immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Zervix.

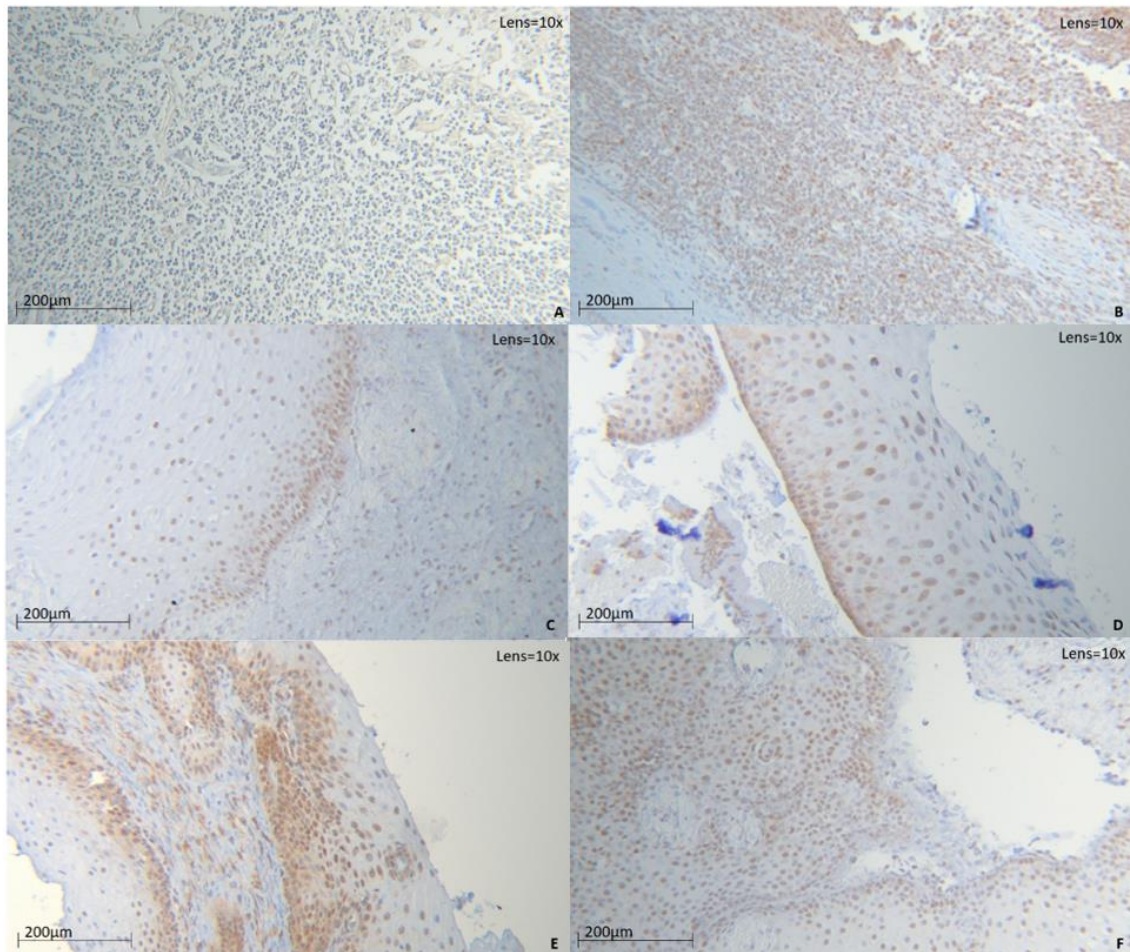


Abbildung 24: SIRT-1-Expression in CIN I-III sowie in Regression und Progression der CIN II (Beispielaufnahmen)

Dargestellt sind immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte einer a) Negativkontrolle (Lymphknotengewebe), b) Positivkontrolle (Lymphknotengewebe), c) CIN I, d) CIN II mit anschließender Regression, e) CIN II mit anschließender Progression, f) CIN III. SIRT-1 braun (DAB), Zellkerne blau

## 5.8 Doppelimmunfluoreszenz (vgl. Vattai et al., 2023)

In der immunhistochemischen Untersuchung stellten sich die im Dysplasie-umgebenden Stroma lokalisierten CCL22-positiven Zellen als relativ große (ca. 20 µm), runde bis ovale Zellen mit unauffälligem Kern-Plasma-Verhältnis dar. Die Morphologie und die Lokalisation lassen vermuten, dass es sich in diesem Fall um Makrophagen handeln könnte, da diese neben dendritischen Zellen verantwortlich für die CCL22-Produktion sind (Yashiro et al., 2019).

Im Folgenden wurden drei verschiedene Doppelimmunfluoreszenzen mit dem Ziel, die CCL22-sezernierenden Zellen genauer zu charakterisieren, durchgeführt. In der Doppelimmunfluoreszenz können zwei verschiedene Antigene gleichzeitig sichtbar gemacht werden. Hierbei wird sich die fluoreszierende Wirkung Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper zunutze gemacht.

### 5.8.1 CD68 und CCL22

Zunächst sollte verifiziert werden, ob es sich bei den CCL22-positiven Zellen tatsächlich um Makrophagen handelt. Hierzu wurde eine Doppelimmunfluoreszenz mit CD68 und CCL22 durchgeführt. CD68 ist ein charakteristisches Oberflächenmolekül von Makrophagen und als allgemeiner Makrophagenmarker bekannt (Jiang et al., 2016). Der an Anti-CD68 bindende Sekundärantikörper war an Cy-2 gekoppelt, welches in der Konfokalmikroskopie grün fluoresziert. CCL22 wurde durch den an Cy-3 gekoppelten Sekundärantikörper detektiert, was eine rote Fluoreszenz zur Folge hat. Zur besseren Orientierung im Gewebe wurden die Zellkerne mit DAPI (blaue Fluoreszenz) sichtbar gemacht. Das dysplastische Epithel zeigte in der Doppelimmunfluoreszenz analog zur Immunhistochemie eine CCL22-Expression. CD68- sowie CCL22-positive Zellen waren im Dysplasie-umgebenden Stroma zu finden.

In 78 Gesichtsfeldern (40x-Vergrößerung) auf 13 Schnitten konnten insgesamt 433 CD68-positive Zellen sowie 411 CCL22-positive Zellen detektiert werden. 84 % der CD68-positiven Zellen exprimierten auch CCL22. Zudem konnte festgestellt werden, dass dieser prozentuale Anteil (CCL22+CD68+ im Verhältnis zu allen CD68+ Zellen) in den niedrigeren Dysplasiegraden (CIN I oder CIN II mit Regression) niedriger war als in den fortgeschritteneren Dysplasiegraden (CIN II

## Ergebnisse

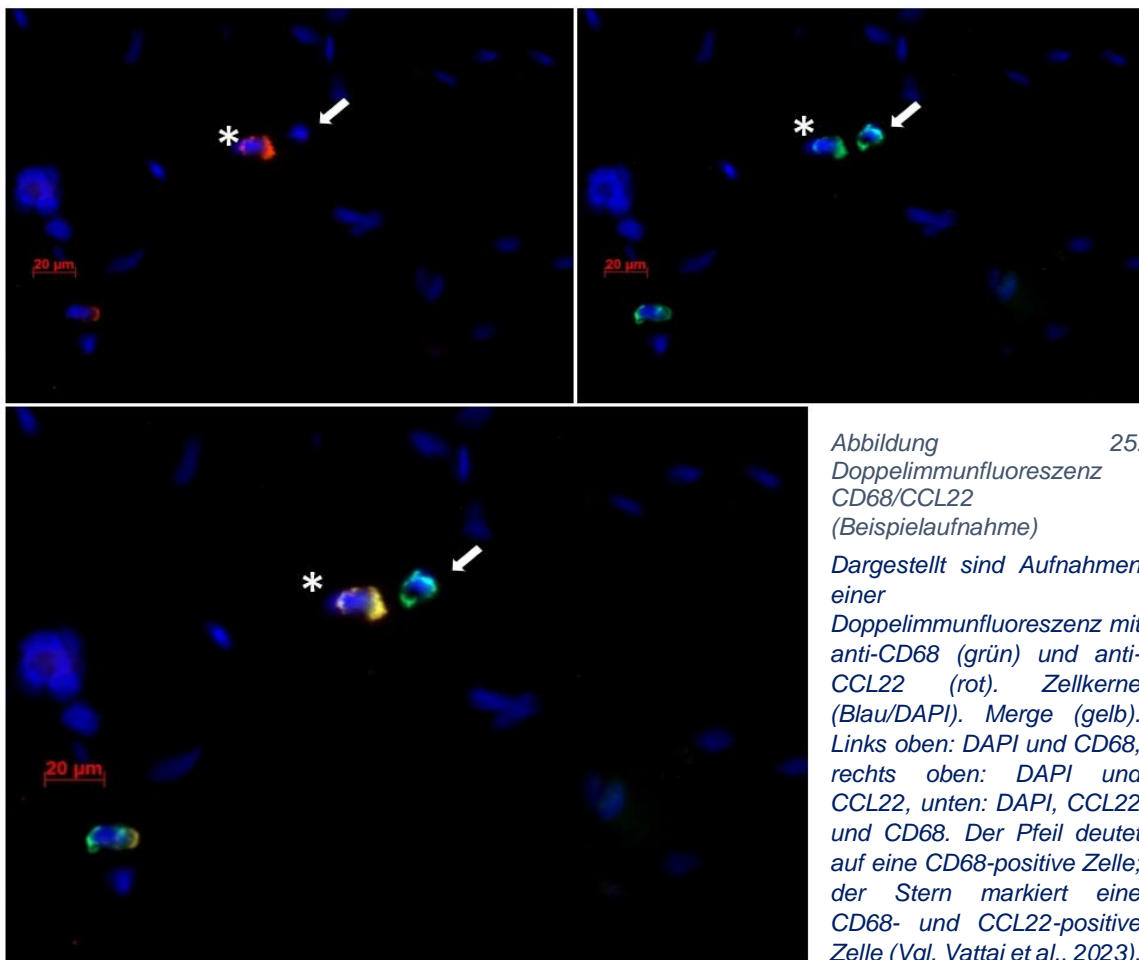
mit Progression und CIN III). In den fortgeschritteneren Graden waren es im Schnitt 94 % der CD68-positiven Zellen, welche auch CCL22 exprimierten, während in den niedrigeren Dysplasiegraden nur 80 % der CD68-positiven Zellen auch CCL22 exprimierten. 88 % der CCL22-positiven Zellen waren CD68-positiv.

Exemplarische Aufnahmen der Doppelimmunfluoreszenz sind in Abbildung 25 gezeigt. Die Aufnahmen stammen vom Gewebeschnitt einer Patientin mit dem Dysplasiegrad CIN II.

Zusammenfassend stellten sich die meisten CCL22-positiven Zellen als CD68-positiv dar (88 %). Andersherum betrachtet exprimierten die meisten CD68-positiven Makrophagen CCL22 (84 %). Tabelle 15 stellt die absoluten bzw. relativen Zahlen der identifizierten Zellen dar.

CD68+	CCL22+	CD68+CCL22+/ CCL22+	CCL22+CD68+/ CD68+
433	411	88 %	84 %

Tabelle 15: Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenz CD68/CCL22



### 5.8.2 CD68 und PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  ist als Transkriptionsfaktor bekannt, welcher unpolarisierte Makrophagen in antiinflammatorische M2-polarisierte Makrophagen differenzieren lässt (Bouhrel et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die im Dysplasie-umgebenden Stroma lokalisierten Makrophagen eine solche M2-Polarisation aufweisen. Hierzu wurde CD68 erneut mit einem Cy-2-gekoppelten, grün fluoreszierenden Sekundärantikörper detektiert. PPAR $\gamma$  wurde mit dem Cy-3-gekoppelten rot fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden zur besseren Orientierung im Gewebe spezifisch mit DAPI blau fluoreszierend markiert.

Unter einer 40x-Vergrößerung konnten 181 CD68-positive Zellen auf insgesamt 36 Gesichtsfeldern gezählt werden. 154 Zellen wiesen eine besonders starke PPAR $\gamma$ -Expression auf.

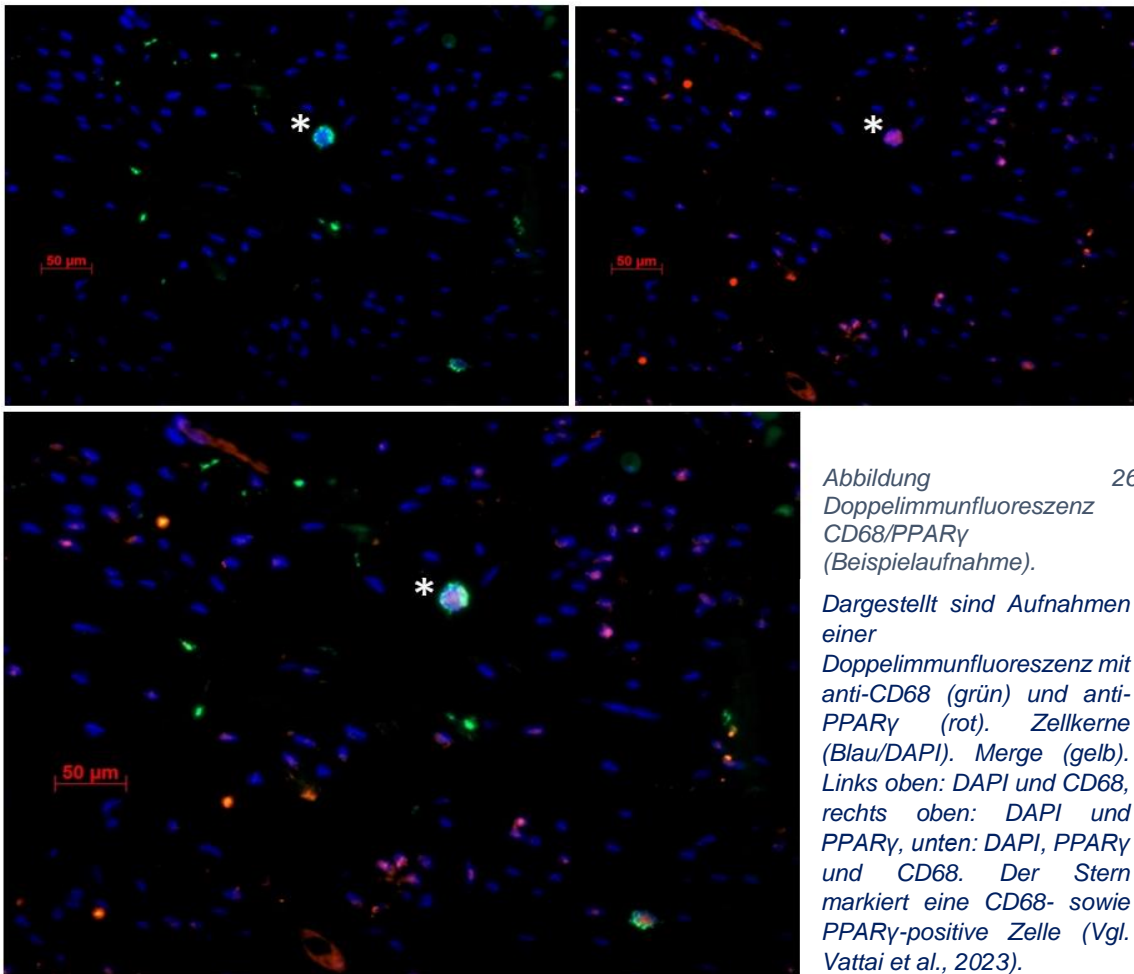
Alle nicht weiter spezifizierten Zellen in der dysplasienahen Umgebung zeigten eine schwache PPAR $\gamma$ -Expression.

