

Aus der
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der
Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Evaluation neuer Marker zur Verbesserung der Therapie gynäkologischer
Malignome und deren Vorstufen**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Frauenheilkunde und Geburtshilfe

vorgelegt

von

Dr. med. Linda Hertlein

2024

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	3
1.1.	Inzidenz und Früherkennung des Ovarialkarzinoms.....	3
1.2	Inzidenz und Früherkennung des Zervixkarzinoms	5
1.3	Intraepithelialen Neoplasien des Zervixkarzinoms und Frühgeburtsrisiko	7
2.	Zielsetzung.....	8
3.	Eigene Arbeiten.....	9
3.1	Human epididymis protein 4 (HE4) als prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom.....	9
3.2	FoxP3-positive regulatorische T-Zellen und C-C class chemokine ligand 22 (CCL22) als prognostische Marker bei Zervixdysplasien.....	10
3.2.1.	Bedeutung von FoxP3-positiver regulatorischer T-Zellen bei Zervixdysplasien.....	10
3.2.2.	Bedeutung der C-C class chemokine ligand 22 Expression bei Zervixdysplasien	12
4.	Zusammenfassung.....	14
5.	Abkürzungen.....	17
6.	Curriculum vitae.....	18
7.	Danksagung.....	19
8.	Referenzen.....	21

1. Einleitung

Bei den jährlichen Krebsneuerkrankungen der Frauen in Deutschland steht das Mammakarzinom mit 69.900 (30% aller malignen Neuerkrankungen) weiterhin deutlich an erster Stelle. Die drei häufigsten gynäkologischen Karzinome (Endometrium-, Zervix- und Ovarialkarzinom) machen zusammen mit 22.480 Fällen/Jahr 9.7% der jährlichen weiblichen Krebsneuerkrankungen aus (1, 2).

Die Gesamtmortalität pro 100 000 Frauen liegt für das Endometriumkarzinom bei 3.0%, für das Zervixkarzinom bei 2.4% und für das Ovarialkarzinom bei 6.9% (1).

1.1. Inzidenz und Früherkennung des Ovarialkarzinoms

Am Ovarialkarzinom erkrankten im Jahr 2018 7300 Frauen (1). Mit 3.1 % aller bösartigen Neubildungen der Frauen und 5.2 % aller Krebssterbefälle ist der Eierstockkrebs damit nach dem Brustkrebs die häufigste tödliche gynäkologische Krebserkrankung. Die Erkrankungsraten steigen bis zum 85. Lebensjahr an. 5-10 % aller bösartigen Erkrankungen des Eierstocks treten jedoch bereits unter dem 45. Lebensjahr auf. 1 von 72 Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens am Ovarialkarzinom.

