



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

**Die Rolle der Chemokine CXCL9 und CX3CL1 bei der
Immunantwort im Ovarialkarzinom**

Stefanie Seitz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Percy A. Knolle

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Holger Bronger
2. Prof. Dr. Michael Groll

Die Dissertation wurde am 21.03.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.06.2022 angenommen.

Ich widme diese Doktorarbeit meinem wegweisenden Biologielehrer
Herrn Klaus Holten, durch dessen Engagement ich bereits vor fast 14 Jahren meine
Leidenschaft für die Forschung entdecken durfte.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ZUSAMMENFASSUNG	1
II.	ABSTRACT	2
III.	EINLEITUNG	3
1.	Das Ovarialkarzinom.....	3
1.1.	Epidemiologie	3
1.2.	Klassifikation	4
1.3.	Karzinogenese und Aszitesbildung	6
1.4.	Therapie.....	9
1.4.1.	<i>Debulking</i> -Operation und adjuvante Chemotherapie	9
1.4.2.	Erhaltungstherapie mit PARP-Inhibition	11
2.	Rolle des Immunsystems beim Ovarialkarzinom.....	13
2.1.	Schlüsselkomponenten des Tumormikromilieus	13
2.2.	Tumor-assoziierte Makrophagen.....	14
2.3.	Mutationslast und Lymphozyteninfiltration.....	15
2.4.	Immuncheckpoint Inhibition	17
3.	Chemokine und ihre intratumorale Funktion.....	20
3.1.	Struktur, Funktion und Wirkung	20
3.2.	Das CXCL9/CXCR3-Chemokinsystem.....	23
3.3.	Das CX3CL1/CX3CR1-Chemokinsystem.....	25
IV.	ZIELSETZUNGEN.....	28
V.	MATERIAL.....	29
1.	Tumorgewebe und Patientencharakteristika	29
2.	Zelllinien und Zellkulturzusätze	32
2.1.	Zelllinien	32
2.2.	Zusätze für Zellkulturmedien	32
2.3.	Zellkultur-Lösungen.....	33
3.	Bakterienkulturen	33
4.	Antikörper.....	33
5.	Plasmide	35

6.	Primer.....	35
7.	qPCR-Sonden	36
8.	Chemikalien und Reagenzien.....	36
8.1.	Chemikalien	36
8.2.	Puffer und Lösungen	38
8.3.	Stimulationsreagenzien	39
8.4.	Therapeutika für <i>in vivo</i> Applikationen	39
8.5.	Kommerzielle Kits	40
8.6.	Marker	40
9.	Verbrauchsmaterial	40
10.	Technische Geräte.....	42
11.	Software.....	43
VI.	METHODEN	44
1.	Analyse der humanen Kollektive.....	44
1.1.	FFPE-Präparationsmethodik zur mikroskopischen Beurteilung.....	44
1.2.	Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung.....	44
1.3.	Immunhistochemische Färbungen auf humanem Gewebe.....	45
1.4.	Scoring und Auswertung.....	46
2.	Zellkultur und <i>in vitro</i> Experimente.....	47
2.1.	Kultivierungsbedingungen	47
2.2.	Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Zellen	47
2.3.	Zellproliferationsanalyse.....	48
2.4.	Beurteilung der Zellmorphologie	48
2.5.	<i>In vitro</i> Stimulationsexperimente	48
2.6.	Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS)	49
2.7.	Lentivirale Transduktion muriner Zelllinien.....	50
2.8.	Detektion von <i>Trp53</i> - bzw. <i>Brca2</i> -Knockout in ID8-Zellen mittels PCR.....	52
3.	Durchführung und Analyse syngener Mausmodelle	52
3.1.	Tierschutzantrag und Tierhaltung	52
3.2.	Murine Ovarialkarzinommodelle	53
3.3.	Überwachung des Tumorwachstums mittels <i>in vivo</i> Biolumineszenz.....	53
3.4.	<i>In vivo</i> Therapiedurchführung.....	54