129 der 181 CD68-positiven Zellen zeigten eine starke PPAR $\gamma$ -Expression. Dies entspricht 71,2 %. 25 Zellen waren PPAR $\gamma$ -, aber nicht CD68-positiv. Tabelle 16 stellt die absoluten bzw. relativen Zahlen der identifizierten Zellen dar.

Exemplarische Aufnahmen der CD68/PPAR $\gamma$ -Doppelimmunfluoreszenz sind in Abbildung 26 gezeigt. Die Fotos stammen von Gewebeschnitten einer Patientin mit dem Dysplasiegrad CIN II.

CD68+	PPAR $\gamma$ +	CD68+PPAR $\gamma$ + / PPAR $\gamma$	PPAR $\gamma$ +CD68+ / CD68
181	154	84 %	71 %

Tabelle 16: Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenz CD68/PPAR $\gamma$



### 5.8.3 CD68 und FoxP3

In der folgenden Doppelimmunfluoreszenz sollte die Interaktion zwischen Makrophagen und Tregs genauer analysiert werden.

Eine direkte Kolo-kalisation beider Zellarten in der Doppelimmunfluoreszenz könnte Hinweise auf eine parakrine Stimulation liefern. CD68 wurde mittels Cy-3-gekoppeltem Sekundärantikörper (rote Fluoreszenz) und FoxP3 mittels Cy-2-gekoppeltem Antikörper (grüne Fluoreszenz) detektiert.

Es konnten insgesamt 260 CD68-positive Zellen und 253 FoxP3-positive Zellen auf 63 Gesichtsfeldern mit einer 20x-Vergrößerung dargestellt werden. Ein Ansteigen der Infiltrationsdichte FoxP3-positiver T-Zellen konnte hier analog zur immunhistochemischen Untersuchung (vgl. Kapitel 5.2.2) beobachtet werden.

In 89 % der Gesichtsfelder waren CD68-positive Zellen und FoxP3-positive Zellen in denselben Dysplasie-umgebenden Regionen lokalisiert. In 12 % der Fälle war eine direkte Kolo-kalisation von CD68-positiven und FoxP3-positiven

## Ergebnisse

Zellen feststellbar. Tabelle 17 stellt die absoluten bzw. relativen Zahlen der identifizierten Zellen dar.

Exemplarische Aufnahmen der CD68/FoxP3-Doppelimmunfluoreszenz sind in Abbildung 27 gezeigt. Die Fotos stammen von Gewebeschnitten einer Patientin mit dem Dysplasiegrad CIN II.

CD68+	FoxP3+	Lokalisation in denselben dysplasienahen Regionen	Kolokalisation
260	253	89 %	12 %

Tabelle 17: Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenz CD68/FoxP3

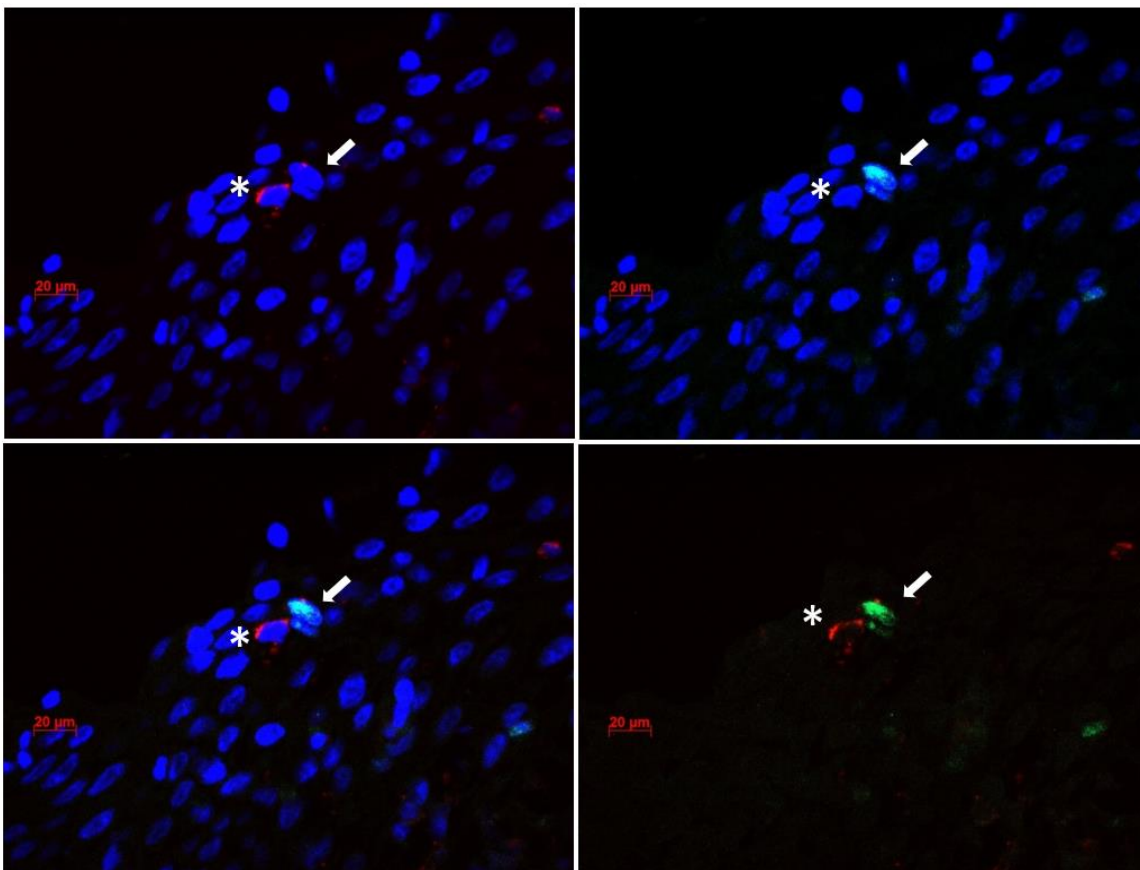


Abbildung 27: Doppelimmunfluoreszenz CD68/FoxP3 (Beispielaufnahme)

Dargestellt sind Aufnahmen einer Doppelimmunfluoreszenz mit anti-CD68 (rot) und FoxP3 (grün). Zellkerne (Blau/DAPI). Merge (gelb). Links oben: DAPI und CD68, rechts oben: DAPI und FoxP3, links unten: DAPI, FoxP3 und CD68, rechts unten: FoxP3 und CD68. Pfeil und Stern deuten auf zwei benachbarte CD68 bzw. FoxP3-positive Zellen (Vgl. Vattai et al., 2023).

## 5.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die **Anzahl FoxP3-positiver Zellen** war in den progredienten CIN II-Fällen im Vergleich zu den regredienten Fällen signifikant erhöht. Dies galt sowohl für FoxP3-positive Zellen im Stroma als auch im Epithel. Von CIN I über CIN II zu CIN III stieg die FoxP3-Expression ebenfalls an, der Unterschied zwischen CIN I und CIN II war signifikant.
2. Die **epitheliale CCL22-Expression** war in der CIN II Progression signifikant höher als in der Regression der CIN II. Von CIN I über CIN II zu CIN III stieg die CCL22-Expression ebenfalls an, der Unterschied zwischen CIN I und CIN II war signifikant.
3. Die **Infiltrationsdichte CCL22-positiver Zellen** im Dysplasie-umgebenden Stroma nahm von CIN I über CIN II zu CIN III zu. Die Unterschiede zwischen CIN II mit Regression und CIN II mit Progression waren signifikant, wenn alle Fälle, auf denen CCL22-positive Zellen im Stroma zu finden waren, berücksichtigt wurden.
4. Die Anzahl FoxP3-positiver Zellen korrelierte mit der epithelialen CCL22-Expression.
5. **PPAR $\gamma$**  zeigte von CIN I zu CIN II eine signifikante Erhöhung der Expression, von CIN II zu CIN III eine Reduktion, die nicht signifikant war.
6. Die **RIG-I-Expression** war stark ausgeprägt. Sie zeigte von CIN I über CIN II zu CIN III einen Trend zu höheren Expressionsleveln. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen waren nicht signifikant.
7. Die **SIRT-1-Expression** zeigte einen Trend zu höheren Werten mit Zunahme des Dysplasiegrades. Im Vergleich zu den regredienten Fällen waren in der CIN II Progression erhöhte SIRT-1-Expressionlevels zu finden. Die Unterschiede waren nicht signifikant.
8. **Doppelimmunfluoreszenzen**
  - a. Insgesamt exprimierten 84 % der CD68-positiven Makrophagen CCL22. In der CIN I und CIN II mit Regression waren es 80 %; in CIN II mit Progression und CIN III 95 bzw. 93 % der Makrophagen, welche CCL22 exprimierten.
  - b. 88 % der CCL22-positiven Zellen waren CD68-positive Makrophagen.



## Ergebnisse

- c. 71,2 % der CD68-positiven Makrophagen waren PPAR $\gamma$ -positiv.
- d. Die FoxP3-Expression stieg in der Immunfluoreszenz - analog zu den Ergebnissen der Immunhistochemie - mit fortschreitender Dysplasie an.
- e. In 89 % der Fälle waren CD68-positive und FoxP3-positive Zellen in denselben Dysplasie-umgebenden Regionen lokalisiert.
- f. In 12 % der Fälle lagen direkte Kolo-kalisationen beider Zelltypen vor.

## 6 Diskussion

### 6.1 FoxP3-positive T-regs in der CIN

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der sich im dysplastisch veränderten Gewebe befindlichen Tregs mit höheren Dysplasiegraden zunimmt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen aus der Literatur (Kojima et al., 2013; Zeng et al., 2013; Teng Zhang et al., 2017). Darüber hinaus konnten in der vorliegenden Arbeit bei CIN II-Patientinnen mit Progression signifikant mehr FoxP3-positive Tregs identifiziert werden als bei CIN II-Patientinnen mit regredienten Krankheitsverläufen. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Anzahl FoxP3-positiver Zellen im dysplastischen Epithel und der Gesamtzahl FoxP3-positiver Zellen (Epithel und dysplasienahes Stroma) (Vattai et al., 2021).

In der Literatur wurde eine Korrelation zwischen Viruslast und Treg-Infiltration beschrieben, da das Onkoprotein E7 zur Differenzierung der T-Zellen in einen regulatorischen Phänotyp beiträgt (Bashaw et al., 2019; Bonin et al., 2019). Visser et al. beobachteten bei Patientinnen mit Zervixdysplasie neben einer lokal gesteigerten Treg-Infiltration zudem eine vermehrte Anzahl von Tregs im peripheren Blut (Visser et al., 2007). Wie in der Einleitung dargelegt, stellt die gesteigerte Infiltration FoxP3-positiver Zellen in den meisten Tumorentitäten einen negativen Prädiktor dar (Vacchelli et al., 2016; Yang et al., 2020). In wenigen Tumorentitäten wie dem Mamma-, dem Prostata- sowie dem kolorektalen Karzinom werden die prognostische Rolle von FoxP3 kontrovers diskutiert (Deng et al., 2010; Wu et al., 2019; Zuo et al., 2007). Als Tumorsuppressor hemmt FoxP3 die Onkogene ERB2/HER2 und SKP2, welche im Mammakarzinom häufig überexprimiert sind (Li et al., 2018; Wang et al., 2010; Zuo et al., 2007). Darüber hinaus wurde eine Angiogenesehemmung durch FoxP3 beobachtet (Li et al., 2018). Im hepatozellulären Karzinom wurde FoxP3 ebenfalls als Tumorsupressorgen identifiziert, welches durch Regulation des TGF- $\beta$ /Smad2/3-Signalweg agiert (Shi et al., 2017).

In den meisten Studien, welche die protektive Rolle von FoxP3 aufzeigen, wurde die Expression nicht in Immunzellen wie Tregs, sondern in den Tumorzellen selbst beobachtet (Douglass et al., 2014). Der heterogene Eindruck von FoxP3

## Diskussion

könnte zudem durch eine in verschiedenen Studien berücksichtigte zytoplasmatische Anreicherung erklärt werden. Diese kann durch posttranslationale Modifikationen / verschiedenartiges Splicing entstehen; dadurch wird möglicherweise defektes FoxP3 detektiert (Wang et al., 2010). Zudem können verschiedene Subpopulationen FoxP3-positiver Tregs das Immunsystem unterschiedlich beeinflussen. Es wird eine CD25-negative Population FoxP3-positiver Tregs beschrieben, welche eine Immunantwort steigern kann, indem sie teilweise Funktionen von T-Helfer-Zellen annimmt (Komatsu et al., 2009).

Insgesamt stimmen die meisten Ergebnisse aus der Literatur mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen insoweit überein, dass die Infiltrationsdichte FoxP3-positiver Tregs in dysplastischem Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöht ist und dass eine gesteigerte Anzahl FoxP3-positiver Tregs mit einem schlechteren Outcome vergesellschaftet ist (Bailur et al., 2015; Demir et al., 2013; Generali et al., 2009; Huang et al., 2017; Kobayashi et al., 2007; Maeda et al., 2014; Peng et al., 2019; Zhang et al., 2016). Nähere Informationen zu den zugrundeliegenden Mechanismen der Tregs, die zu einer Immunmodulation zugunsten des Tumorwachstums führen, sind in der Einleitung dargestellt.

Das Potenzial von Tregs als Angriffspunkt für non-invasive Therapien im Rahmen von Krebserkrankungen erscheint vielversprechend. So hat eine anti-CD25/anti-CD4 Applikation bereits zu Tumorregression in Mäusen geführt (Loddenkemper et al., 2009; Onizuka et al., 1999; Yu et al., 2005). Seit einigen Jahren wird intensiv daran geforscht, spezifischere Angriffspunkte für die therapeutische Depletion von Tregs zu finden. Beispiele hierfür sind PD-L1, GITR oder CTLA4. (Jørgensen et al., 2019; Jung et al., 2019; Loddenkemper et al., 2009; Ohue und Nishikawa, 2019; Yano et al., 2019). Die Blockade von IL-33 führt ebenfalls zu einem Rückgang des Tumorwachstums, wie eine Studie aus dem Jahr 2020 zeigt (Hatzioannou et al., 2020).