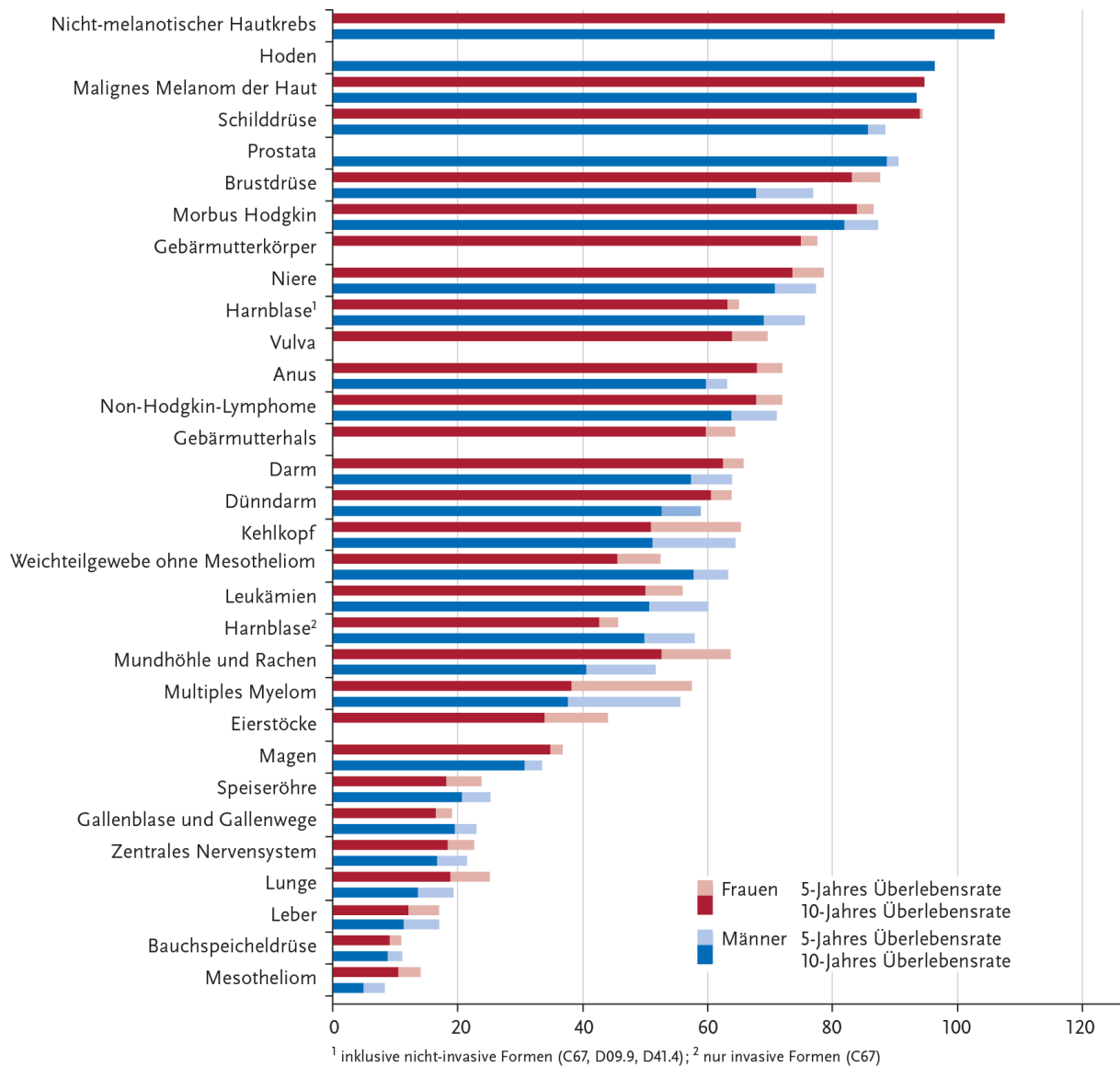


Abb. 1: Vergleich der relativen 5-/10-Jahres-Überlebensraten aller Karzinome nach Lokalisation und Geschlecht, Deutschland 2019 – 2020 (Periodenanalyse), Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (1).

Trotz Entwicklung eines umfangreichen, operativen Therapiekonzeptes und moderner medikamentöser Behandlungen einschließlich des Einsatzes eines monoklonalen Antikörpers ist die Prognose des Ovarialkarzinoms im Verhältnis zu anderen Krebserkrankungen der Geschlechtsorgane eher schlecht. Das relative 5-Jahres-Überleben liegt derzeit bei ca. 43 % über alle Stadien (Abb.1.).

Die Diagnosestellung des Ovarialkarzinoms im Frühstadium, bei der das Karzinom lediglich auf das Ovar beschränkt ist (FIGO Stadium I), wäre wünschenswert. Randomisierte

Multicenterstudien konnten bisher jedoch keinen Effekt eines generellen Screenings mittels transvaginalem Ultraschall oder Tumormarkerbestimmungen (CA 125) auf die Überlebensraten nachweisen. Hinzu kommt das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko bei operativen Interventionen falschpositiver Patientinnen (3). Ca. 75 % aller Ovarialkarzinomfälle werden seit Jahrzehnten erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (4). Das liegt daran, dass die Ovarien frei in der Bauchhöhle liegen und eine Vergrößerung dieser Strukturen daher lange Zeit unbemerkt bleibt. In der Regel sind die Patientinnen für lange Zeit symptomfrei oder zeigen nur wenig Symptome. Daher wird die Diagnose meist erst in einem Stadium gestellt, in dem bereits die extrapelvine Tumorausbreitung (Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens) stattgefunden hat (FIGO III) und bereits deutlicher maligner Aszites vorhanden ist.

Zur effektiven Früherkennung eines Ovarialkarzinoms wären neben den bereits etablierten, jedoch nicht sehr effektiven Tumormarkern neue Marker nötig, um die Prognose des Ovarialkarzinoms verbessern zu können. Der Nachweis des Tumormarkers Cancer antigen 125 (CA 125) im Serum hat eine hohe Sensitivität bzgl. eines bestehenden Ovarialkarzinoms. Da jedoch vor allem prämenopausale Frauen mit benignen gynäkologischen Tumoren ebenfalls erhöhte CA 125 Werte aufweisen können, ist die Spezifität dieses Tumormarkers für das Ovarialkarzinom in dieser Population schlecht (6).

1.2 Inzidenz und Früherkennung des Zervixkarzinoms

Das Zervixkarzinom ist weltweit das vierthäufigste Malignom der Frau. In Deutschland erkrankten 2020 4640 Frauen am Zervixkarzinom (1). In den letzten Jahrzehnten ist das Zervixkarzinom u.a. durch die Früherkennung zu einer weniger häufigen Tumorart geworden und liegt derzeit nur an 4. Stelle der gynäkologischen Karzinome. Im Gegensatz zur Früherkennung des Ovarialkarzinoms, ermöglicht jedoch die systematische Früherkennungsuntersuchung mittels zytologischem Abstrich, vermehrt Vor- und Frühstadien zu detektieren. Somit ist auch die Langzeitprognose der Zervixkarzinome besser (5-Jahres-Überleben 60-80%, Abb.1). Hier liegt die klinische Problematik nicht so sehr bei der Früherkennung bereits maligner Veränderung, sondern bei der Einstufung präkanzeröser Veränderungen, mit unterschiedlichem Risiko, im Verlauf maligne zu entarten.

Zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN) sind präkanzeröse Veränderungen der Zervix, die durch abnormales Zellwachstum im Epithelgewebe verursacht werden. CIN wird in drei Stadien eingeteilt: CIN I, CIN II und CIN III. CIN I bezeichnet leichte Veränderungen, während CIN III als schwerwiegendste Form gilt. Diese Veränderungen werden durch eine Infektion mit humanen Papillomviren (HPV) verursacht, die sexuell übertragen werden. Es ist wichtig, CIN frühzeitig zu erkennen und zu behandeln, um das Risiko der Entwicklung in ein Zervixkarzinom zu verringern.