3.5.	Finalisierungsprotokoll.....	54
3.6.	Immunhistochemische Analyse des Tumorgewebes.....	54
3.7.	Tumoraufschluss aus Kryogewebe.....	56
4.	Expressionsanalysen auf RNA-Ebene	56
4.1.	RNA Isolation	56
4.2.	cDNA-Synthese.....	56
4.3.	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	57
5.	Expressionsanalysen auf Proteinebene.....	58
5.1.	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	58
5.2.	Konzentrationsbestimmung mittels Bradford Assay.....	58
5.3.	Proteinaufschluss aus kultivierten Zellen.....	59
5.4.	Konzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure Assay	59
5.5.	Immunoblot	59
6.	Statistik.....	60
VII.	ERGEBNISSE	61
1.	Expression von CXCL9 in Ovarialkarzinom-Subtypen	61
2.	Murine Ovarialkarzinommodelle mit Cxcl9 Überexpression	62
2.1.	Lentivirale Überexpression in ID8 <i>Trp53</i> ^{-/-} und ID8 <i>Trp53</i> ^{-/-} <i>Brca2</i> ^{-/-} Zellen...	62
2.2.	Einfluss von Cxcl9 auf Wachstum, Überleben und Immuninfiltration im syngenem Ovarialkarzinom-Mausmodell (<i>Brca2</i> -Wildtyp)	64
2.2.1.	Überlebenszeiten	65
2.2.2.	Expressionsanalysen und Immunzellpopulationen im Tumor	65
2.3.	Abhängigkeit der Cxcl9-Wirkung vom adaptiven Immunsystem im <i>Brca2</i> -Wildtyp Ovarialkarzinommausmodell	69
2.3.1.	Überlebenszeiten	70
2.3.2.	Expressionsanalysen und Immunzellpopulationen im Tumor	70
2.4.	Einfluss von Cxcl9 auf Tumorwachstum, Überleben und Immuninfiltration im <i>Brca2</i> -defizienten Ovarialkarzinommausmodell	71
2.4.1.	Überlebenszeiten	72
2.4.2.	Expressionsanalysen und intratumorale Immunzellpopulationen	72
2.5.	Einfluss von Cxcl9 auf die Wirkung einer anti-PD-L1-Therapie im <i>Brca2</i> -Wildtyp-Ovarialkarzinommausmodell.....	74
2.5.1.	Überlebenszeiten	75

2.5.2.	Expressionsanalysen und Immunzellpopulationen.....	76
2.6.	Einfluss von Cxcl9 im <i>Brca2</i> -defizienten Ovarialkarzinommausmodell mit anti-PD-L1-Therapie	78
2.6.1.	Überlebenszeiten	79
2.6.2.	Expressionsanalysen und Immunzellpopulationen.....	80
2.7.	Experimentübergreifende Analysen.....	82
2.8.	Einfluss von CXCL9 auf die PD-L1-Expression	83
3.	Expression und Induktion von CX3CL1 im Ovarialkarzinom.....	85
3.1.	Expression in Ovarialtumoren und peritonealen Metastasen (HGSOC Kollektiv)	85
3.2.	Regulation von Cx3cl1 in murinen ID8-Ovarialkarzinomzellen	88
3.3.	Induktion von CX3CL1 durch PARP-Inhibitoren in humanen Ovarialkarzinomzelllinien.....	89
4.	Funktionelle Rolle von Cx3cl1 im syngenem Ovarialkarzinommodell	91
4.1.	Lentivirale Überexpression von Cx3cl1 in ID8 <i>Trp53^{-/-}</i> -Zellen	91
4.2.	Funktion von Cx3cl1 im syngenem Ovarialkarzinommausmodell (intraperitoneal).....	91
4.2.1.	Überlebenszeiten	92
4.2.2.	Expressionsanalysen und Immuninfiltration	92
4.3.	Einfluss des adaptiven Immunsystems auf den intraperitonealen Effekt von Cx3cl1	95
4.3.1.	Überlebenszeiten	96
4.3.2.	Expressionsanalysen und tumor-infiltrierende Makrophagen.....	96
4.4.	Lentivirale Cx3cl1-Überexpression in ID8 <i>Trp53^{-/-}</i> -S <i>FeGFPluc</i> -Zellen	97
4.5.	Funktionelle Bedeutung von Cx3cl1 im subkutanen Ovarialkarzinommausmodell	98
4.5.1.	Non-invasive Messungen des Tumorwachstums	98
4.5.2.	Überlebenszeiten	99
4.5.3.	Expressionsanalysen und intratumorale Immunzellpopulationen	100
VIII.	DISKUSSION	102
1.	Intratumorales Cxcl9 verbessert abhängig vom adaptiven Immunsystem die Gesamtüberlebensrate.....	102
2.	CXCL9 als prädiktiver Biomarker für die Effektivität einer	