IL-33 könnte möglicherweise einen Ansatzpunkt darstellen, an dem die Tregs im Tumor gezielt in ihrer Funktionalität modifiziert werden können, da Tregs im Tumor und der unmittelbaren Tumorumgebung im Unterschied zu Tregs in anderen Körperregionen einen besonders hohen Gehalt an diesem Botenstoff aufweisen (Hatzioannou et al., 2020; Vattai et al., 2021). Einen weiteren Ansatz stellt die TLR8-vermittelte Modifikation des Glukosemetabolismus in Tregs dar,

welche ebenfalls zu einer Funktionsminderung der Tregs führen kann (Xu et al., 2021). Eine Depletion der Tregs kann einerseits die Immunantwort gegen Tumoren, andererseits auch die Entstehung von Autoimmunerkrankungen fördern (siehe Kapitel 0). Da, wie die in dieser Arbeit vorliegenden Daten zeigen, eine erhöhte Infiltrationsdichte regulatorischer T-Zellen in der CIN mit der Progression der Dysplasie assoziiert ist, scheint die Etablierung zielgerichteter medikamentöser Therapien sinnvoll zu sein. Die Therapie sollte sich möglichst spezifisch gegen die sich in der Umgebung der Dysplasie befindlichen Tregs richten, um mögliche Nebenwirkungen zu reduzieren (Vattai et al., 2021).

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in den fortgeschritteneren Dysplasiegraden sowie bei Patientinnen mit einer Progression der CIN II eine erhöhte Zahl FoxP3-positiver Tregs vorliegt. Es ist daher zu vermuten, dass Tregs eine relevante Rolle in der Karzinogenese des Zervixkarzinoms spielen können (Vattai et al., 2021). Die Daten legen zudem nahe, dass die Infiltrationsdichte bzw. die Anzahl der Tregs im und um das dysplastische Gewebe eine prognostische Aussage zur Regression und Progression der CIN II zulässt. Somit könnte zukünftig zwischen Patientinnen mit voraussichtlich regredientem und Patientinnen mit potentiell progredientem Krankheitsverlauf differenziert werden, um erstere vor einer Übertherapie zu bewahren (Arbyn et al., 2008; Kolben et al., 2019; Kyrgiou et al., 2016). Schließlich unterstreichen die Ergebnisse das Potenzial regulatorischer T-Zellen als Angriffspunkt für medikamentöse Therapien der zervikalen Dysplasie und des Zervixkarzinoms (Vattai et al., 2021).

### 6.2 Epitheliale CCL22-Expression/CCL22-Expression in Stroma-infiltrierenden Immunzellen

Die epitheliale CCL22-Expression war in CIN II mit anschließender Progression signifikant höher als in CIN II mit regredientem Krankheitsverlauf. Von CIN I über CIN II zu CIN III stieg die CCL22-Expression ebenfalls an, der Unterschied war jedoch nur zwischen CIN I und CIN II signifikant. Auffällig war, dass sich die epitheliale CCL22-Expression in CIN II mit anschließender Progression sogar stärker darstellte als in der Gruppe der CIN III-Patientinnen (Vattai et al., 2023). Diese Beobachtung unterstreicht den HSIL/CIN III-ähnlichen Charakter der

## Diskussion

progredienten CIN II (vgl. Kapitel 2.1; 6.7). Analog zur CCL22-Expression im dysplastischen Epithel zeigt die Infiltrationsdichte CCL22-positiver Zellen im Dysplasie-umgebenden Stroma von CIN I über CIN II zu CIN III eine Erhöhung mit Fortschreiten der Dysplasie. Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen waren nicht signifikant. Die Unterschiede zwischen Regression und Progression der CIN II waren, sofern nur die Fälle mit einzelnen infiltrierenden CCL22-positiven Zellen berücksichtigt wurden, signifikant. Sowohl die epitheliale CCL22-Expression als auch die Infiltrationsdichte CCL22-positiver Zellen im Stroma lassen einen Zusammenhang zwischen CCL22-Expression und Progression der Dysplasie vermuten (Vattai et al., 2023).

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse stehen im Einklang mit Erkenntnissen aus der Literatur: In gynäkologischen Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom oder dem Ovarialkarzinom ist eine erhöhte CCL22-Expression mit einem schlechteren Outcome assoziiert (Curiel et al., 2004; Li et al., 2013; Qun Wang et al., 2019; Zhao et al., 2017). Zhao et al. beschrieben, dass im Zervixkarzinom die mRNA-Levels von CCL22 gegenüber gesundem Gewebe der Zervix signifikant erhöht sind (Zhao et al., 2017). Wang et al. konnten eine gesteigerte CCL22-Expression im Zervixkarzinom mittels immunhistochemischer Analyse bestätigen (Qun Wang et al., 2019). Für die CIN liegen in Hinblick auf die CCL22-Expression bislang nur wenige Daten vor. Es wurde lediglich in der CIN "verwandten" HPV-induzierten vulvären intraepithelialen Neoplasie (VIN) eine gesteigerte CCL22-Expression beobachtet (Santegoets et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde die CCL22-Expression in der CIN, d.h. sowohl in den einzelnen CIN-Graden als auch in Regression und Progression der CIN II, analysiert. Es wurden sowohl epitheliale CCL22-Expression als auch die CCL22-Expression Stroma-infiltrierender Zellen untersucht. Darüber hinaus konnte eine signifikante Korrelation der epithelialen CCL22-Expression mit der Infiltrationsdichte FoxP3-positiver Tregs beobachtet werden, was mit Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmt (Li et al., 2013; Qun Wang et al., 2019). Die vorliegende Korrelation lässt sich dadurch erklären, dass CCL22 über den Chemokinrezeptor CCR4 Tregs spezifisch in das dysplastische Gewebe rekrutiert (Curiel, 2008; Li et al., 2013; Scheu et al., 2017; Zhao et al., 2017) (vgl. Kapitel 0).

## 6.3 Doppelimmunfluoreszenzen

### 6.3.1 CD68 und CCL22

Die Anzahl CD68-positiver Makrophagen im Tumormilieu stellt in vielen Tumorentitäten wie dem Prostatakarzinom oder dem Mammakarzinom einen unabhängigen Faktor dar, der eine schlechtere Prognose im Sinne einer Metastasierung oder reduziertem Gesamtüberleben anzeigt (Hu et al., 2015; Jeremiasen et al., 2020; Yuan et al., 2014). Auch im Zervixkarzinom wurden signifikant mehr CD68-positiv Makrophagen identifiziert als im gesunden Vergleichsgewebe (Davidson et al., 1997). In der in dieser Arbeit durchgeführten Doppelimmunfluoreszenz waren 84 % der CD68-positiven Makrophagen auch CCL22-positiv. Makrophagen könnten also über das Treg-rekrutierende Chemokin CCL22 zur Tumorprogression beitragen. Dass CCL22 außer von dendritischen Zellen hauptsächlich von Makrophagen sezerniert wird, ist bekannt (Yashiro et al., 2019). Wang et al. bestätigten für das Zervixkarzinom mittels Doppelimmunfluoreszenz, dass CCL22 primär von Makrophagen sezerniert wird (Qun Wang et al., 2019).

In CIN I und CIN II mit Regression exprimierten in der vorliegenden Arbeit jeweils 80 % der Makrophagen CCL22; in CIN II mit Progression sowie CIN III waren es sogar 94 % der CD68-positiven Makrophagen, die CCL22 exprimierten. Eine erhöhte Rate CCL22-positiver Zellen geht somit mit einem erhöhten Malignitätspotenzial einher (Vattai et al., 2023). In der CIN wurden CD68-positiv Makrophagen bisher wenig untersucht. Chen et al. analysierten die Infiltrationsdichte CD68-positiver und CD163-positiver Makrophagen. Dabei stellten sie fest, dass die Anzahl CD163-positiver Makrophagen von leichter über mittelgradiger zu schwerer Dysplasie nicht stärker anstieg als die Anzahl CD68-positiver Makrophagen (Chen et al., 2017). Da CD163 einen Marker für M2-Polarisation in Makrophagen darstellt (Hu et al., 2017), ist zu vermuten, dass es sich bei den in die CIN einwandernden Makrophagen primär um M2-polarisierte Makrophagen handelt (vgl. Kapitel 6.3.2) (Vattai et al., 2023).

Immunzellen können durch lösliche Faktoren zur CCL22-Expression stimuliert werden, beispielsweise durch IL-1 $\alpha$  (Wiedemann 2016). Im Zervixkarzinom wurde gezeigt, dass Karzinomzellen M2-polarisierte Makrophagen zur CCL22-Produktion anregen (Qun Wang et al., 2019).

## Diskussion

Aus der vorliegenden Doppelimmunfluoreszenz ließ sich nicht nur ableiten, welcher Anteil der Makrophagen CCL22 exprimiert, sondern auch, wie hoch der Anteil der Makrophagen an den CCL22-exprimierenden Zellen insgesamt war. Dabei stellte sich heraus, dass die große Mehrheit (88 %) der CCL22-positiven Zellen CD68-positive Makrophagen waren. Um welche Zellen es sich bei den restlichen 12 % CD68-negativen/CCL22-positiven Zellen handelt, könnte in zukünftigen Studien analysiert werden. Sowohl die immunhistochemischen Analysen (vgl. Kapitel 5.3.1) als auch die vorliegende Doppelimmunfluoreszenz zeigten darüber hinaus eine CCL22-Expression im dysplastischen Epithel. Es ist daher zu vermuten, dass nicht nur in das Dysplasie-umgebende Stroma eingewanderte Immunzellen CCL22 exprimieren können, sondern auch dysplastisch veränderte Epithelzellen (Vattai et al., 2023).

Es wurde bereits nachgewiesen, dass Zellen invasiver Karzinome CCL22 exprimieren können (Huang et al., 2019; Li et al., 2013). Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten ergänzen damit insofern die Vorbefunde, dass auch präkanzeröse Läsionen die Fähigkeit der CCL22-Expression besitzen können (Vattai et al., 2023). Lösliche Faktoren können die CCL22-Expression in Tumorzellen induzieren bzw. stimulieren. Die am meisten untersuchten Stimulanzen in diesem Zusammenhang sind  $\text{INF}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$ , welche beispielsweise im Mammakarzinom als Induktoren für eine CCL22-Expression identifiziert wurden (Faget et al., 2011; Haubner, 2017). Auch andere lösliche Faktoren wie  $\text{IL-1}\beta$  können im Mammakarzinom die CCL22-Expression induzieren (Faget et al., 2011; Haubner, 2017). Ob dies auch in der zervikalen Dysplasie der Fall ist, könnte in zukünftigen Studien geklärt werden.

### 6.3.2 CD68 und PPAR $\gamma$

Insgesamt war in der vorliegenden Arbeit ein Großteil - 71,2 % - der CD68-positiven Zellen auch PPAR $\gamma$ -positiv. Da PPAR $\gamma$  neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor (Tontonoz und Spiegelman, 2008) für die Transformation unpolarisierter Makrophagen in M2-polarisierte Makrophagen sorgt (Bouhrel et al., 2007; Kolben et al., 2018), ist anzunehmen, dass es sich bei den CCL22-sezernierenden Zellen vorwiegend um M2-polarisierte Makrophagen handelt (Vattai et al., 2023).

Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen identifizierten Wang et al. die

CCL22-exprimierenden Zellen im Zervixkarzinom ebenfalls hauptsächlich als M2-polarisierte Makrophagen (Qun Wang et al., 2019). Im Mammakarzinom identifizierten Haubner et al. die CCL22-sezernierenden Zellen als Makrophagen, welche größtenteils unpolarisiert und zu einem kleineren Teil M2-polarisiert waren (Haubner, 2017). Wang et al. nutzten den M2-Polarisationsmarker CD163, während Haubner zusätzlich CD206 als weiteren M2-Marker (Xu et al., 2020) hinzuzog.

Bezüglich des in dieser Arbeit verwandten M2-Polarisationsmarkers PPAR $\gamma$  ist zu vermerken, dass nicht nur PPAR $\gamma$  für die Differenzierung von Makrophagen sorgt, sondern dass auch diverse andere Moleküle wie IL-6 oder PGE-2 zur Differenzierung M2-polarisierter Makrophagen beitragen (Heusinkveld et al., 2011; Kim und Bae, 2016). Es ist also vorstellbar, dass PPAR $\gamma$  nur bedingt einen verlässlichen Indikator für eine M2-Polarisation darstellt. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch deutlich, dass eine PPAR $\gamma$ -Expression auf Makrophagen mit der Expression von CCL22 und damit mit der Rekrutierung negativ prognostisch agierender Tregs assoziiert ist.

### 6.3.3 CD68 und FoxP3

In der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere Doppelimmunfluoreszenz durchgeführt, um die Interaktion zwischen CD68-positiven Makrophagen und FoxP3-positiven Tregs zu analysieren. Die Anzahl infiltrierender Tregs stieg analog zu den Erkenntnissen aus der Immunhistochemie mit fortschreitender Dysplasie an (vgl. Kapitel 5.2.2). Die Immunfluoreszenz zeigte in 89 % der Fälle eine Lokalisation CD68-positiver und FoxP3-positiver Zellen in denselben dysplasienahen Regionen. In 12% der Fälle lagen unmittelbare Kollokalisierungen vor, d.h. die beiden Zelltypen waren direkt benachbart. Sowohl das Vorhandensein beider Zellarten in denselben dysplasienahen Geweberegionen als auch die Kollokalisierungen stützen die These, dass Makrophagen Tregs gewebespezifisch anlocken können (Vattai et al., 2023).

Ein zugrundeliegender Mechanismus hierfür ist die chemotaktische Bewegung der Tregs entlang eines Chemokingradienten (Cremonesi et al., 2018), beispielsweise über das von Makrophagen sezernierte CCL22 (vgl. Kapitel 5.8). Die direkte Kollokalisierung stellt zudem einen Hinweis auf parakrine Stimulation dar (Vattai et al., 2023).



#### 6.4 Epitheliale PPAR $\gamma$ -Expression in der CIN

Wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben, stellten sich die Makrophagen in der Dysplasieumgebung überwiegend als PPAR $\gamma$ -positive Zellen dar. PPAR $\gamma$  könnte also über das von den Makrophagen sezernierte Treg-rekrutierende Chemokin CCL22 mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein. In diesem Kapitel wird nun auf die PPAR $\gamma$ -Expression im dysplastischen Epithel eingegangen.

PPAR $\gamma$  zeigte von CIN I zu CIN II eine signifikante Erhöhung der Expression; von CIN II zu CIN III wiederum eine nicht-signifikante Verminderung der PPAR $\gamma$ -Expression. Zwischen CIN II mit Regression und CIN II mit Progression zeigten sich keine Unterschiede. PPAR $\gamma$  hat unter anderem antiinflammatorische Eigenschaften inne, welche zu einer Immunmodulation zugunsten der Progression der Dysplasie beitragen könnten (Griffiths et al., 2017; Narala et al., 2014). Auch im Blasenkarzinom wurde der negative prognostische Wert erhöhter PPAR $\gamma$ -Expression beschrieben (Cheng et al., 2019).