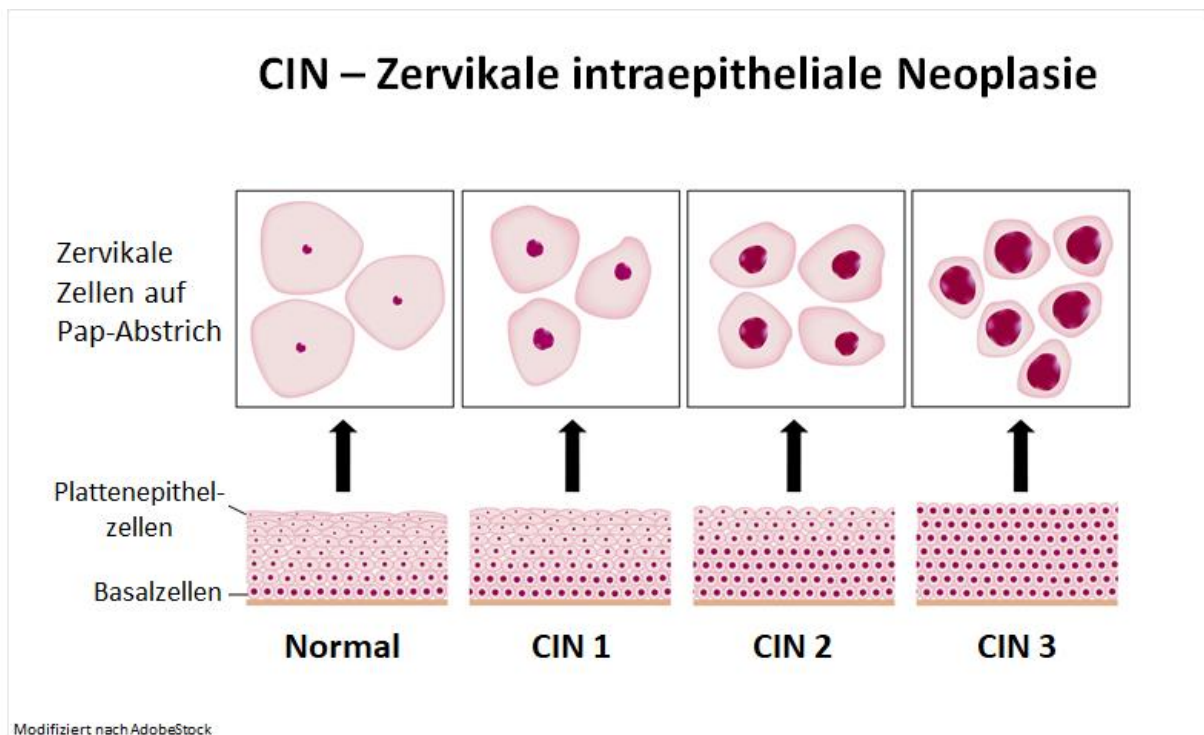


Abb.2: Entwicklung der dysplastischen Zellen innerhalb des Zervix-Epithels in Abhängigkeit vom CIN Stadium, Biovariance GmbH, Tirschenreuth (5)

Bei der CIN I (leichten Dysplasie) entwickeln sich die dysplastischen Zellen von basal aus bis höchstens zu einem Drittel der Höhe des Epithels. In diesen Fällen ist von einer 70-90 % spontanen Regression auszugehen (6). Das Risiko der Entwicklung einer kolposkopisch und histologisch gesicherten CIN I in eine CIN II/III in den nächsten 2 Jahren liegt lediglich bei 13% (7). Daher wird bei CIN I ein abwartendes Vorgehen empfohlen, mit einer Verlaufskontrolle nach 6 Monaten (6).

Bei der CIN II (mittelgradige) Dysplasie sind die dysplastischen Zellen bis zu einer Höhe von zwei Drittel des Epithels nachweisbar. In diesem Stadium liegt die Regressionsrate zurück zu einem unauffälligen Plattenepithel bei ca. 30-50%. Bei kolposkopisch komplettem Einsehen

der Plattenepithel-Zylinderepithelgrenze wird in den aktuellen deutschsprachigen Leitlinien eine Verlaufskontrolle in 6 Monaten empfohlen. Bei einem über 24 Monate persistierenden Befund wird eine operative Therapie empfohlen (6). In den angelsächsischen Leitlinien ist hingegen bei einer diagnostizierten CIN II die zeitnahe Empfehlung zur operativen Therapie gegeben (8).

Die hochgradige Dysplasie (CIN III) zeichnet sich dadurch aus, dass sich die dysplastischen Zellen fast im gesamten Epithel befinden (Carcinoma in situ). In diesem Stadium ist lediglich von einer 10% Regressionsrate auszugehen; 30-70% der CIN III entwickeln sich in den folgenden 30 Jahren zu einem invasiven Zervixkarzinom (6). Daher wird bei der histologisch gesicherten CIN III eine operative Therapie mit einer Konisation und Entfernung im Gesunden empfohlen. Eine Ausnahme dabei bilden junge Frauen unter 24 Jahren; hier ist ein konservatives Vorgehen mit kolposkopischen Kontrollen, und bei gutem Einsehen der CIN III bis zu 12 Monaten vertretbar (6).

Das Vorgehen bei CIN I mit Abwarten und bei CIN III mit operativer Therapie ist sehr klar. Problematisch ist Gruppe der Frauen mit mittelgradiger zervikaler Dysplasie. Der klinische Verlauf von Patientinnen mit CIN II kann sehr variabel sein (Regression versus Progression) und ist bis heute individuell nur schwer vorhersagbar. Aus klinischer Sicht besteht bei der Betreuung von Patientinnen mit CIN II Läsionen somit das Problem, zwischen klinischer Kontrolle einerseits und zeitnahe operativen Vorgehen andererseits entscheiden zu müssen.