	Immuneckpoint-Blockade	104
3.	Duale Rolle von CX3CL1 bei der Immuninfiltration und Metastasierung	109
IX.	AUSBLICK.....	114
X.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	115
XI.	TABELLENVERZEICHNIS	118
XII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	119
XIII.	LITERATURVERZEICHNIS	123
XIV.	DANKSAGUNG.....	149

I. ZUSAMMENFASSUNG

Die fortschreitende und rezidivierende Peritonealmetastasierung stellt das körpereigene Immunsystem in der Progression des Ovarialkarzinoms vor eine große Herausforderung. Im letzten Jahrzehnt stützten zahlreiche Studien die Hypothese, dass ein immunreaktiver Subtyp zu einem verbesserten Überleben führt. Um ein tumorsuppressives Milieu zu schaffen, bedarf es der Infiltration zytotoxischer Lymphozyten, welche durch die intratumorale Akkumulation bestimmter Chemokine verbessert werden kann. Die vorliegende Studie fokussierte sich durch die hohe klinische Relevanz auf den Subtyp des *high-grade* serösen Ovarialkarzinoms und adressierte die Rolle der Chemokine CXCL9 und CX3CL1 in der Immunantwort.

In murinen Studien mit dem etablierten und vollständig immunkompetenten ID8-Modell konnte erstmals im metastasierten Ovarialkarzinom-Modell ein signifikanter Überlebensvorteil durch die intratumorale Überexpression von Cxcl9 verzeichnet werden. In Anlehnung an aktuelle klinische Studien wurde repliziert, dass eine Immun-Checkpoint-Blockade (ICB) mittels anti-PD-L1 Therapie auch im murinen Modell zunächst keinen Effekt hat. Durch die Überexpression von Cxcl9 wurde die Anzahl von tumor-infiltrierenden Lymphozyten jedoch soweit erhöht, dass sich in Kombination mit anti-PD-L1 ein additiver Effekt auf das Überleben ergab. Im *Brca2*-mutierten Modell blieb die ICB jedoch sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Cxcl9 erfolglos. Studien mit CX3CL1 Überexpression ergaben in der retrospektiven Studie im humanen Kollektiv und im murinen *in vivo* Versuch ein signifikant verschlechtertes Überleben im metastasierten Tumormodell, wobei im Gegensatz dazu die Tumorprogression im subkutanen Primärtumor-Modell signifikant reduziert werden konnte. Die Erkenntnis, dass Olaparib und Niraparib *in vitro* CX3CL1 induzieren können, spiegelt zudem einen bisher unbekanntem molekularen Nebeneffekt in der Erhaltungstherapie des Ovarialkarzinoms mit PARP-Inhibition wieder.

Die erarbeiteten Daten schlagen das Chemokin CXCL9 sowohl als Zielstruktur für eine verbesserte Immuninfiltration als auch als Biomarker für die Sensitivität der Immuncheckpoint-Blockade im HR-(Homologe Rekombination) profizienten Ovarialkarzinom vor. Die CX3CL1-Ergebnisse bestärken hingegen eine duale Rolle des Chemokins, welches durch sein Vorkommen in einer löslichen und membranständigen Form sowohl die Immuninfiltration als auch die Tumorprogression fördern kann.