Es liegen in der Literatur jedoch deutlich mehr Daten vor, welche die antiproliferative Wirkung von PPAR $\gamma$  hervorheben (vgl. Kapitel 2.9). So wurde im Zervixkarzinom eine herunterregulierte Expression des Rezeptors beschrieben (Jung et al., 2005). Zudem hatte in einer *in vivo*-Studie die Gabe von PPAR $\gamma$ -Agonisten, sogenannten Thiazolidinedionen, ein verlangsamtes Zellwachstum der Zervixkarzinomzellen zur Folge (Wuertz et al., 2017). In den verschiedenen CIN-Graden wurde die PPAR $\gamma$ -Expression bislang nicht untersucht.

Festzuhalten ist, dass die PPAR $\gamma$ -Expression im Karzinomgeschehen und in präkanzerösen Läsionen differenzierter betrachtet werden sollte. So kann zwischen der Expression auf myeloiden Zellen und der Expression im Gewebe unterschieden werden (vgl. Kapitel 6.3.2). Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse erlauben einen Einblick in die PPAR $\gamma$ -Expression in der CIN. Dass von CIN I über CIN II zu CIN III keine eindeutige Dynamik der Expression beobachtet werden konnte, bildet die vielfältigen Funktionen des PPAR $\gamma$ -Rezeptors ab (vgl. Kapitel 2.9), und die Rolle von PPAR $\gamma$  sollte in weiteren Studien genauer analysiert werden.

## 6.5 RIG-I Expression in der CIN

Die RIG-I-Expression zeigte einen Trend zu verstärkter Expression mit Zunahme des Dysplasiegrades. Der Expressionsanstieg war von CIN I zu CIN II deutlicher ausgeprägt als von CIN II zu CIN III. Zwischen Regression und Progression der CIN II war kein Unterschied feststellbar. Die RIG-I-Expression war in der vorliegenden Arbeit insgesamt sehr stark. Im Gegensatz dazu wird in der Literatur mehrfach eine Beeinträchtigung der RIG-I-Expression bzw. -Funktion durch HPV und das Onkoprotein E6 beschrieben (Chiang et al., 2018; Reiser et al., 2011). Andere Studien wiederum zeigen auf, dass die RIG-I-Expression in HPV-infizierten Zellen nicht oder nur teilweise beeinträchtigt sei (Karim et al., 2011; Lo et al., 2020).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete starke Expression könnte folgende Gründe haben: RIG-I könnte erst im Carcinoma in situ oder im invasiven Zervixkarzinom vermindert exprimiert sein, jedoch noch nicht im präkanzerösen Stadium (Chiang et al., 2018). Eine andere Erklärung besteht darin, dass RIG-I in der CIN zwar reichlich vorhanden ist, jedoch beispielsweise Mutationen im MAVS-Gen vorliegen und somit die Funktionsfähigkeit der durch RIG-I ausgelösten Kaskaden beeinträchtigt ist (Xiao et al., 2019).

Die in dieser Arbeit beobachtete Expressionszunahme mit höheren Dysplasiegraden steht im Einklang mit Erkenntnissen aus dem Ovarial- und dem Mammakarzinom, in welchen eine hohe RIG-I-Expression mit einem schlechteren Outcome (Wolf et al., 2020) bzw. einem schlechteren Therapieansprechen (Boelens et al., 2014) assoziiert ist. Der Expressionszunahme steht jedoch entgegen, dass die Etablierung eines antiviralen Milieus durch RIG-I eher zu einer Erniedrigung der Viruslast und einem Rückgang der Dysplasie führen sollte (Dixit und Kagan, 2013).

Die Beobachtung, dass mit Zunahme der RIG-I-Expression kein Rückgang der Dysplasie feststellbar war, könnte erneut für eine beeinträchtigte Funktion von RIG-I oder seiner Signalkaskaden in der HPV-induzierten Zervixdysplasie sprechen (Xiao et al., 2019). In einigen Tumorentitäten wie dem Zervixkarzinom wurden antiproliferative Effekte des RIG-I-Rezeptors beschrieben (Ellermeier et al., 2013; Ruzicka et al., 2020; Wang et al., 2016; Xu et al., 2018; Zhu et al., 2017). Bisher existieren wenige Daten zur Rolle von RIG-I in der CIN. Die in

dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse erlauben einen Einblick in die RIG-I-Expression in den verschiedenen CIN-Stadien sowie in Regression und Progression der CIN II.

### 6.6 SIRT-1-Expression in der CIN

Die SIRT-1-Expression zeigte einen Trend zu höheren Werten mit Zunahme des Dysplasiegrades. In den progredienten Fällen lag eine höhere SIRT-1-Expression vor als in den regredienten Fällen der CIN II. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse stehen im Einklang mit Erkenntnissen aus vorherigen Studien, welche erhöhte SIRT-1-Expressionslevels im Prostata-, Kolon- oder im Zervixkarzinom beschrieben (Huffman et al., 2007; Stünkel et al., 2007; Velez-Perez et al., 2017). Auch im Zervixkarzinom und in der CIN wurde eine erhöhte SIRT-1-Expression festgestellt (Singh et al., 2015; Velez-Perez et al., 2017). Es wurde eine Hochregulation des Sirtuins durch das Onkoprotein E7 beschrieben (Allison et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden darüber hinaus Expressionsunterschiede in Regression und Progression der CIN II analysiert.

In wenigen Tumorentitäten, beispielsweise dem kolorektalen Karzinom, hat SIRT-1 antiproliferative Eigenschaften (Firestein et al., 2008). Eine differenzierte Betrachtung des durch SIRT-1 deacetylierten p53 liefert eine mögliche Erklärung hierfür: SIRT-1 hindert p53 an der Translokation in den Zellkern, d.h. es blockiert zunächst die transkriptions-abhängige Apoptose durch p53. Dadurch akkumuliert p53 im Zytosol, woraus eine gesteigerte Passage dessen in Mitochondrien resultiert. Die Mitochondrien induzieren daraufhin via Cytochrom C eine transkriptionsunabhängige Apoptose. Diese könnte zu den beschriebenen antiproliferativen Eigenschaften des Sirtuins in einigen Tumorentitäten führen (Yi und Luo, 2010). Die genannten Mechanismen zur Apoptoseeinleitung durch SIRT-1 sind in Abbildung 28 graphisch dargestellt.

Die Rolle von SIRT-1 in der zervikalen Dysplasie ist bislang unzureichend geklärt. Um die Erkenntnisse im Hinblick auf die Funktion von SIRT-1 in der zervikalen Dysplasie zu ergänzen, sollte die Wirkung des Sirtuins auf andere Nicht-Histon-Proteine wie FoxP3 genauer beleuchtet werden.

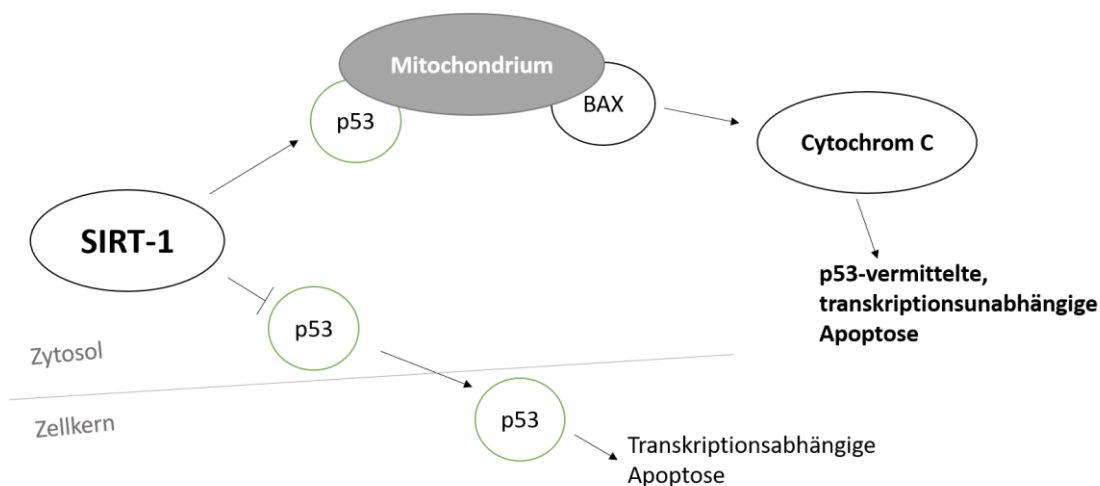


Abbildung 28: Transkriptionsunabhängige Apoptose durch SIRT-1 (Quelle: Eigene Darstellung)

Zwar mindert SIRT-1 die transkriptionsabhängige Apoptose, jedoch kann durch vermehrte Akkumulation von p53 im Zytosol gesteigert transkriptionsUNabhängige Apoptose stattfinden.

## 6.7 Diagnostische und therapeutische Relevanz der vorliegenden Ergebnisse

Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, stellt die Entscheidung für oder gegen eine operative Therapie im Falle einer CIN II eine Herausforderung dar, da die CIN II – im Gegensatz zu CIN I und CIN III – sowohl konservativ als auch operativ versorgt werden kann. Je nach Befundpersistenz, HPV-Status und potentielltem Kinderwunsch wird entweder ein operatives Verfahren angestrebt oder aber auf eine Konisation verzichtet und in regelmäßigen Abständen kontrolliert (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Es ist somit erstrebenswert, prognostische Marker zu identifizieren, welche die Entscheidungsfindung hinsichtlich der Therapie maßgeblich erleichtern könnten (Vattai et al., 2021). Bislang wird lediglich der Biomarker p16/Ki-67 angewendet, welcher in grenzwertigen oder unklaren Fällen wie Pap IIp, IIID oder IIIp zur weiteren Diagnostik als Alternative zum HPV-Test hinzugezogen werden kann (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

In der vorliegenden Studie wurden signifikante Unterschiede zwischen Regression und Progression der CIN II in Bezug auf die Anzahl der sich im Gewebe befindlichen Tregs beobachtet. Ebenso war dies der Fall bei der epithelialen CCL22-Expression. Sollten sich diese Ergebnisse in weiteren Studien erneut bestätigen, könnten die beiden Marker FoxP3 und CCL22 in der

CIN II zur Entscheidung für oder wider eine operative Therapie herangezogen werden. Zudem lag in der vorliegenden Arbeit häufig ein deutlicherer Unterschied zwischen CIN I und CIN II vor, wohingegen der Unterschied zwischen CIN II und CIN III weniger stark ausgeprägt war. Dies war bei FoxP3, CCL22 und RIG-I der Fall. Die Beobachtung unterstreicht ein ähnliches biologisches Verhalten von CIN II und CIN III, was die Klassifikation der CIN II als HSIL stützt (Vattai et al., 2023). Da aus zahlreichen Studien hervorgeht, dass im Falle einer CIN II eine nicht zu vernachlässigende Regressionschance besteht (vgl. Kapitel 2.1), gilt es, genau jene Patientinnen zu identifizieren, deren Dysplasie sich zu einer hohen Wahrscheinlichkeit ohne Therapie zurückbilden würde.

### 6.8 Einschränkungen der Studie

Ein Nachteil der in dieser Arbeit durchgeführten Studie besteht darin, dass lediglich Patientinnen der Dysplasiesprechstunde der Ludwig-Maximilians-Universität München und keiner weiteren Dysplasiezentren in die Studie eingeschlossen wurden. Des Weiteren handelt es sich um eine retrospektive Studie, in der die Daten, teils semiquantitativ, mittels Immunhistochemie und Doppelimmunfluoreszenz erhoben wurden. Es ist zudem anzumerken, dass es sich bei den in der Immunfluoreszenz untersuchten Schnitten um repräsentative Schnitte, nämlich mindestens jeweils 10 % des Kollektivs, handelt (Vattai et al., 2021).

Ein Vorteil bestand in der vorliegenden Studie in der Größe des Kollektivs. Insbesondere die Gruppen der Regression und Progression der CIN II waren hier deutlich umfangreicher als in anderen vergleichbaren Studien: In der vorliegenden Studie waren es 47 Patientinnen mit einer CIN II mit anschließender Regression und 49 Patientinnen mit einer CIN II mit anschließender Progression; das sind mehr als doppelt so viele Patientinnen wie beispielsweise in der Studie von Hester et al, 2019 (hier waren es 22 Patientinnen (CIN II mit Regression) bzw. 23 Patientinnen (CIN II mit Progression)).

## 7 Resümee und Ausblick

Bislang gibt es im klinischen Kontext der CIN keine etablierten Biomarker, welche zur Einschätzung des weiteren Verlaufs der Dysplasie herangezogen werden. Das in diesem Zusammenhang prominenteste Beispiel derzeit ist der Biomarker p16/Ki-67, der zur Diagnosestellung nach unklarem Pap-Befund dienen kann (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

In dieser Arbeit wurden primär zwei Ziele verfolgt: Zunächst sollten neue Erkenntnisse über potenzielle prognostische Marker erlangt werden, welche in der Zukunft bei der Therapiewahl, insbesondere im Falle einer CIN II, helfen sollen. Des Weiteren sollen die hier gewonnenen Erkenntnisse dazu beitragen, mögliche Angriffspunkte für medikamentöse Therapien zu identifizieren. Fokus dieser Arbeit war die Interaktion CD68-positiver Makrophagen über das Chemokin CCL22 mit Tregs, welche in der zervikalen Dysplasie bislang unzureichend untersucht ist. Darüber hinaus wurden die Expressionslevels von PPAR $\gamma$ , RIG-I sowie SIRT-1 immunhistochemisch evaluiert.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, dass sowohl FoxP3 als auch CCL22 in der Progression der Dysplasie gegenüber den regredienten Fällen signifikant erhöht waren. Die Ergebnisse legen nahe, dass die beiden Antigene als prognostische Biomarker infrage kommen. Die Doppelimmunfluoreszenzen unterstützen die Hypothese, dass durch M2-Makrophagen sezerniertes CCL22 die Tregs spezifisch in das Dysplasie-umgebende Stroma rekrutiert (Vattai et al., 2023).

Die Ergebnisse sollten in weiteren Studien verifiziert werden, um zukünftig einen klinischen Nutzen der Marker zu gewinnen und somit Patientinnen vor einer Übertherapie bewahren zu können.

Im Zervixkarzinom werden Immuncheckpoint-Inhibitoren als medikamentöse Therapieansätze bereits klinisch getestet (vgl. Kapitel 0). Die in der CIN erhöhten Expressionsraten von FoxP3 und CCL22 sprechen für das Potenzial medikamentöser Immuntherapien auch in präkanzerösen Läsionen.