1.3 Intraepithelialen Neoplasien des Zervixkarzinoms und Frühgeburtsrisiko

Das mittlere Erkrankungsalter für das Zervixkarzinom liegt derzeit bei 55 Jahren. Vor 25 Jahren lag das mittlere Erkrankungsalter noch bei 70 Jahren (1). Das mittlere Erkrankungsalter für präinvasive Vorstufen liegt derzeit im Mittel bei 35 Jahren (1). Da das mütterliche Alter bei der Geburt des ersten Kindes in Deutschland stetig steigt und derzeit bei 30.2 Jahren liegt, fällt gerade die Diagnose einer präinvasiven Vorstufe des Zervixkarzinoms häufig mit der reproduktiven Phase der Frau zusammen. Die Konisation zur Behandlung höhergradigen intraepithelialen Neoplasien führt trotz neuerer Operationsmethoden zwangsweise zu einer Verkürzung der Zervix. Dies kann eine erhöhtes Frühgeburtsrisiko nach sich ziehen (9). Auch aus diesem Grund wären bei einer intermediären intraepithelialen Neoplasie (CIN II)

diagnostische Marker hilfreich, die prognostizieren können, ob sich diese präinvasive Vorstufe in eine höhergradige Neoplasie und ggf. in ein invasives Karzinom entwickelt oder nicht.

2. Zielsetzung

Die vorliegende Habilitationsarbeit evaluierte bei Patienten mit Ovarialkarzinomen bzw. mit zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) neue biochemische und immunhistochemische Marker, mit deren Hilfe bereits Frühstadien entsprechender Tumore besser erkannt werden könnten, bzw. frühzeitig eine bessere Unterscheidung zwischen sukzessive benignen und malignen Entitäten möglich wäre. Dazu wurden Proteine, die für die onkologische Immunantwort wichtig sind, teils im Serum, teils in Zellen aus Tumorgewebe untersucht. Bei der CIN II wurden entsprechende Befunde mit anderen histopathologischen Merkmalen, sowie mit der Prognose (Entwicklung von CIN III) korreliert.

3. Eigene Arbeiten

3.1 Human epididymis protein 4 (HE4) als prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom

Human epididymis protein 4 (HE4) ist ein neuer Tumormarker, der beim Ovarialkarzinom stark exprimiert wird. HE4 ist ein nicht organspezifisches intrazelluläres Glykoprotein. In der Trachea und Speicheldrüse kommt es in großen Mengen vor. Weitere Organe, die eine erhöhte HE4-Expriemierung zeigen, sind Lunge, Prostata, Schilddrüse, Hypophyse und Niere. Eine besonders starke HE4-Amplifikation lässt sich in serösen und endometrioiden Ovarialkarzinomen detektieren (10).

Um Fehlinterpretationen zu vermeiden und um die klinische Relevanz zu beurteilen, untersuchten wir die HE4-Konzentration bei biologischen Frauen und biologischen Männern mit verschiedenen benignen und malignen Erkrankungen sowie bei gesunden Personen. Die Seren von 205 gesunden Individuen, sowie 654 Patient*innen mit benignen und 720 Patient*innen mit malignen Erkrankungen, wurden vor der ersten Therapie analysiert. Insgesamt lagen die HE4 Werte bei den biologischen Frauen höher als bei den biologischen Männern. Des Weiteren zeigte sich ein Anstieg der HE4 Werte mit dem Alter der Probanden (biologische Frauen; medianer Wert: 33.5 pmol/L unter 30 Jahre und 54.5 pmol/L über 60 Jahre; biologische Männer: medianer Wert: 22.6 pmol/L unter 30 Jahre auf 38.4 pmol/L über 60 Jahre.) Die niedrigsten HE4 Konzentrationen wurden bei gesunden biologischen Männern (medianer Wert: 26.2 pmol/L), gefolgt von gesunden biologischen Frauen (medianer Wert: 40.4 pmol/L), detektiert. Unter den benignen Erkrankungen zeigten sich die höchsten HE4 Werte bei biologischen Männern und biologischen Frauen mit Niereninsuffizienz (biologische Frauen, medianer Wert: 1041 pmol/L; biologische Männer, medianer Wert: 1368 pmol/L). Bei den malignen Erkrankungen der biologischen Frau zeigten sich wie erwartet die höchsten HE4 Werte bei den Ovarialkarzinomen (medianer Wert: 242 pmol/L). Das Lungenkarzinom zeigte innerhalb der malignen Erkrankungen bei den biologischen Männern die höchsten HE4 Werte (medianer Wert: 89.2 pmol/L). Hauptbefund war, dass - im Vergleich zu benignen gynäkologischen Erkrankungen - die Area under the curve (AUC der ROC-Statistik) des HE4 beim Ovarialkarzinom und beim Borderlinetumor am höchsten war (88.9%) bei einer

Sensitivität von 67.4% und bei einer Spezifität von 95% (11). Des Weiteren zeigten sich im Vergleich zu den entsprechenden benignen Erkrankungen bei biologischen Frauen und Männern signifikant erhöhte HE4 Werte beim Korpuskarzinom, Mammakarzinom und Lungenkarzinom.

Bei biologischen Frauen mit Endometriose, die häufig erhöhte CA 125 Werte zeigen (12), entsprachen die HE4 Werte denen, die in der Vergleichsgruppe gesunder biologischer Frauen gemessen wurden. HE4 zeigte somit speziell bei benignen gynäkologischen Erkrankungen wie der Endometriose im Vergleich zu CA 125 eine verbesserte Spezifität.

In derselben Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus CA 125 und HE4 in Form des ROMA (risk of malignancy algorithm) die höchste Sensitivität bzgl. der Erkennung von Adnextumoren besaß. Die höchste Sensitivität des ROMA aus CA125 und HE4 fand sich vor allem bei Ovarialkarzinomen im frühen Stadium (FIGO Stadium I) (13).