II. ABSTRACT

Ovarian cancer with prevalence of progressive and recurrent peritoneal metastasis poses a major challenge to the immune system. Within the last decade, numerous studies supported the hypothesis that an immunoreactive subtype of ovarian cancer leads to improved survival data. The infiltration of cytotoxic lymphocytes can provide a tumor suppressive milieu – a process which can be enhanced by the intratumoral accumulation of certain chemokines. The present study focuses on the subtype of high-grade serous epithelial ovarian cancer due to its high clinical relevance and addresses the role of chemokines CXCL9 and CX3CL1 in the immune response against tumor progression.

Murine studies with the well-established immunocompetent ID8 serous EOC model demonstrated for the first time a significant survival benefit in a metastatic model with intratumoral overexpression of Cxcl9. Reflecting recent clinical trials, it was replicated that immune checkpoint blockade (ICB) using anti-PD-L1 therapy initially had no effect in the murine model without Cxcl9 either. However, Cxcl9 overexpression increased the number of tumor-infiltrating lymphocytes to such an extent that, in combination with anti-PD-L1, there was an additive effect on survival. Of note, those results could not be achieved if tumor cells carried a mutation in the *Brca2* gene.

A retrospective study with human collectives, as well as metastatic *in vivo* trials revealed that high intratumoral Cx3cl1 expression leads to significantly worsened survival, whereas in contrast, tumor progression was significantly reduced in a subcutaneous primary tumor *in vivo* model. The finding that olaparib and niraparib can induce CX3CL1 *in vitro*, also reflects a previously unknown molecular side effect in the maintenance therapy of ovarian cancer with PARP-inhibitors.

The generated data suggest the chemokine CXCL9 as both a target for enhanced immune infiltration and a biomarker for the sensitivity of immune checkpoint blockade in HR-proficient ovarian cancer. The CX3CL1 results thereby suggest a dual role for the chemokine as it may promote both immune infiltration and tumor progression through its presence in a soluble and membrane-bound form.

III. EINLEITUNG

1. Das Ovarialkarzinom

1.1. Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist der weltweit siebthäufigste Tumor bei Frauen (Ferlay et al., 2015) und die häufigste Todesursache gynäkologischer Malignome (Siegel et al., 2020). Etwa 60 % der Frauen werden mit einer bereits fortgeschrittenen Erkrankung diagnostiziert (Howlander et al., 2015), wodurch sich eine insgesamt ungünstige Prognose mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von unter 45 % ergibt (Zentrum für Krebsregisterdaten Robert Koch-Institut, 2017). Fehlende Screening-Programme zur Früherkennung (Crayford et al., 2000), die verbreitete Metastasierung in der Bauchhöhle (Lengyel, 2010) und die rasche Entwicklung von Chemotherapieresistenzen (Pölcher et al., 2014) erschweren eine erfolgreiche Frühdiagnostik und gut ansprechende Therapieverläufe. Obwohl etwa 80 % der Patientinnen auf die initiale Therapie ansprechen, treten bei der Mehrzahl der Ovarialkarzinome Rezidive auf (Gaillard et al., 2016). Im Jahre 2017 wurden in Deutschland rund 7.300 Neuerkrankungen verzeichnet, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 68 Jahren lag (Zentrum für Krebsregisterdaten Robert Koch-Institut, 2017).