## 8 Kongressbeiträge und Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des Kongresses der Bayerischen Gesellschaft für Gynäkologie und Frauenheilkunde e.V. als **Abstract** in der GebFra veröffentlicht:

*KREMER, N., VATTAI, A., SCHMOECKEL, E., MEISTER, S., BEYER, S., CZOGALLA, B., FÜRST, S., MAHNER, S., CORRADINI, S., JESCHKE, U., KOLBEN, T. UND KOLBEN, T. 2020. Rolle der Makrophagendifferenzierung und -interaktion mit regulatorischen T-Zellen bei der Progression und Regression der HPV-induzierten Zervixdysplasie. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, Ausgabe 07, Volume 80, Juli 2020.*

Im Rahmen des Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe wurden Teile der Ergebnisse als **Poster** präsentiert:

*KREMER, N., VATTAI, A., SCHMOECKEL, E., MEISTER, S., BEYER, S., CZOGALLA, B., FÜRST, S., MAHNER, S., CORRADINI, S., JESCHKE, U., KOLBEN, T. UND KOLBEN, T. 2020. Rolle der Makrophagendifferenzierung und -interaktion mit regulatorischen T-Zellen bei der Progression und Regression der HPV-induzierten Zervixdysplasie.*

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in internationalen Fachzeitschriften als **Originalarbeiten** veröffentlicht:

*VATTAI, A., KREMER, N., MEISTER, S., BEYER, S., KEILMANN, L., HESTER, A., TEMELKOV, M., HEIDEGGER, H., SCHMOECKEL, E., KESSLER, M., MAHNER, S., JESCHKE, U., HERTLEIN, L., KOLBEN, T.*

***Role of FoxP3-positive regulatory T-cells in regressive and progressive cervical dysplasia. J Cancer Res Clin Oncol, 2021.***

*VATTAI, A., KREMER, N., MEISTER, S., BEYER, S., KEILMANN, L., HESTER, A., BUSCHMANN, C., CORRADINI, S., SCHMOECKEL, E., KESSLER, M., MAHNER, S., JESCHKE, U., HERTLEIN, L., KOLBEN, T.*

***Increase of the T-reg-recruiting chemokine CCL22 expression in a progressive course of cervical dysplasia. J Cancer Res Clin Oncol, 2023.***

## Literaturverzeichnis

- Adurthi, S., Krishna, S., Mukherjee, G., Bafna, U. D., Devi, U., & Jayshree, R. S. (2008). ORIGINAL ARTICLE: Regulatory T Cells in a Spectrum of HPV-Induced Cervical Lesions: Cervicitis, Cervical Intraepithelial Neoplasia and Squamous Cell Carcinoma. *60*(1), 55-65.
- Allison, S. J., Jiang, M., & Milner, J. (2009). Oncogenic viral protein HPV E7 up-regulates the SIRT1 longevity protein in human cervical cancer cells. *Aging (Albany NY)*, *1*(3), 316-327.
- Altmeyer, P. (2017). Altmeyers Enzyklopädie. CCL22. <https://www.altmeyers.org/de/allergologie/ccl22-26573> (abgerufen am: 10.02.2021)
- Alves-Fernandes, D. K., & Jasiulionis, M. G. (2019). The Role of SIRT1 on DNA Damage Response and Epigenetic Alterations in Cancer. *International journal of molecular sciences*, *20*(13).
- Appleby, P., Beral, V., Berrington de González, A., Colin, D., Franceschi, S., Goodill, A., Green, J., Pato, J., Plummer, M., Sweetland, S. (2006). Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer*, *118*(6), 1481-1495.
- Arbyn, M., Kyrgiou, M., Simoens, C., Raifu, A. O., Koliopoulos, G., Martin-Hirsch, P., Prendiville, W., Paraskevaidis, E. (2008). Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, *337*, a1284.
- Arends, M. J., Buckley, C. H., & Wells, M. (1998). Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol*, *51*(2), 96-103.
- Asaka, R., Miyamoto, T., Yamada, Y., Ando, H., Mvunta, D. H., Kobara, H., & Shiozawa, T. (2015). Sirtuin 1 promotes the growth and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cells: a novel therapeutic target. *Lab Invest*, *95*(12), 1363-1373.
- Athanasiou, A., Veroniki, A. A., Efthimiou, O., Kalliala, I., Naci, H., Bowden, S., Paraskevaidi, M., Martin-Hirsch, P., Bennett, P., Paraskevaidis, E., Salanti, G., Kyrgiou, M. (2019). Comparative fertility and pregnancy outcomes after local treatment for cervical intraepithelial neoplasia and stage 1a1 cervical cancer: protocol for a systematic review and network meta-analysis from the CIRCLE group. *BMJ open*, *9*(10), e028009-e028009.
- Bai, W., & Zhang, X. (2016). Nucleus or cytoplasm? The mysterious case of SIRT1's subcellular localization. *Cell Cycle*, *15*(24), 3337-3338.
- Bailur, J. K., Gueckel, B., Derhovanessian, E., & Pawelec, G. (2015). Presence of circulating Her2-reactive CD8 + T-cells is associated with lower frequencies of myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells, and better survival in older breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, *17*(1), 34.



- Baitsch, L., Fuertes-Marraco, S. A., Legat, A., Meyer, C., & Speiser, D. E. (2012). The three main stumbling blocks for anticancer T cells. *Trends Immunol*, 33(7), 364-372.
- Bandola-Simon, J., & Roche, P. A. (2019). Dysfunction of antigen processing and presentation by dendritic cells in cancer. *Mol Immunol*, 113, 31-37.
- Bashaw, A. A., Teoh, S. M., Tuong, Z. K., Leggatt, G. R., Frazer, I. H., & Chandra, J. (2019). HPV16 E7-Driven Epithelial Hyperplasia Promotes Impaired Antigen Presentation and Regulatory T-Cell Development. *J Invest Dermatol*, 139(12), 2467-2476.e2463.
- Beier, U. H., Wang, L., Bhatti, T. R., Liu, Y., Han, R., Ge, G., & Hancock, W. W. (2011). Sirtuin-1 targeting promotes Foxp3+ T-regulatory cell function and prolongs allograft survival. *Mol Cell Biol*, 31(5), 1022-1029.
- Boelens, M. C., Wu, T. J., Nabet, B. Y., Xu, B., Qiu, Y., Yoon, T., Azzam, D.J., Twyman-Saint Victor, C., Wiemann, B.Z., Ishwaran, H., Ter Brugge, P.J., Jonkers, J., Slingerland, J., Minn, A. J. (2014). Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell*, 159(3), 499-513.
- Bolpetti, A., Silva, J. S., Villa, L. L., & Lepique, A. P. (2010). Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunology*, 11(1), 27.
- Bonin, C. M., Padovani, C. T. J., da Costa, I. P., Ávila, L. S., Ferreira, A. M. T., Fernandes, C. E. S., Dos Santos, A. R., Tozetti, I. A. (2019). Detection of regulatory T cell phenotypic markers and cytokines in patients with human papillomavirus infection. *J Med Virol*, 91(2), 317-325.
- Bosch, F. X., & de Sanjosé, S. (2003). Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*(31), 3-13.
- Bouhlef, M. A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dièvert, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., Staels, B., Chinetti-Gbaguidi, G. (2007). PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*, 6(2), 137-143.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E., & Band, V. (1996). E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cancer research*, 56(20), 4620-4624.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424.
- Castellsagué, X., Bosch, F. X., & Muñoz, N. (2002). Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research*, 89(2), 191-199.
- Chellappan, S., Kraus, V. B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P. M., Phelps, W. C., & Nevins, J. R. (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), 4549-4553.

- Chen, X.-J., Han, L.-F., Wu, X.-G., Wei, W.-F., Wu, L.-F., Yi, H.-Y., Yan, R.-M., Bai, X.-Y., Zhong, M., Yu, Y.-H., Liang, L., Wang, W. (2017). Clinical Significance of CD163+ and CD68+ Tumor-associated Macrophages in High-risk HPV-related Cervical Cancer. *Journal of Cancer*, 8(18), 3868-3875.
- Cheng, S., Qian, K., Wang, Y., Wang, G., Liu, X., Xiao, Y., & Wang, X. (2019). PPAR $\gamma$  inhibition regulates the cell cycle, proliferation and motility of bladder cancer cells. *J Cell Mol Med*, 23(5), 3724-3736.
- Chiang, C., Pauli, E. K., Biryukov, J., Feister, K. F., Meng, M., White, E. A., Münger, K., Howley, P. M., Meyers, C., Gack, M. U. (2018). The Human Papillomavirus E6 Oncoprotein Targets USP15 and TRIM25 To Suppress RIG-I-Mediated Innate Immune Signaling. *J Virol*, 92(6).
- Chiu, Y. H., Macmillan, J. B., & Chen, Z. J. (2009). RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell*, 138(3), 576-591.
- Chung, H. C., Ros, W., Delord, J. P., Perets, R., Italiano, A., Shapira-Frommer, R., Manzuk, L., Piha-Paul, S. A., Xu, L., Zeigenfuss, S., Pruitt, S. K., Leary, A. (2019). Efficacy and Safety of Pembrolizumab in Previously Treated Advanced Cervical Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol*, 37(17), 1470-1478.
- Colamatteo, A., Carbone, F., Bruzzaniti, S., Galgani, M., Fusco, C., Maniscalco, G. T., Di Rella, F., De Candia, P., De Rosa, V. (2020). Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation. *Frontiers in immunology*, 10, 3136-3136.
- Colombo, N., Dubot, C., Lorusse, D., Caceres, M., Hasegawa, K., Shapira-Frommer, R., Tewari, L., Salman, P., Hoyos Usta, E., Yanez, E., Gü,üs, M., Olivera Hurtado de Mendoza, M., Samouelian, V., Castonguay, V., Arkhipov, A., Toker, S., Li, K., Keefe, S., Monk, B. (2021). Pembrolizumab for Persistent, Recurrent, or Metastatic Cervical Cancer. *NEJM*, 385(20): 1856-1867.
- Cremonesi, E., Governa, V., Garzon, J. F. G., Mele, V., Amicarella, F., Muraro, M. G., . . . lezzi, G. (2018). Gut microbiota modulate T cell trafficking into human colorectal cancer. *Gut*, 67(11), 1984-1994.
- Curiel, T. J. (2008). Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol*, 20(2), 241-246.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., . . . Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, 10(9), 942-949.
- Darragh, T. M., Colgan, T. J., Cox, J. T., Heller, D. S., Henry, M. R., Luff, R. D., McCalmont T., Nayar, R., Palefsky, J. M., Stoler, M. H., Wilkinson, E. J., Zaino, R. J., Wilbur, D. C. (2012). The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis*, 16(3), 205-242.

## Literaturverzeichnis

- Darvin, P., Toor, S. M., Sasidharan Nair, V., & Elkord, E. (2018). Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med*, 50(12), 1-11.
- Das, D., Smith, N., Wang, X., & Morgan, I. M. (2017). The Deacetylase SIRT1 Regulates the Replication Properties of Human Papillomavirus 16 E1 and E2. *J Virol*, 91(10).
- Davidson, B., Goldberg, I., & Kopolovic, J. (1997). Inflammatory Response in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. *Pathology - Research and Practice*, 193(7), 491-495.
- De Jong, R. A., & al., e. (2009). Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 114(1), 105-110.
- De Visser, K. E., Schumacher, T. N., & Kruisbeek, A. M. (2003). CD8+ T cell tolerance and cancer immunotherapy. *J Immunother*, 26(1), 1-11.
- Demir, L., Yigit, S., Ellidokuz, H., Erten, C., Somali, I., Kucukzeybek, Y., Alacacioglu, A., Cokmert, S., Can, A., Akyol, M., Dirican, A., Bayoglu, V., Sari, A.A., Tarhan, M. O. (2013). Predictive and prognostic factors in locally advanced breast cancer: effect of intratumoral FOXP3+ Tregs. *Clin Exp Metastasis*, 30(8), 1047-1062.
- Deng, L., Zhang, H., Luan, Y., Zhang, J., Xing, Q., Dong, S., Wu, X., Liu, M., Wang, S. (2010). Accumulation of foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 16(16), 4105-4112.
- Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ): Internetauftritt des Krebsinformationsdienstes. Impfung gegen Humane Papillomaviren (HPV). <https://www.krebsinformationsdienst.de/vorbeugung/risiken/hpv-impfung.php> (abgerufen am: 19.02.2021)
- Dixit, E., & Kagan, J. C. (2013). Intracellular pathogen detection by RIG-I-like receptors. *Adv Immunol*, 117, 99-125.
- Douglass, S., Meeson, A. P., Overbeck-Zubrzycka, D., Brain, J. G., Bennett, M. R., Lamb, C. A., Lennard, T. W., Browell, D., Ali, S., Kirby, J. A. (2014). Breast cancer metastasis: demonstration that FOXP3 regulates CXCR4 expression and the response to CXCL12. *J Pathol*, 234(1), 74-85.
- Drolet, M., Benard, E., Perez, N., & Brisson, M. (2019). Population-level impact and herd effects following the introduction of human papillomavirus vaccination programmes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 394, 497-509.
- Dyck, L., & Mills, K. H. G. (2017). Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol*, 47(5), 765-779.
- Ellermeier, J., Wei, J., Duester, P., Hoves, S., Stieg, M. R., Adunka, T., Noerenberg, D., Anders, H. J., Mayr, D., Poeck, H., Hartmann, G., Endres, S., Schnurr, M. (2013). Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF- $\beta$ 1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer research*, 73(6), 1709-1720.

- Europäische Kommission - Internetauftritt der Europäischen Kommission (2022): *Union Register of medical products for human use*.  
<https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h1024.htm>  
(abgerufen am: 09.05.2022)
- Faget, J., Biota, C., Bachelot, T., Gobert, M., Treilleux, I., Goutagny, N., Durand, I., Léon-Goddard, S., Blay, J. Y., Caux, C., Ménétrier-Caux, C. (2011). Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer research*, 71(19), 6143-6152.
- Firestein, R., Blander, G., Michan, S., Oberdoerffer, P., Ogino, S., Campbell, J., Bhimavarapura, A., Luikenuis, S., De Cabo, R., Fuhs, C., Hahn, W. C., Guarente, L. P., Sinclair, D. A. (2008). The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PloS one*, 3(4), e2020.
- Fischer, L., & Heinemann, V. (2020). Checkpoint-Inhibitoren bei Plattenepithelkarzinomen - Im Fokus: HNO-, Zervix- und Analkarzinome. *Trillium Krebsmedizin*, 02.
- Frenel, J. S., Le Tourneau, C., O'Neil, B., Ott, P. A., Piha-Paul, S. A., Gomez-Roca, C., Van Brummelen, E. M. J., Rugo, H., Thomas, S., Saraf, S., Rangwala, R., Varga, A. (2017). Safety and Efficacy of Pembrolizumab in Advanced, Programmed Death Ligand 1-Positive Cervical Cancer: Results From the Phase Ib KEYNOTE-028 Trial. *J Clin Oncol*, 35(36), 4035-4041.
- Fu, Q., Chen, N., Ge, C., Li, R., Li, Z., Zeng, B., Li, C., Wang, Y., Song, X., Li, H., Li, G. (2019). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*, 8(7), 1593806-1593806.
- Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., Iktani, M., Oya, T., Kanatani, Y., Tsuneyama, K., Nagai, Y., Takatsu, K., Urakaze, M., Kobayashi, M., Tobe, K. (2009). Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 58(11), 2574-2582.
- Galon, J., & al, e. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313(5795), 1960-1964.
- Generali, D., Bates, G., Berruti, A., Brizzi, M. P., Campo, L., Bonardi, S., Bersiga, A., Allevi, G., Milani, M., Aguggini, S., Dogliotti, L., Banham, A., Harris, A., Bottini, A., Fox, S. B. (2009). Immunomodulation of FOXP3+ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 15(3), 1046-1051.
- Gillespie, W., Tyagi, N., & Tyagi, S. C. (2011). Role of PPARgamma, a nuclear hormone receptor in neuroprotection. *Indian J Biochem Biophys*, 48(2), 73-81.
- Gionfriddo, G., Plastina, P., Augimeri, G., Catalano, S., Giordano, C., Barone, I., Morelli, C., Giordano, F., Geksomino, L., Sisci, D., Witkamp, R., Ando, S., van Norren, K., Bonofiglio, D. (2020). Modulating Tumor-Associated Macrophage Polarization by Synthetic and Natural PPARγ Ligands as a Potential Target in Breast Cancer. *Cells*, 9(1).
- Godfrey, V. L., Wilkinson, J. E., Rinchik, E. M., & Russell, L. B. (1991). Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. *Proceedings of*

*the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), 5528-5532.