11. Hertlein L, Stieber P, Kirschenhofer A, Krock K, Nagel D, Lenhard M, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) in benign and malignant diseases. Clin Chem Lab Med. 2012;50(12):2181-8

3.2 FoxP3-positive regulatorische T-Zellen und C-C class chemokine ligand 22 (CCL22) als prognostische Marker bei Zervixdysplasien

3.2.1. Bedeutung von FoxP3-positiver regulatorischer T-Zellen bei Zervixdysplasien

Das Forkhead Box Protein 3, auch bekannt als FoxP3, ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems spielt. Er wird hauptsächlich in regulatorischen T-Zellen (Tregs) exprimiert und ist entscheidend für ihre Funktion. FoxP3 ist an der Unterdrückung von Immunantworten beteiligt, indem es die Aktivität anderer Gene beeinflusst, die für die T-Zell-Funktion wichtig sind. Durch die Kontrolle der Immunreaktionen trägt Foxp3 zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen bei. Daher stellt FoxP3 einen Schlüsselmarker der immunsuppressiven Funktion regulatorischer T- Zellen dar.

Beim Nachweis von FoxP3 positiven Zellen beschleunigt sich die Karzinomprogression im Allgemeinen (14, 15). Es wurde festgestellt, dass die Expression von FoxP3 in

tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) erhöht sein kann (16, 17). TILs sind Immunzellen, die in den Tumorgeweben vorhanden sind. Die erhöhte Expression von FoxP3 in TILs wird oft mit einer immunsuppressiven Funktion in Verbindung gebracht. Das bedeutet, dass FoxP3 dazu beitragen kann, die lokale intratumorale Aktivität des Immunsystems zu dämpfen und somit die Immunantwort des Wirts gegen den Tumor hemmt. Dies kann dazu führen, dass der Tumor der Immunüberwachung entgeht und sich weiter ausbreitet.

Die genaue Rolle von FoxP3 beim Zervix- und Ovarialkarzinom ist noch nicht vollständig verstanden. So gibt es auch Hinweise darauf, dass die Expression von FoxP3 mit einer besseren Prognose und einem verbesserten Überleben assoziiert sein kann (18).

Unsere Studie sollte untersuchen, ob der Nachweis von FoxP3 positiven Tregs bei Patientinnen mit intermediärer intraepithelialer Neoplasie (CIN II) als unabhängiger prognostischer Marker für die Progression bzw. Regression intraepithelialer Neoplasien dienen kann. Wir analysierten immunhistochemisch Gewebeproben von insgesamt 169 Patientinnen mit zervikaler intraepithelialen Neoplasien, die alle HPV high risk positiv waren. 37 Proben wurden bei Patientinnen mit CIN I, 96 mit CIN II und 36 mit CIN III entnommen. Die CIN II Proben wurden anhand des folgenden klinischen Verlaufs weiter untergliedert in CIN II mit Regression (n=47) und CIN II mit Progression (n=49). Die mediane Follow-up Zeit lag bei 5 Monaten. Die mediane Zahl der FoxP3 positiven Zellen wurde für jedes Präparat gezählt und mit dem histologischen Subtyp korreliert. In der immunhistochemischen Färbung zeigte sich die FoxP3 Expression vorwiegend intrazellulär. Die Zahl der FoxP3 positiven Zellen im Epithel bzw. im Dysplasie-assoziiertem Stroma war bei niedriggradigen intraepithelialen Neoplasien besonders gering ($p < 0.001$ bei CIN I vs. CIN II; $p=0.227$ bei CIN II vs. CIN III). Hauptbefund war, dass Patientinnen mit CIN II und progressivem Verlauf deutlich mehr FoxP3 exprimierten als Patientinnen mit regressivem Verlauf einer CIN II ($p = 0.003$).

Somit könnte zukünftig der Nachweis von FoxP3 positiven Tregs als prognostisches Kriterium herangezogen werden, um die Wahrscheinlichkeit eines progressiven Verlaufs einer CIN II bei Frauen im reproduktiven Alter einschätzen zu können, und um die Indikation zur operativen Therapie besser absichern zu können (19). Des Weiteren unterstützen die Ergebnisse dieser Studie das Konzept, beim Zervixkarzinom gegen Tregs gerichtete Immuntherapien zu entwickeln.

19. Vattai A, Kremer N, Meister S, Beyer S, Keilmann L, Hester A, et al. Role of FoxP3-positive regulatory T-cells in regressive and progressive cervical dysplasia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2022;148(2):377-86.

3.2.2. Bedeutung der C-C class chemokine ligand 22 Expression bei Zervixdysplasien

C-C class chemokine ligand 22 (CCL22) ist ein Protein, das eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort auf eine Tumorerkrankung spielt. In der Tumorbilogie kann CCL22 das Tumorwachstum und die Metastasierung beschleunigen, indem es das Immunsystem beeinflusst. CCL22 gehört zur Familie der Chemokine, die als Signalmoleküle im Immunsystem fungieren. Es wird von verschiedenen Zellen im Tumorgewebe produziert und kann die Migration und Aktivierung bestimmter Immunzellen beeinflussen. Dabei agiert CCL22 als chemischer Lockstoff für dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten und T-Lymphozyten, und rekrutiert auch regulatorische T-Zellen (Tregs) in Tumorgeweben (16). Diese Zellen können das Tumorwachstum unterstützen, da sie eine immununterdrückende Umgebung schaffen, die es malignen Zellen ermöglicht, der Immunantwort des Wirts zu entkommen. Beim Zervixkarzinom ist eine hohe Expression von CCL22 mit Lymphknotenmetastasierung, fortgeschrittenem FIGO-Stadium und kürzerem Überleben assoziiert. (20).

Die genaue Rolle von CCL22 in der Tumorentstehung ist noch nicht vollständig verstanden, und weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Konkret geht es aktuell darum, neue Ansätze zur Immuntherapie von Karzinomen dadurch zu entwickeln, dass man das Zusammenspiel zwischen Tumor und Immunsystem des Wirts besser versteht.