Risikofaktoren für die Erkrankung an Eierstockkrebs sind vor allem das zunehmende Alter und die genetische Prädisposition (Fotopoulou & Herzog, 2018). Je nach Tumorsubtyp sind vererbte genetische Mutationen mit etwa 15 % aller Ovarialkarzinome assoziiert (National Academies of Sciences, 2016). Auch Adipositas, Zigarettenrauchen und Hormonersatztherapien werden als Risikofaktoren genannt (Beral et al., 2007; Jordan et al., 2007; Leitzmann et al., 2009). Als protektive Faktoren gelten unter anderem Schwangerschaften, langes Stillen, eine Tubenligatur oder Hysterektomie sowie die Einnahme oraler Kontrazeptiva (Fotopoulou & Herzog, 2018). In einer wegweisenden Meta-Analyse wurde gezeigt, dass bei Frauen, die mindestens zehn Jahre lang orale Kontrazeptiva eingenommen hatten, die Ovarialkarzinom-Inzidenz um mehr als 50 % reduziert werden konnte (Havrilesky et al., 2013). Eine verringerte Anzahl an Ovulationszyklen reduziert das Ovarialkarzinomrisiko also erheblich.

Obwohl es keine für Eierstockkrebs spezifischen Symptome gibt, berichten etwa 90 %

der betroffenen Patientinnen Beschwerden wie Blähungen, Becken- oder Bauchschmerzen, Essstörungen oder eine Zunahme des Bauchumfangs, welche zur möglichen Früherkennung in den sogenannten „Goff Index“ einfließen (Goff et al., 2004). Zahlreiche Screening-Studien konnten im Allgemeinen noch keinen eindeutigen Effekt auf das Überleben nachweisen. Der Serummarker CA125 (*cancer antigen 125*) ist bei etwa 80 % der Ovarialkarzinom-Patientinnen erhöht (Niloff et al., 1984), doch die PLCO (Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian) Krebs-Screening Studie konnte unter Verwendung von transvaginalem Ultraschall und CA125-Screening keine Reduktion der krankheitsspezifischen Mortalität bei Frauen mit einem durchschnittlichen Risiko für Eierstockkrebs erreichen (Buys et al., 2011). Aufgrund der ausgeprägten Heterogenität von Ovarialkarzinomen ist es zudem wahrscheinlich, dass kein einzelner Tumor-Biomarker ausreichen würde, um alle histologischen Subtypen frühzeitig erkennen zu können (National Academies of Sciences, 2016).

1.2. Klassifikation

Da mehrere Subtypen mit unterschiedlichen Ursprüngen, Risikofaktoren und Prognosen bestehen, sollte Eierstockkrebs nicht als eine einzelne Krankheit betrachtet werden. Tumor-Subtypen entstehen beispielsweise aus unterschiedlichen Zelltypen der Eierstöcke: Tumore epithelialen Ursprungs (Karzinome, 80-90 %), Keimstrang-Stromatumore (etwa 8 %), Keimzelltumore (3-5 %) und seltene andere (Mayr et al., 2014). Die Mehrzahl der Ovarialkarzinome kann in fünf Typen eingeteilt werden: 1. *High-grade* seröses Karzinom, 2. Klarzelliges Karzinom, 3. Endometrioides Karzinom, 4. *Low-grade* seröses Karzinom, und 5. Muzinöses Karzinom (Gurung et al., 2013; Kalloger et al., 2011). Die prozentuale Aufteilung und die Beteiligung seltenerer Subtypen ist Abbildung 1 zu entnehmen.

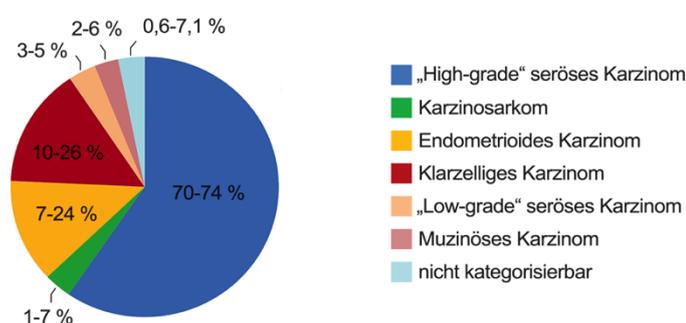


Abbildung 1: Prozentualer Anteil verschiedener Ovarialkarzinom-Subtypen.