- Godiska, R., Chantry, D., Raport, C. J., Sozzani, S., Allavena, P., Leviten, D., Mantovani, A., Gray, P. W. (1997). Human Macrophage-derived Chemokine (MDC), a Novel Chemoattractant for Monocytes, Monocyte-derived Dendritic Cells, and Natural Killer Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 185(9), 1595-1604.
- Griffiths, H. R., Gao, D., & Pararasa, C. (2017). Redox regulation in metabolic programming and inflammation. *Redox Biol*, 12, 50-57.
- Günther, C., & Pfeiffer, C. (2007). Chemokine in der Pathogenese der atopischen Dermatitis. *Allergo Journal*, 16(3), 186-192.
- Gupta, S., Takhar, P. P. S., Degenkolbe, R., Heng Koh, C., Zimmermann, H., Maolin Yang, C., Guan Sim, K., I-Hunong Hsu, S., Bernard, H.-U. (2003). The human papillomavirus type 11 and 16 E6 proteins modulate the cell-cycle regulator and transcription cofactor TRIP-Br1. *Virology*, 317(1), 155-164.
- Hartwig, T., Montinaro, A., von Karstedt, S., Sevko, A., Surinova, S., Chakravarthy, A., Taraborrelli, L., Draber, P., Lafont, E., Arce Vargas, F., El-Bahrawy, M., Quezada, S., Walczak, H. (2017). The TRAIL-Induced Cancer Secretome Promotes a Tumor-Supportive Immune Microenvironment via CCR2. *Mol Cell*, 65(4), 730-742.e735.
- Hatzioannou, A., Banos, A., Sakelaropoulos, T., Fedonidis, C., Vidali, M. S., Köhne, M., . . . Verginis, P. (2020). An intrinsic role of IL-33 in T(reg) cell-mediated tumor immunoevasion. *Nat Immunol*, 21(1), 75-85.
- Haubner, S. (2017). *Expression der regulatorische-T-Zell-rekrutierenden Chemokine CCL22 und CCL28 im humanen Mammakarzinom*. Universitätsbibliothek Elektronische Hochschulschriften LMU (<https://edoc.ub.uni-muenchen.de/22292/>) (abgerufen am: 20.02.2022)
- Herbert, A. (2000). Cervical screening: how often should women be screened? *Cytopathology*, 11(2), 75-81.
- Hester, A., Ritzer, M., Kuhn, C., Schmoeckel, E., Mayr, D., Kolben, T., Dannecker, C., Mahner, S., Jeschke, U., Kolben, T. M. (2019). The role of EP3-receptor expression in cervical dysplasia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145(2), 313-319.
- Heublein, S., Vrekoussis, T., Kuhn, C., Friese, K., Makrigiannakis, A., Mayr, D., . . . Jeschke, U. (2013). Inducers of G-protein coupled estrogen receptor (GPER) in endometriosis: potential implications for macrophages and follicle maturation. *J Reprod Immunol*, 97(1), 95-103.
- Heusinkveld, M., de Vos van Steenwijk, P. J., Goedemans, R., Ramwadhoebe, T. H., Gorter, A., Welters, M. J. P., van Hall, T., van der Burg, S. H. (2011). M2 Macrophages Induced by Prostaglandin E+ and IL-6 from Cervical Carcinoma Are Switched to Activated M1 Macrophages by CD4+ Th1 Cells. *The Journal of Immunology*, 187(3), 1157-1165.
- Hinz, S. (2007). Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer research*, 67, 8344-8350.

- Hori, Y. S., Kuno, A., Hosoda, R., & Horio, Y. (2013). Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. *PLoS one*, 8(9), e73875.
- Hsieh, M. C., Van Dyne, E., Lefante, C., Shapiro, J. A., Pordell, P., Lynch, M. A., Gomez, N., Mumphrey, B., Maniscalco, L., Jetly-Shridar, R., Saraiya, M., Wu, X. C. (2019). Evaluating the Use of LAST 2-Tiered Nomenclature and Its Impact on Reporting Cervical Lesions in a Population-Based Cancer Registry. *J Registry Manag*, 46(4), 120-127.
- Hu, J. M., Liu, K., Liu, J. H., Jiang, X. L., Wang, X. L., Chen, Y. Z., . . . Li, F. (2017). CD163 as a marker of M2 macrophage, contribute to predicted aggressiveness and prognosis of Kazakh esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(13), 21526-21538.
- Hu, W., Qian, Y., Yu, F., Liu, W., Wu, Y., Fang, X., & Hao, W. (2015). Alternatively activated macrophages are associated with metastasis and poor prognosis in prostate adenocarcinoma. *Oncol Lett*, 10(3), 1390-1396.
- Huang, R., Zhang, J., Li, M., Yan, P., Yin, H., Zhai, S., . Zhu, X., HU, P., Zhang, J., Huang, L., Li, M., Sun, Z., Meng, T., Yang, D., Huang, Z. (2020). The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Pan-Cancer. *PPAR Res*, 2020, 6527564.
- Huang, S. C., Wei, P. C., Hwang-Verslues, W. W., Kuo, W. H., Jeng, Y. M., Hu, C. M., Shew, J., Huang, C., Chang, K., Lee, E., Lee, W. H. (2017). TGF- $\beta$ 1 secreted by Tregs in lymph nodes promotes breast cancer malignancy via up-regulation of IL-17RB. *EMBO Mol Med*, 9(12), 1660-1680.
- Huang, Y.-H., Chang, C.-Y., Kuo, Y.-Z., Fang, W.-Y., Kao, H.-Y., Tsai, S.-T., & Wu, L.-W. (2019). Cancer-associated fibroblast-derived interleukin-1 $\beta$  activates protumor C-C motif chemokine ligand 22 signaling in head and neck cancer. *Cancer Science*, 110(9), 2783-2793.
- Huang, Y. H., Chang, C. Y., Kuo, Y. Z., Fang, W. Y., Kao, H. Y., Tsai, S. T., & Wu, L. W. (2019). Cancer-associated fibroblast-derived interleukin-1 $\beta$  activates protumor C-C motif chemokine ligand 22 signaling in head and neck cancer. *Cancer Sci*, 110(9), 2783-2793.
- Huffman, D. M., Grizzle, W. E., Bamman, M. M., Kim, J. S., Eltoum, I. A., Elgavish, A., & Nagy, T. R. (2007). SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer research*, 67(14), 6612-6618.
- Human Protein Atlas; CCL22. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000102962-CCL22/cell> (abgerufen am: 10.02.2021)
- Human Protein Atlas; PPARgamma. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000132170-PPARG/tissue> (abgerufen am: 10.02.2021)
- Iellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F., & D'Ambrosio, D. (2001). Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*, 194(6), 847-853.
- Imaizumi, T., Yagihashi, N., Kubota, K., Yoshida, H., Sakaki, H., Yagihashi, S., Kimuri, H., Satoh, K. (2007). Expression of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) in macrophages: possible involvement of RIG-I in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 14(2), 51-55.

- Insinga, R. P., Glass, A. G., & Rush, B. B. (2004). Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol*, 191(1), 105-113.
- Jang, T. J. (2008). Prevalence of Foxp3 positive T regulatory cells is increased during progression of cutaneous squamous tumors. *Yonsei medical journal*, 49(6), 942-948.
- Jeremiasen, M., Borg, D., Hedner, C., Svensson, M., Nodin, B., Leandersson, K., Johannson, J., Jirstrom, K. (2020). Tumor-Associated CD68(+), CD163(+), and MARCO(+) Macrophages as Prognostic Biomarkers in Patients With Treatment-Naïve Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Front Oncol*, 10, 534761.
- Jiang, S., Yang, Y., Fang, M., Li, X., Yuan, X., & Yuan, J. (2016). Co-evolution of tumor-associated macrophages and tumor neo-vessels during cervical cancer invasion. *Oncol Lett*, 12(4), 2625-2631.
- Jørgensen, N., Persson, G., & Hviid, T. V. F. (2019). The Tolerogenic Function of Regulatory T Cells in Pregnancy and Cancer. *Frontiers in immunology*, 10, 911.
- Jung, K. H., LoRusso, P., Burris, H., Gordon, M., Bang, Y. J., Hellmann, M. D., . . . Davis, S. L. (2019). Phase I Study of the Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor Navoximod (GDC-0919) Administered with PD-L1 Inhibitor (Atezolizumab) in Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, 25(11), 3220-3228.
- Jung, T. I., Baek, W. K., Suh, S. I., Jang, B. C., Song, D. K., Bae, J. H., Kwon, K., Bae, J., Cha, S., Bae, I., Cho, C. H. (2005). Down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*, 97(2), 365-373.
- Karim, R., Meyers, C., Backendorf, C., Ludigs, K., Offringa, R., van Ommen, G. J., Melief, C., Van der Burg, S., Boer, J. M. (2011). Human papillomavirus deregulates the response of a cellular network comprising of chemotactic and proinflammatory genes. *PLoS one*, 6(3), e17848.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., . . . Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089), 101-105.
- Kim, J., & Bae, J.-S. (2016). Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators of Inflammation*, 2016, 6058147.
- Klaes, R., Benner, A., Friedrich, T., Ridder, R., Herrington, S., Jenkins, D., Kurman, R., Schmidt, D., Stoler, M., von Knebel Doeberitz, M. (2002). p16INK4a Immunohistochemistry Improves Interobserver Agreement in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *The american journal of surgical pathology* 26(11), 1389-1399.
- Kobayashi, N., Hiraoka, N., Yamagami, W., Ojima, H., Kanai, Y., Kosuge, T., Nakajima, A., Hirohashi, S. (2007). FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 13(3), 902-911.
- Kojima, S., Kawana, K., Tomio, K., Yamashita, A., Taguchi, A., Miura, S., . . . Kozuma, S. (2013). The Prevalence Of Cervical Regulatory T Cells in HPV-Related Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) Correlates Inversely with Spontaneous

- Regression of CIN. *American Journal of Reproductive Immunology*, 69(2), 134-141.
- Kolben, T. M., Etzel, L. T., Bergauer, F., Hagemann, I., Hillemanns, P., Repper, M., Kaufmann, A., Sotlar, K., Kolben, T., Helms, H., Gallwas, J., Mahner, S., Dannecker, C. (2019). A randomized trial comparing limited-excision conisation to Large Loop Excision of the Transformation Zone (LLETZ) in cervical dysplasia patients. *J Gynecol Oncol*, 30(3).
- Kolben, T. M., Kraft, F., Kolben, T., Goess, C., Semmlinger, A., Dannecker, C., Schmoeckel, E., Mayr, D., Sommer, N., Mahner, S., Jeschke, U. (2017). Expression of Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis x, Lewis y, Gal-3, Gal-7, STMN1 and p16 in cervical dysplasia. *Future Oncol*, 13(2), 145-157.
- Kolben, T. M., Rogatsch, E., Vattai, A., Hester, A., Kuhn, C., Schmoeckel, E., Mahner, S., Jeschke, U., Kolben, T. (2018). PPAR $\gamma$  Expression Is Diminished in Macrophages of Recurrent Miscarriage Placentas. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1872.
- Komatsu, N., Mariotti-Ferrandiz, M. E., Wang, Y., Malissen, B., Waldmann, H., & Hori, S. (2009). Heterogeneity of natural Foxp3<sup>+</sup> T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1903-1908.
- Kurman, R., Carcangiu, M., Herrington, C., & Young, R. (2014). WHO classification of tumours of the female reproductive organs. WHO classification of tumours. *IARC press, Lyon*.
- Kutikhin, A. G., & Yuzhalin, A. E. (2012). Inherited variation in pattern recognition receptors and cancer: dangerous liaisons? *Cancer Manag Res*, 4, 31-38.
- Kyrgiou, M., Athanasiou, A., Kalliala, I. E. J., Paraskevaïdi, M., Mitra, A., Martin-Hirsch, P. P., Arbyn, M., Bennett, P., Paraskevaïdis, E. (2017). Obstetric outcomes after conservative treatment for cervical intraepithelial lesions and early invasive disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, 11(11), CD012847-CD012847.
- Kyrgiou, M., Athanasiou, A., Paraskevaïdi, M., Mitra, A., Kalliala, I., Martin-Hirsch, P., Arbyn, M., Bennett, P., Paraskevaïdis, E. (2016). Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 354, i3633-i3633.
- Lee, S. H., Lee, J. H., Lee, H. Y., & Min, K. J. (2019). Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB Rep*, 52(1), 24-34.
- Lei, J., Ploner, A., Elfström, K. M., Wang, J., Roth, A., Fang, F., Sundström, K., Dillner, J., Sparén, P. (2020). HPV Vaccination and the Risk of Invasive Cervical Cancer. *N Engl J Med*, 383(14), 1340-1348.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Prävention des Zervixkarzinoms, Langversion 1.1, 2020, AWMF Registernummer: 015/027OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/zervixkarzinom-praevention/> (abgerufen am: 02.01.2022)



- Lepique, A. P., Daghestanli, K. R. P., Cuccovia, I. M., & Villa, L. L. (2009). HPV16 Tumor Associated Macrophages Suppress Antitumor T Cell Responses. *Clinical Cancer Research*, 15(13), 4391-4400.
- Li, H., Sorenson, A. L., Poczobutt, J., Amin, J., Joyal, T., Sullivan, T., Crossno, J., Weiser-Evans, M., Nemenoff, R. A. (2011). Activation of PPAR $\gamma$  in myeloid cells promotes lung cancer progression and metastasis. *PLoS one*, 6(12), e28133.
- Li, X., Gao, Y., Li, J., Zhang, K., Han, J., Li, W., . . . Zhang, C. (2018). FOXP3 inhibits angiogenesis by downregulating VEGF in breast cancer. *Cell death & disease*, 9(7), 744-744.
- Li, Y., Huang, G., & Zhang, S. (2017). Associations between intratumoral and peritumoral M2 macrophage counts and cervical squamous cell carcinoma invasion patterns. *Int J Gynaecol Obstet*, 139(3), 346-351.
- Li, Y. Q., Liu, F. F., Zhang, X. M., Guo, X. J., Ren, M. J., & Fu, L. (2013). Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer. *PLoS one*, 8(10), e76379.
- Liu, X., Meng, L., Chen, L., Liang, Y., Wang, B., Shao, Q., Wang, H., Yang, X. (2020). IL-6 expression promoted by Poly(I:C) in cervical cancer cells regulates cytokine expression and recruitment of macrophages. *J Cell Mol Med*, 24(3), 2284-2293.
- Liu, Y., Wang, J., Luo, S., Zhan, Y., & Lu, Q. (2020). The roles of PPAR $\gamma$  and its agonists in autoimmune diseases: A comprehensive review. *J Autoimmun*, 113, 102510.
- Lo Cigno, I., Calati, F., Albertini, S., & Gariglio, M. (2020). Subversion of Host Innate Immunity by Human Papillomavirus Oncoproteins. *Pathogens*, 9(4).
- Loddenkemper, C., Hoffmann, C., Stanke, J., Nagorsen, D., Baron, U., Olek, S., Huehn J., Ritz, J., Stein, H., Kaufmann, A., Schneider, A., Cichon, G. (2009). Regulatory (FOXP3+) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Cancer Science*, 100(6), 1112-1117.
- Loo, Y. M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M., Garcia-Sastre, A., Katze, M., Gale, M., Jr. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol*, 82(1), 335-345.
- Luhn, P., Walker, J., Schiffman, M., Zuna, R. E., Dunn, S. T., Gold, M. A., .Smith, K., Mathews, C., Allen, R., Zhang, R., Wang, S., Wentzensen, N. (2013). The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 128(2), 265-270.
- Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, 107(2), 137-148.
- Maeda, N., Yoshimura, K., Yamamoto, S., Kuramasu, A., Inoue, M., Suzuki, N., . . . Oka, M. (2014). Expression of B7-H3, a potential factor of tumor immune evasion in combination with the number of regulatory T cells, affects against recurrence-free survival in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol*, 21 Suppl 4(Suppl 4), S546-554.

- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, *454*(7203), 436-444.
- Meng, G., Xia, M., Xu, C., Yuan, D., Schnurr, M., & Wei, J. (2014). Multifunctional antitumor molecule 5'-triphosphate siRNA combining glutaminase silencing and RIG-I activation. *Int J Cancer*, *134*(8), 1958-1971.
- Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J. P., Chatterjee, V. K., Glass, C. K., Gonzalez, F. J., . . . Wahli, W. (2006). International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacological Reviews*, *58*(4), 726-741.
- Miyara, M., & Sakaguchi, S. (2007). Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*, *13*(3), 108-116.
- Muñoz, N., Manalastas, R., Jr., Pitisuttithum, P., Tresukosol, D., Monsonego, J., Ault, K., Clavel, C., Luna, J., Myers, E., Hood, S., Bautista, O., Bryan, J., Taddeo, F., Esser, M., Vuocolo, S., Haupt, R., Barr, R., Saah, A. (2009). Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in women aged 24-45 years: a randomised, double-blind trial. *Lancet*, *373*(9679), 1949-1957.
- Nan, P., Niu, Y., Wang, X., & Li, Q. (2019). MiR-29a function as tumor suppressor in cervical cancer by targeting SIRT1 and predict patient prognosis. *Onco Targets Ther*, *12*, 6917-6925.
- Narala, V. R., Subramani, P. A., Narasimha, V. R., Shaik, F. B., & Panati, K. (2014). The role of nitrated fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in modulating inflammation. *Int Immunopharmacol*, *23*(1), 283-287.
- Naumann, R. W., Hollebecque, A., Meyer, T., Devlin, M. J., Oaknin, A., Kerger, J., Lopez-Picazo, J., Machiels, J., Delord, J., Evans, T., Boni, V., Calvo, E., Topalian, S., Chen, T., Soumaoro, I., Li, B., Gu, J., Zwirter, R., Moore, K. N. (2019). Safety and Efficacy of Nivolumab Monotherapy in Recurrent or Metastatic Cervical, Vaginal, or Vulvar Carcinoma: Results From the Phase I/II CheckMate 358 Trial. *J Clin Oncol*, *37*(31), 2825-2834.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Cervical Cancer; Version 1.2020*. [www.nccn.org](http://www.nccn.org) (abgerufen am: 14.01.2020)
- Nauth, H.F. (2002): *Gynäkologische Zytdiagnostik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Ohue, Y., & Nishikawa, H. (2019). Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci*, *110*(7), 2080-2089.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., & Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer research*, *59*, 3128-3133.
- Pacifici, F., Di Cola, D., Pastore, D., Abete, P., Guadagni, F., Donadel, G., Bellia, A., Esposito, E., Salimei, S., Sinibaldi, P., Ricordi, C., Lauro, D., Della-Morte, D. (2019). Proposed Tandem Effect of Physical Activity and Sirtuin 1 and 3 Activation in Regulating Glucose Homeostasis. *International journal of molecular sciences*, *20*(19).

- Pandey, S., Mittal, R. D., Srivastava, M., Srivastava, K., Singh, S., Srivastava, S., & Mittal, B. (2009). Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (-196 to -174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. *Gynecol Oncol*, *114*(3), 501-505.
- Paraskevaïdis, E. (1992). A population-based study of microinvasive disease of the cervix--a colposcopic and cytologic analysis. *Gynecol Oncol* *45*(1), 9-12.
- Paraskevaïdis, E., Kitchener, H. C., Miller, I. D., Mann, E., Jandial, L., & Fisher, P. M. (1992). A population-based study of microinvasive disease of the cervix--a colposcopic and cytologic analysis. *Gynecol Oncol*, *45*(1), 9-12.
- Park, J. H., Lee, K. H., Jeon, B., Ochs, H. D., Lee, J. S., Gee, H. Y., Seo, S., Geum, D., Piccirillo, C., Eisenhut, M., Van der Vliet, H., Lee, M., Kronbichler, A., Ko, Y., Shin, J. I. (2020). Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome: A systematic review. *Autoimmun Rev*, *19*(6), 102526.
- Peggs, K. S., Quezada, S. A., & Allison, J. P. (2008). Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy. *Immunol Rev*, *224*, 141-165.
- Peng, G. L., Li, L., Guo, Y. W., Yu, P., Yin, X. J., Wang, S., & Liu, C. P. (2019). CD8(+) cytotoxic and FoxP3(+) regulatory T lymphocytes serve as prognostic factors in breast cancer. *Am J Transl Res*, *11*(8), 5039-5053.
- Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M., Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*, *429*(6993), 771-776.
- Ramachandran, B. (2017). Functional association of oestrogen receptors with HPV infection in cervical carcinogenesis. *Endocrin-Related Cancer*, *24*(4), R99.
- Reiser, J., Hurst, J., Voges, M., Krauss, P., Münch, P., Iftner, T., & Stubenrauch, F. (2011). High-risk human papillomaviruses repress constitutive kappa interferon transcription via E6 to prevent pathogen recognition receptor and antiviral-gene expression. *J Virol*, *85*(21), 11372-11380.
- Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987). Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe*, *8*(3), 138-140.
- Rigo, A., Gottardi, M., Zamò, A., Mauri, P., Bonifacio, M., Krampera, M., Damiani, E., Pizzolo, G., Vinante, F. (2010). Macrophages may promote cancer growth via a GM-CSF/HB-EGF paracrine loop that is enhanced by CXCL12. *Molecular Cancer*, *9*(1), 273.
- Rizzi, L., & Roriz-Cruz, M. (2018). Sirtuin 1 and Alzheimer's disease: An up-to-date review. *Neuropeptides*, *71*, 54-60.
- Robert Koch Institut - Internetauftritt des Robert Koch-Institutes (2018): *STIKO empfiehlt HPV-Impfung für Jungen*. [https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/STIKO/Empfehlungen/Vorabinformation\\_HP\\_VJungen.html](https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/STIKO/Empfehlungen/Vorabinformation_HP_VJungen.html) (abgerufen am: 30.05.2021)
- Rudensky, A. Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological Reviews*, *241*(1), 260-268.

- Ruzicka, M., Koenig, L. M., Formisano, S., Boehmer, D. F. R., Vick, B., Heuer, E. M., . . . Rothenfusser, S. (2020). RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia*, *34*(4), 1017-1026.
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y. M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., Akira, S., Fujita, T., Gale, M., Jr. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(2), 582-587.
- Santegoets, L. A., van Seters, M., Heijmans-Antonissen, C., Kleinjan, A., van Beurden, M., Ewing, P. C., Kühne, L., Beckmann, I., Burger, C., Helmerhorst, T., Blok, L. J. (2008). Reduced local immunity in HPV-related VIN: expression of chemokines and involvement of immunocompetent cells. *Int J Cancer*, *123*(3), 616-622.
- Sato, E., & al., e. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(51), 18538-18543.
- Schaniel, C., Pardali, E., Sallusto, F., Speletas, M., Ruedl, C., Shimizu, T., Seid, T., Andersson, J., Melchers, F., Rolink, A., Sideras, P. (1998). Activated Murine B Lymphocytes and Dendritic Cells Produce a Novel CC Chemokine which Acts Selectively on Activated T Cells. *Journal of Experimental Medicine*, *188*(3), 451-463.
- Scheen, A. J., Esser, N., & Paquot, N. (2015). Antidiabetic agents: Potential anti-inflammatory activity beyond glucose control. *Diabetes Metab*, *41*(3), 183-194.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, *63*(6), 1129-1136.
- Scheu, S., Ali, S., Ruland, C., Arolt, V., & Alferink, J. (2017). The C-C Chemokines CCL17 and CCL22 and Their Receptor CCR4 in CNS Autoimmunity. *International journal of molecular sciences*, *18*(11).
- Schiffman, M., & Wentzensen, N. (2013). Human Papillomavirus Infection and the Multistage Carcinogenesis of Cervical Cancer. *CEBP Focus*, *22*(4), 553-560.
- Schiffman, M., Wentzensen, N., Wacholder, S., Kinney, W., Gage, J. C., & Castle, P. E. (2011). Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *103*(5), 368-383.
- Schmidt, D. (2016). Moderne Biomarker bei Präkanzerosen der Cervix uteri. *Der Pathologe*, *37*(6), 534-541.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., & Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of experimental medicine*, *201*(5), 723-735.
- Shao, X., Wang, M., Wei, X., Deng, S., Fu, N., Peng, Q., Jiang, Y., Ye, L., Xie, J., Lin, Y. (2016). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ : Master Regulator of Adipogenesis and Obesity. *Curr Stem Cell Res Ther*, *11*(3), 282-289.

- Shi, J.-Y., Ma, L.-J., Zhang, J.-W., Duan, M., Ding, Z.-B., Yang, L.-X., Cao, Y., Zhou, J., Fan, J., Zhang, X., Zhao, Y., Wang, X., Gao, Q. (2017). FOXP3 Is a HCC suppressor gene and Acts through regulating the TGF- $\beta$ /Smad2/3 signaling pathway. *BMC cancer*, 17(1), 648-648.
- Shin, D. H., Choi, Y. J., Jin, P., Yoon, H., Chun, Y. S., Shin, H. W., Kim, J. E., Park, J. W. (2016). Distinct effects of SIRT1 in cancer and stromal cells on tumor promotion. *Oncotarget*, 7(17), 23975-23987.
- Silver, M. I., Gage, J. C., Schiffman, M., Fetterman, B., Poitras, N. E., Lorey, T., Cheung, L., Katki, H., Locke, A., Kinney, W., Castle, P. E. (2018). Clinical Outcomes after Conservative Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 (CIN2) in Women Ages 21–39 Years. *Cancer Prevention Research*, 11(3), 165-170.
- Singh, S., Kumar, P. U., Thakur, S., Kiran, S., Sen, B., Sharma, S., Rao, V., Poonhothai, A., Ramakrishna, G. (2015). Expression/localization patterns of sirtuins (SIRT1, SIRT2, and SIRT7) during progression of cervical cancer and effects of sirtuin inhibitors on growth of cervical cancer cells. *Tumour Biol*, 36(8), 6159-6171.
- Slukvin, I., Breburda, E. E., & Golos, T. G. (2004). Dynamic changes in primate endometrial leukocyte populations: differential distribution of macrophages and natural killer cells at the rhesus monkey implantation site and in early pregnancy. *Placenta*, 25(4), 297-307.
- Smith, J. S., Green, J., Berrington de Gonzalez, A., Appleby, P., Peto, J., Plummer, M., Franceschi, S., Beral, V. (2003). Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet*, 361(9364), 1159-1167.
- So, D., Shin, H. W., Kim, J., Lee, M., Myeong, J., Chun, Y. S., & Park, J. W. (2018). Cervical cancer is addicted to SIRT1 disarming the AIM2 antiviral defense. *Oncogene*, 37(38), 5191-5204.
- Strauss, L., Bergmann, C., & Whiteside, T. L. (2009). Human circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells kill autologous CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, 182(3), 1469-1480.
- Stremmel, C., Schuchert, R., Wagner, F., Thaler, R., Weinberger, T., Pick, R., . . . Schulz, C. (2018). Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. *Nat Commun*, 9(1), 75.
- Stünkel, W., Peh, B. K., Tan, Y. C., Nayagam, V. M., Wang, X., Salto-Tellez, M., Ni, B., Entzeroth, M., Wood, J. (2007). Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol J*, 2(11), 1360-1368.
- Sun, L. N., Zhi, Z., Chen, L. Y., Zhou, Q., Li, X. M., Gan, W. J., Chen, ., Yang, M., Liu, Y., Shen, T., Yu, Y., Li, J. M. (2017). SIRT1 suppresses colorectal cancer metastasis by transcriptional repression of miR-15b-5p. *Cancer Lett*, 409, 104-115.
- Tainio, K., Athanasiou, A., Tikkinen, K. A. O., Aaltonen, R., Cárdenas, J., Hernández, . . . Kalliala, I. (2018). Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis. *The BMJ*, 360, k499.