Cluster differentiation protein 68 (CD68) ist ein immunhistochemischer Marker für Makrophagen (21, 22). Die Makrophagen unterteilen sich je nach Polarisierung in M1- und M2 Typen. Die Aktivierung von M1 Makrophagen führt zu vermehrter Inflammation und antitumorale Aktivität. Die Aktivierung von M2 Makrophagen hingegen führt unter anderem zu immunmodulierenden, tumorigenen Prozessen (22, 23). Der Nachweis des Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ist assoziiert mit M2 Makrophagen (22, 23). Letztere Zellen sind Gegenstand einer personalisierten Tumorthherapie.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von CCL22 im Zusammenspiel mit CD68 und PPAR γ für die Progression bzw. Regression bei zervikalen intraepithelialen Neoplasien zu untersuchen. Hierbei wurde das Augenmerk im Besonderen auf die intermediären intraepithelialen Neoplasien (CIN II) Läsionen gelegt. Ein weiteres Studienziel war die Charakterisierung CCL22 produzierender Zellen, sowie die Untersuchung angeborener Immunprozesse bei der Zellrekrutierung.

Wir analysierten erneut Gewebeproben von 169 Patientinnen mit CIN I, mit CIN II mit progressivem oder regressivem Verlauf, sowie mit CIN III. Der immunreaktive Score (Bewertungsskala aus dem Bereich der Immunoassay: Reaktion auf eine Einfärbung von Zellen multipliziert mit dem Anteil positiver Zellen) als auch die mediane Anzahl CCL22 positiver Zellen wurden in jeder Probe bestimmt, und es wurden Korrelationen mit den CIN Graden und auch mit der FoxP3 Expression (vgl. oben) untersucht. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der CD68/CCL22 sowie die CD68/PPAR γ und CD68/FoxP3 Expression mittels Doppelimmunofluoreszenz.

Hauptbefund war, dass - im Vergleich zu CIN II Läsionen ohne Regression - die epitheliale CCL22 Expression bei CIN II Läsionen mit Progression deutlich erhöht ($p=0.006$) war. Es konnte auch gezeigt werden, dass die CCL22 Expression im dysplastischen Epithel positiv mit der Anzahl der FoxP3 positiven Zellen korrelierte (Spearman's Rho: 0.308; $p < 0.01$). 88% der CCL22 positive Zellen waren auch positiv für CD68, und waren somit den Makrophagen zuzuordnen. Von den CD68-positiven Makrophagen zeigten 71% eine Expression für PPAR γ . Bei 12 % der Zellen ließ sich gleichzeitig CD68 und FoxP3 nachweisen.

Wir konnten somit zeigen, dass eine erhöhte Expression von CCL22 (vorwiegend produziert von Makrophagen) mit einem erhöhten malignen Potential assoziiert ist. Somit könnte die Stärke der CCL22 Expression als Prädiktor für Regression bzw. Progression von CIN II Läsionen dienen, und bei der Entscheidung helfen, ob CIN II Befunde weiter beobachtet werden können oder ob doch zeitnah ein operatives Vorgehen zu empfehlen ist. Ein weiterer Befund war, dass bei Patientinnen mit Zervixkarzinom und mit einem hohen Anteil an CCL22-produzierenden, PPAR γ positiven Zellen (M2 Makrophagen) die Möglichkeit gegeben sein könnte, diese Zellen als Zielzellen für eine potentielle Immuntherapie zu benutzen (24).

4. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom liegt trotz intensiver medizinischer Forschungen weiterhin - hinter dem Mammakarzinom - an zweiter Stelle der tödlichen Krebserkrankungen der Frau. Das zentrale Problem ist dabei, dass nahezu $\frac{3}{4}$ aller Diagnosen erst im fortgeschrittenen Tumorstadium gestellt werden. Neben dem bereits seit langem etablierten, jedoch nicht sehr akkuraten Tumormarker CA 125, wären weitere Tumormarker, die eine möglichst frühzeitige Detektion des Ovarialkarzinoms leisten könnten, erstrebenswert.

In dieser Arbeit wurde der neue, nicht organspezifische Tumormarker Human epididymis protein 4 (HE4), der jedoch beim Ovarialkarzinom stark exprimiert wird, genauer untersucht. Um die prognostische Relevanz erhöhter HE4 Konzentrationen besser einordnen zu können, bestimmten wir HE4 im Serum von biologischen Frauen und biologischen Männern mit verschiedenen benignen und malignen Erkrankungen, sowie von gesunden Personen. Die niedrigsten HE4 Konzentrationen wurden bei gesunden biologischen Männern, gefolgt von gesunden biologischen Frauen, detektiert. Unter den benignen Erkrankungen zeigten sich die höchsten HE4 Werte bei biologischen Männern und biologischen Frauen mit Niereninsuffizienz. Betrachtet man die malignen Erkrankungen, zeigten sich bei den biologischen Frauen die höchsten HE4 Werte beim Ovarialkarzinom, bei den biologischen Männern beim Lungenkarzinom. Bei Frauen mit Endometriose, die häufig erhöhte CA 125 Werte zeigen, lagen die HE4 Werte im Bereich der Vergleichsgruppe gesunder biologischer Frauen. Somit erscheint bei Grenzfällen die zusätzliche Bestimmung von HE4 sinnvoll, um ggf. – bei normalen HE4 Werten - einen tumorverdächtigen Adnexbefund im reproduktiven Alter zunächst nur belassen zu können (mit sonographischer Kontrolle im Verlauf).

Bei Zervix Präkanzerosen sind die Therapieempfehlungen für die intermediäre intraepitheliale Neoplasie (CIN) I mit abwartendem Vorgehen und für CIN III mit zeitnahe operativen Vorgehen sehr klar. Unklar ist weiterhin, bei welchen Subtypen der CIN II ein abwartendes Vorgehen möglich ist und bei welchen ein zeitnahes operatives Vorgehen indiziert wäre. Zu einer entsprechenden Differenzierung wären diagnostische Marker hilfreich, die prognostizieren können, ob sich eine CIN II im Verlauf eher in eine CIN I (Regress) oder in eine CIN III bzw. in ein invasives Karzinom (Progress) entwickeln könnte.

Das Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems spielt. Unklar ist, ob der Nachweis von FoxP3 positiven, regulatorischen T-Zellen bei Patientinnen mit intermediärer intraepithelialer Neoplasie (CIN II) als unabhängiger prognostischer Marker für die Progression bzw. Regression intraepithelialer Neoplasien dienen kann. Wir analysierten immunhistochemisch Gewebeproben von insgesamt 169 Patientinnen mit zervikaler intraepithelialen Neoplasien, die alle HPV high risk positiv waren. Die mediane Follow-up Zeit lag bei 5 Monaten. Als Ergebnis zeigte sich, dass Patientinnen mit CIN II und progressivem Verlauf deutlich höhere FoxP3 Levels zeigten als Patientinnen mit einem regressiven Verlauf. Daher kann zukünftig möglicherweise der Nachweis von FoxP3 positiven regulatorischen T-Zellen dabei helfen, die Wahrscheinlichkeit eines progressiven Verlaufs einer CIN II bei Frauen im reproduktiven Alter besser einschätzen zu können. Bei FoxP3 negativen regulatorischen T-Zellen, und damit bei einer höheren Wahrscheinlichkeit für einen regressiven Verlauf, könnte andererseits ein abwartendes Vorgehen gewählt werden, um ggfs. zunächst einen Kinderwunsch zu realisieren.

C-C class chemokine ligand 22 (CCL22) ist ein Protein, das eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort auf eine Tumorerkrankung spielt. Wir wollten erneut bei Frauen mit zervikalen intraepithelialen Neoplasien - vor allem mit CIN II- untersuchen, welche Bedeutung CCL22 für die Prognose (Progress vs. Regress) hat. Die genauere Charakterisierung CCL22 produzierender Zellen in den Proben war ein weiteres Studienziel. Wir analysierten erneut Gewebeproben von 169 Patientinnen. Hauptbefund war, dass – im Vergleich zu regredienten Befunden - die epitheliale CCL22 Expression bei CIN II Läsionen mit sukzessiver Progression deutlich erhöht war. 88% der CCL22 positive Zellen waren auch positiv für CD68, und waren somit den Makrophagen zuzuordnen. Bei 12 % der Zellen ließ sich gleichzeitig CD68 und FoxP3 nachweisen. Somit scheint eine erhöhte Expression von CCL22 (vorwiegend produziert von Makrophagen) mit einem erhöhten malignen Potential assoziiert zu sein, und die Intensität der CCL22 Expression könnte ebenfalls als Prädiktor für den Verlauf (Regression vs. Progression) von CIN II Läsionen dienen.

Die kombinierte Bestimmung von FoxP3 in regulatorischen T-Zellen und von CCL22 in Makrophagen könnte zukünftig die Genauigkeit erhöhen, mit der die maligne Entartung einer CIN II bei Frauen im reproduktiven Alter vorhergesagt werden kann. Ferner könnten beim

Nachweis eines hohen Prozentsatzes von CCL22-produzierenden M2-Makrophagen (PPAR γ positiv) Optionen für eine individualisierte Immuntherapie bestehen.

5. Abkürzungen

FIGO:	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
CIN:	Zervikale intraepitheliale Neoplasien
CA 125:	Cancer antigen 125
HE4:	Human epididymis protein 4
AUC:	Area under the curve
ROMA:	Risk of malignancy algorithm
FoxP3:	Forkhead Box Protein 3
Tregs:	Regulatorische T-Zellen
TILs:	Tumorinfiltrierenden Lymphozyten
HPV:	Humanes Papilloma Virus
CCL22:	C-C class chemokine ligand 22
CD68:	Cluster differentiation protein 68
PPAR γ :	Peroxisome proliferator-activated receptor γ

6. Curriculum vitae

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Sven Mahner, dem ärztlichen Direktor der LMU Frauenklinik, danke ich für die Möglichkeit zur Habilitation sowie für seine klinische und wissenschaftliche Unterstützung in meinem beruflichen Werdegang. Ich danke ihm besonders für die Begleitung meiner Habilitation als geschäftsführender Fachmentor.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Klaus Friese bedanke ich mich ganz herzlich für die Unterstützung meiner Habilitation, die unter seiner Klinikleitung ihren Beginn genommen hat.

Bei PD Dr. med. Alexander Burges bedanke ich mich, dass ich als Mitglied seiner Arbeitsgruppe „Ovarialkarzinom“ erstmals Zugang zum wissenschaftlichen Arbeiten bekam.

Bei Frau Prof. Dr. med. Miriam Lenhard möchte ich bedanken, dass Sie mich während meiner wissenschaftlichen Anfänge so tatkräftig unterstützt und motiviert hat.

Bei Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke möchte ich mich für seine Unterstützung in der Konzipierung und Umsetzung wissenschaftlicher Projekte bedanken.

Ich danke Frau PD Dr. med. Aurelia Vattai und Frau PD Dr. med. Susanne Beyer für den wissenschaftlichen sowie freundschaftlichen Austausch.