- Tang, J., Yang, Z., Wang, Z., Li, Z., Li, H., Yin, J., Deng, M., Zhu, W., Zeng, C. (2017). Foxp3 is correlated with VEGF-C expression and lymphangiogenesis in cervical cancer. *World journal of surgical oncology*, 15(1), 173-173.
- Tewari, K. S., Monk, B. J., Vergote, I., Miller, A., de Melo, A. C., Kim, H. S., . . . Oaknin, A. (2021). VP4-2021: EMPOWER-Cervical 1/GOG-3016/ENGOT-cx9: Interim analysis of phase III trial of cemiplimab vs. investigator's choice (IC) chemotherapy (chemo) in recurrent/metastatic (R/M) cervical carcinoma. *Annals of Oncology*, 32(7), 940-941.
- Tontonoz, P., & Spiegelman, B. M. (2008). Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR $\gamma$ . *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 289-312.
- Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27(4), 450-461.
- Vacchelli, E., Semeraro, M., Adam, J., Dartigues, P., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2016). Immunosurveillance in esophageal carcinoma: The decisive impact of regulatory T cells. *Oncoimmunology*, 5(2), e1064581.
- van Loosdregt, J., Brunen, D., Fleskens, V., Pals, C. E., Lam, E. W., & Coffey, P. J. (2011). Rapid temporal control of Foxp3 protein degradation by sirtuin-1. *PLoS one*, 6(4), e19047.
- Vattai, A., Cavailles, V., Sixou, S., Beyer, S., Kuhn, C., Peryanova, M., Heidegger, H., Hermelink, K., Mayr, D., Mahner, S., Dannecker, C., Jeschke, U., Kost, B. (2017). Investigation of RIP140 and LCoR as independent markers for poor prognosis in cervical cancer. *Oncotarget*, 62 (8), 105356-105371.
- Vattai, A., Kremer, N., Meister, S., Beyer, S., Keilmann, L., Hester, A., Temelkov, M., Heidegger, H., Schmoeckel, E., Kessler, M., Mahner, S., Jeschke, U., Hertlein, L., Kolben, T. (2021). Role of FoxP3-positive regulatory T-cells in regressive and progressive cervical dysplasia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 148(2), 377-386. *Reproduced with permission from Springer Nature.*
- Vattai, A., Kremer, N., Meister, S., Beyer, S., Keilmann, L., Hester, A., Buschmann, C., Corradini, S., Schmoeckel, E., Kessler, M., Mahner, S., Jeschke, U., Hertlein, L., Kolben, T. (2023). Increase of the T-reg-recruiting chemokine CCL22 expression in a progressive course of cervical dysplasia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023 Feb 16. doi: 10.1007/s00432-023-04638-w. *Epub ahead of print. PMID: 36792811. Reproduced with permission from Springer Nature*
- Velez-Perez, A., Wang, X. I., Li, M., & Zhang, S. (2017). SIRT1 overexpression in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*, 59, 102-107.
- Visser, J., Nijman, H. W., Hoogenboom, B. N., Jager, P., van Baarle, D., Schuurin, E., Abdulahad, W., Miedema, F., Van der Zee, A., Daemen, T. (2007). Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol*, 150(2), 199-209.
- Vogelsang, T. L. R., Schmoeckel, E., Kuhn, C., Blankenstein, T., Temelkov, M., Heidegger, H., Kolben, T. M., Kolben, T., Mahner, S., Mayr, D., Jeschke, U., Vattai, A. (2020). Regulation of LCoR and RIP140 expression in cervical intraepithelial neoplasia and correlation with CIN progression and dedifferentiation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*.

- Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P., Peto, J., Meijer, C., Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189(1), 12-19.
- Walentowicz-Sadlecka, M., Koper, A., Krystyna, G., Koper, K., Basta, P., Mach, P., Sket-Magierlo, J., Dutsch-Wicherek, M., Sikora, J., Grabiec, M., Kazmierczak, W., Wicherek, L. (2013). The analysis of metallothionein immunoreactivity in stromal fibroblasts and macrophages in cases of uterine cervical carcinoma with respect to both the local and distant spread of the disease. *Am J Reprod Immunol*, 70(3), 253-261.
- Walker, L. S. (2013). Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun*, 45(100), 49-57.
- Wang, J. H., Zhang, L., Ma, Y. W., Xiao, J., Zhang, Y., Liu, M., & Tang, H. (2016). microRNA-34a-Upregulated Retinoic Acid-Inducible Gene-1 Promotes Apoptosis and Delays Cell Cycle Transition in Cervical Cancer Cells. *DNA Cell Biol*, 35(6), 267-279.
- Wang, L., Liu, R., Ribick, M., Zheng, P., & Liu, Y. (2010). FOXP3 as an X-linked tumor suppressor. *Discovery medicine*, 10(53), 322-328.
- Wang, Q., Imam, M. U., Yida, Z., & Wang, F. (2017). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ) as a Target for Concurrent Management of Diabetes and Obesity-Related Cancer. *Curr Pharm Des*, 23(25), 3677-3688.
- Wang, Q., Schmoeckel, E., Kost, B. P., Kuhn, C., Vattai, A., Vilsmaier, T., Mahner, S., Mayr, D., Jeschke, U., Heidegger, H. H. (2019). Higher CCL22+ Cell Infiltration is Associated with Poor Prognosis in Cervical Cancer Patients. *Cancers*, 11(12), 2004.
- Whiteside, T. L. (2006). Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol*, 16(1), 3-15.
- Wilkinson, T. M., Sykes, P. H., Simcock, B., & Petrich, S. (2015). Recurrence of high-grade cervical abnormalities following conservative management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Am J Obstet Gynecol*, 212(6), 769.e761-767.
- Winer, R. L., Hughes, J. P., Feng, Q., O'Reilly, S., Kiviat, N. B., Holmes, K. K., & Koutsky, L. A. (2006). Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*, 354(25), 2645-2654.
- Wolf, D., Fiegl, H., Zeimet, A. G., Wieser, V., Marth, C., Sprung, S., Sopper, S., Hartmann, G., Reimer, D., Boesch, M. (2020). High RIG-I expression in ovarian cancer associates with an immune-escape signature and poor clinical outcome. *Int J Cancer*, 146(7), 2007-2018.
- Workman, C. J., Szymczak-Workman, A. L., Collison, L. W., Pillai, M. R., & Vignali, D. A. A. (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(16), 2603-2622.
- Workowski, K. A., & Bolan, G. A. (2015). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep*, 64(Rr-03), 1-137.
- World Health Organization - Abad-Vergara, D. Internetauftritt der World Health Organization (2020). *World Health Assembly adopts global strategy to*

- accelerate cervical cancer elimination*. <https://www.who.int/news/item/19-08-2020-world-health-assembly-adopts-global-strategy-to-accelerate-cervical-cancer-elimination>. (abgerufen am: 20.2.2022)
- Wu, L., Yi, B., Wei, S., Rao, D., He, Y., Naik, G., Bae, S., Liu, X., Yang, W., Sonpavde, G., Liu, R., Wang, L. (2019). Loss of FOXP3 and TSC1 Accelerates Prostate Cancer Progression through Synergistic Transcriptional and Posttranslational Regulation of c-MYC. *Cancer research*, 79(7), 1413-1425.
- Wu, S., Jiang, J., Liu, J., Wang, X., Gan, Y., & Tang, Y. (2017). Meta-analysis of SIRT1 expression as a prognostic marker for overall survival in gastrointestinal cancer. *Oncotarget*, 8(37), 62589-62599.
- Wuertz, B. R., Darrach, L., Wudel, J., & Ondrey, F. G. (2017). Thiazolidinediones abrogate cervical cancer growth. *Exp Cell Res*, 353(2), 63-71.
- Xia, X., & Zhou, X. (2018). Knockdown of SIRT1 inhibits proliferation and promotes apoptosis of paclitaxel-resistant human cervical cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 64(6), 36-41.
- Xiao, D., Liu, D., Wen, Z., Huang, X., Zeng, C., Zhou, Z., . . . Jing, C. (2019). Interaction Between Susceptibility Loci in MAVS and TRAF3 Genes, and High-risk HPV Infection on the Risk of Cervical Precancerous Lesions in Chinese Population. *Cancer Prev Res (Phila)*, 12(1), 57-66.
- Xu, R., Wu, M., Liu, S., Shang, W., Li, R., Xu, J., Huang, L., Wang, F. (2021). Glucose metabolism characteristics and TLR8-mediated metabolic control of CD4(+) Treg cells in ovarian cancer cells microenvironment. *Cell death & disease*, 12(1), 22.
- Xu, X. X., Wan, H., Nie, L., Shao, T., Xiang, L. X., & Shao, J. Z. (2018). RIG-I: a multifunctional protein beyond a pattern recognition receptor. *Protein Cell*, 9(3), 246-253.
- Xu, Y., Romero, R., Miller, D., Kadam, L., Mial, T. N., Plazyo, O., Garcia-Flores, V., Hassan, S., Xu, Z., Tarca, A., Drewlo, S., Gomez-Lopez, N. (2016). An M1-like Macrophage Polarization in Decidual Tissue during Spontaneous Preterm Labor That Is Attenuated by Rosiglitazone Treatment. *The Journal of Immunology*, 196(6), 2476-2491.
- Xu, Z. J., Gu, Y., Wang, C. Z., Jin, Y., Wen, X. M., Ma, J. C., Tang, L., Mao, Z., Qian, J., Lin, J. (2020). The M2 macrophage marker CD206: a novel prognostic indicator for acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology*, 9(1), 1683347.
- Yamashita, U., & Kuroda, E. (2002). Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Crit Rev Immunol*, 22(2), 105-114.
- Yang, H., Ye, S., Goswami, S., Li, T., Wu, J., Cao, C., . . . Zhang, X. (2020). Highly immunosuppressive HLADR(hi) regulatory T cells are associated with unfavorable outcomes in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 146(7), 1993-2006.
- Yang, S., Wang, J., Brand, D. D., & Zheng, S. G. (2018). Role of TNF-TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. *Frontiers in immunology*, 9, 784.



- Yano, H., Andrews, L. P., Workman, C. J., & Vignali, D. A. A. (2019). Intratumoral regulatory T cells: markers, subsets and their impact on anti-tumor immunity. *Immunology*, *157*(3), 232-247.
- Yao, R. R., Li, J. H., Zhang, R., Chen, R. X., & Wang, Y. H. (2018). M2-polarized tumor-associated macrophages facilitated migration and epithelial-mesenchymal transition of HCC cells via the TLR4/STAT3 signaling pathway. *World journal of surgical oncology*, *16*(1), 9.
- Yashiro, T., Nakano, S., Nomura, K., Uchida, Y., Kasakura, K., & Nishiyama, C. (2019). A transcription factor PU.1 is critical for Ccl22 gene expression in dendritic cells and macrophages. *Sci Rep*, *9*(1), 1161.
- Yi, J., & Luo, J. (2010). SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochim Biophys Acta*, *1804*(8), 1684-1689.
- Youssef, J., & Badr, M. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. *Br J Pharmacol*, *164*(1), 68-82.
- Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Krausz, T., Chong, A., Schreiber, H., & Fu, Y.-X. (2005). Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *The Journal of experimental medicine*, *201*(5), 779-791.
- Yuan, Z. Y., Luo, R. Z., Peng, R. J., Wang, S. S., & Xue, C. (2014). High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *Onco Targets Ther*, *7*, 1475-1480.
- Zeng, C., Yao, Y., Jie, W., Zhang, M., Hu, X., Zhao, Y., Wang, S., Yin, J., Song, Y. (2013). Up-regulation of Foxp3 participates in progression of cervical cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *62*(3), 481-487.
- Żeromski, J., Kaczmarek, M., Boruczkowski, M., Kierepa, A., Kowala-Piaskowska, A., & Mozer-Lisewska, I. (2019). Significance and Role of Pattern Recognition Receptors in Malignancy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, *67*(3), 133-141.
- Zhang, A.-B., Qian, Y.-G., & Zheng, S.-S. (2016). Prognostic significance of regulatory T lymphocytes in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *17*(12), 984-991.
- Zhang, T., Jiao, J., Jiao, X., Zhao, L., Tian, X., Zhang, Q., Ma, D., Cui, B. (2017). Aberrant frequency of TNFR2 + Treg and related cytokines in patients with CIN and cervical cancer. *Oncotarget*, *9*(4).
- Zhang, T., & Kraus, W. L. (2010). SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta*, *1804*(8), 1666-1675.
- Zhao, M., Li, Y., Wei, X., Zhang, Q., Jia, H., Quan, S., Cao, D., Wang, L., Zhao, J., Pei, M., Tian, S., Yu, Y., Guo, Y., Yang, X. (2017). Negative immune factors might predominate local tumor immune status and promote carcinogenesis in cervical carcinoma. *Virology*, *14*(1), 5.
- Zhao, W., Kruse, J. P., Tang, Y., Jung, S. Y., Qin, J., & Gu, W. (2008). Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature*, *451*(7178), 587-590.

## Literaturverzeichnis

- Zhao, X., Li, Y., Wang, X., Wu, J., Yuan, Y., Lv, S., & Ren, J. (2019). Synergistic association of FOXP3+ tumor infiltrating lymphocytes with CCL20 expressions with poor prognosis of primary breast cancer: A retrospective cohort study. *Medicine*, *98*(50), e18403-e18403.
- Zhou, Y., Song, T., Peng, J., Zhou, Z., Wei, H., Zhou, R., Jiang, S., Peng, J. (2016). SIRT1 suppresses adipogenesis by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in vivo and in vitro. *Oncotarget*, *7*(47), 77707-77720.
- Zhu, H., Xu, W. Y., Hu, Z., Zhang, H., Shen, Y., Lu, S., Wei, C., Wang, Z. G. (2017). RNA virus receptor Rig-I monitors gut microbiota and inhibits colitis-associated colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, *36*(1), 2.
- Zuo, T., Liu, R., Zhang, H., Chang, X., Liu, Y., Wang, L., Zheng, P. Liu, Y. (2007). FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP2. *The Journal of clinical investigation*, *117*(12), 3765-3773.

## Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die mich während meiner Forschungsarbeit unterstützt und in großen Maßen zur Entstehung und Fertigstellung der Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Mahner möchte ich ausdrücklich danken, dass ich die Möglichkeit hatte, an seiner Klinik zu promovieren.

Ebenso möchte ich meinem Doktorvater Prof. Thomas Kolben, dem Initiator der Dissertation, ganz besonders danken. Über die gesamte Dauer des Dissertationsprojektes wusste ich mich uneingeschränkt unterstützt und durch sein Fachwissen jederzeit konstruktiv beraten.

Meiner Betreuerin PD. Dr. Aurelia Vattai möchte ich für die sehr gute Supervision ganz herzlichen Dank aussprechen. Sie hatte immer ein offenes Ohr für jegliche Fragestellungen und stand mir geduldig zur Seite, mit den neuen Aufgaben im Rahmen der Forschungsarbeit vertraut zu werden. Darüber hinaus möchte ich ihr für die sehr gute wissenschaftliche Unterstützung bei gemeinsamen Publikationen und Kongressbeiträgen danken.

Für die exzellente Einarbeitung im Labor bin ich Frau Christina Kuhn ausgesprochen dankbar.

Ein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern der Pathologie, Dr. Elisa Schmoeckel, Frau Andrea Sendelhofert und Frau Antje Heier.

Meinen Mitdoktorandinnen möchte ich ganz herzlich für die kollegiale Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und die gegenseitige Motivation danken.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, meinem Freund, meiner besten Freundin und meiner ganzen Familie, die mich in jeder Phase meines Studiums liebevoll unterstützt haben, von ganzem Herzen danken.



Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



### Eidesstattliche Versicherung

Kremer, Nadine

---

Name, Vorname

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

„Rolle der Makrophagendifferenzierung und -interaktion mit regulatorischen T-Zellen bei der Progression und Regression der HPV-induzierten Zervixdysplasie“

selbstständig verfasst, mich außer den angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient habe 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 vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 30.11.2023

Nadine Kremer

---

Ort, Datum

---

Unterschrift der Doktorandin