Frau Prof. Dr. med Stefanie Corradini, stellvertretende Direktorin der Strahlentherapie der LMU, danke ich herzlich für die Unterstützung als Fachmentorin.

Ich möchte dem ganzen Team des Forschungslabors, welches schon seit langem hervorragende Arbeit leistet, danken. Den vielen fleißigen Doktoranden gilt auch mein besonderer Dank- Danke für eure Unterstützung.

Im Besonderen danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kolben, der mich als Fachmentor und im Verlauf meiner gesamten Habilitation sehr unterstützt hat. Mit seiner beständigen Beharrlichkeit hat er mich immer wieder motiviert, den wissenschaftlichen Weg weiter zu gehen und das Ziel der Habilitation nicht aus den Augen zu verlieren.

Meiner Familie gilt mein ganz besonderer Dank, meinem Mann Andreas, der mich stets zur wissenschaftlichen Arbeit ermutigt hat, sowie meinen zwei wundervollen Kindern, die zwar

nicht aktiv an der Arbeit beteiligt waren, aber deren leuchtende Kinderaugen eine wunderbare Abwechslung zum klinischen und wissenschaftlichen Alltag waren.

Meinen Eltern danke ich auch von ganzem Herzen, da sie mir jederzeit jegliche Unterstützung bieten und meinen bisherigen Weg überhaupt erst möglich gemacht haben.

8. Referenzen

1. Robert Koch Institut ZfK. Krebs in Deutschland für 2017/2018, 13.Ausgabe. 2021.
2. Hertlein L, Kirschenhofer A, Fürst S, Beer D, Göß C, Lenhard M, et al. Malnutrition and clinical outcome in gynecologic patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;174:137-40.
3. Konsultationsfassung Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. Version 601 – Januar 2024 AWMF-Registernummer: 032-035OL. 2024.
4. Menon U, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Singh N, Ryan A, Karpinskyj C, et al. Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2021;397(10290):2182-93.
5. Schraml K. Gebärmutterhalskrebs - Nutzt die Vorsorge. Blogbeitrag, Biovarianca GmbH, Tirschenreuth. 2019.
6. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): Prävention des Zervixkarzinoms L, 2020, AWMF, 015/027OL R. 2020.
7. Cox JT, Schiffman M, Solomon D. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(6):1406-12.
8. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, Chelmow D, Einstein MH, Garcia F, et al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis.* 2020;24(2):102-31.
9. Athanasiou A, Veroniki AA, Efthimiou O, Kalliala I, Naci H, Bowden S, et al. Comparative effectiveness and risk of preterm birth of local treatments for cervical intraepithelial neoplasia and stage IA1 cervical cancer: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2022;23(8):1097-108.
10. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 2005;65(6):2162-9.
11. Hertlein L, Stieber P, Kirschenhofer A, Krockner K, Nagel D, Lenhard M, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) in benign and malignant diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(12):2181-8.
12. Huhtinen K, Suvitie P, Hiissa J, Junnila J, Huvila J, Kujari H, et al. Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts. *Br J Cancer.* 2009;100(8):1315-9.
13. Lenhard M, Stieber P, Hertlein L, Kirschenhofer A, Fürst S, Mayr D, et al. The diagnostic accuracy of two human epididymis protein 4 (HE4) testing systems in combination with CA125 in the differential diagnosis of ovarian masses. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(12):2081-8.
14. Bonin CM, Padovani CTJ, da Costa IP, Ávila LS, Ferreira AMT, Fernandes CES, et al. Detection of regulatory T cell phenotypic markers and cytokines in patients with human papillomavirus infection. *J Med Virol.* 2019;91(2):317-25.
15. Fu Q, Chen N, Ge C, Li R, Li Z, Zeng B, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology.* 2019;8(7):1593806.
16. Adurthi S, Krishna S, Mukherjee G, Bafna UD, Devi U, Jayshree RS. Regulatory T cells in a spectrum of HPV-induced cervical lesions: cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Am J Reprod Immunol.* 2008;60(1):55-65.
17. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10(9):942-9.
18. Wang L, Liu R, Ribick M, Zheng P, Liu Y. FOXP3 as an X-linked tumor suppressor. *Discov Med.* 2010;10(53):322-8.

19. Vattai A, Kremer N, Meister S, Beyer S, Keilmann L, Hester A, et al. Role of FoxP3-positive regulatory T-cells in regressive and progressive cervical dysplasia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2022;148(2):377-86.
20. Wang Q, Schmoeckel E, Kost BP, Kuhn C, Vattai A, Vilsmaier T, et al. Higher CCL22+ Cell Infiltration is Associated with Poor Prognosis in Cervical Cancer Patients. *Cancers (Basel).* 2019;11(12).
21. Jiang S, Yang Y, Fang M, Li X, Yuan X, Yuan J. Co-evolution of tumor-associated macrophages and tumor neo-vessels during cervical cancer invasion. *Oncol Lett.* 2016;12(4):2625-31.
22. Kolben TM, Rogatsch E, Vattai A, Hester A, Kuhn C, Schmoeckel E, et al. PPAR γ Expression Is Diminished in Macrophages of Recurrent Miscarriage Placentas. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7).
23. Xu Y, Romero R, Miller D, Kadam L, Mial TN, Plazyo O, et al. An M1-like Macrophage Polarization in Decidual Tissue during Spontaneous Preterm Labor That Is Attenuated by Rosiglitazone Treatment. *J Immunol.* 2016;196(6):2476-91.
24. Vattai A, Kremer N, Meister S, Beyer S, Keilmann L, Buschmann C, et al. Increase of the T-reg-recruiting chemokine CCL22 expression in a progressive course of cervical dysplasia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2023.