(Gilks et al., 2008; Seidman et al., 2004) adaptiert nach (National Academies of Sciences, 2016).

Das histopathologische *Grading* spiegelt den Grad der Abweichung von der normalen Gewebearchitektur wider und wird beim serösen Ovarialkarzinom in *low-grade* (gut bis moderat differenziert) und *high-grade* (schlecht differenziert) unterteilt (Vang et al., 2009). Entscheidend ist hierbei vor allem, dass sich die *high-grade* serösen Ovarialkarzinome schneller ausbreiten und zu einem schlechteren Überleben führen als der *low-grade* Subtyp (Levanon et al., 2008). Auf der Ebene genetischer Mutationen unterteilen Shih und Kurman das epitheliale Ovarialkarzinom in einen Typ I aus *low-grade* Tumoren mit Mutationen in Genen wie *BRAF*, *K-RAS* und *PTEN* und in einen Typ II aus *high-grade* Tumoren mit vorwiegend *TP53*-Mutationen (Shih & Kurman, 2004). Die Mutation des Tumorsuppressor-Gens *TP53* ist hierbei grundlegend für die maligne Transformation und universell vertreten (Ahmed et al., 2010). Durch die früh in der Tumorentstehung auftretende Inaktivierung dieses Transkriptionsfaktors können die Tumorzellen der Zelloptose entgehen und aggressiver proliferieren (Holschneider & Berek, 2000). Zudem wird in etwa 15 % der *high-grade* serösen Ovarialkarzinome eine Keimbahnmutation in den Genen *BRCA1* (*breast cancer gene 1*) oder *BRCA2* (*breast cancer gene 2*) beobachtet, wodurch die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) über homologe Rekombination (HR) stark beeinträchtigt wird und sich bei der Proliferation der Tumorzellen weitere Spontanmutationen einbauen können (Alsop et al., 2012). Die Bezeichnung lässt sich von dem hohen Risikofaktor der Mutationen für die Entwicklung von Brust- oder Eierstockkrebs herleiten. Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken beläuft sich bei einer *BRCA1* Mutation auf 40-60 % und bei einer *BRCA2* Mutation auf gut 10 % (Kiechle et al., 2014; Tinelli et al., 2010). Eine Mutation im ebenfalls an der homologen Rekombination beteiligten *RAD51C* Gen ergibt ein Lebenszeitrisko für Eierstockkrebs von 10-15 % (Lancaster et al., 2015).

Eine Aussage über die Ausbreitung und Größe des Karzinoms, das sogenannte *Staging*, wird durch die Kombination aus FIGO- (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) und TNM- (*Tumor, lymph node, metastasis*) Klassifikation getroffen. Die verschiedenen Stadien werden durch operative Exploration und histopathologische Befundung der Bauchhöhle eingeteilt (Zeppernick & Meinhold-Heerlein, 2014). Maßgeblich fließen hierbei Tumorgöße und -lokalisierung, sowie Lymphknotenbefall und die Ausbildung von Fernmetastasen ein. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist mit dem FIGO-Stadium assoziiert und beträgt bei einer Studie von Yamagami und Kollegen bei FIGO I 91 %, bei FIGO II 77 %, bei FIGO III 49 % und bei FIGO IV 34 % (Yamagami et al., 2020). Aufgrund der Heterogenität von Ovarialkarzinomen ist die detaillierte

pathologische und chirurgische Befundung sowohl für die Charakterisierung der Erkrankung als auch für die Festlegung des Behandlungsalgorithmus unerlässlich.

1.3. Karzinogenese und Aszitesbildung

Da die frühen Stadien des Ovarialkarzinoms meist unbemerkt bleiben, ist wenig über die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung bekannt. Es gibt allerdings immer mehr Hinweise darauf, dass verschiedene Subtypen des Ovarialkarzinoms unterschiedliche Entstehungsorte haben. 1972 stellte Fathalla die Hypothese auf, dass es einen Zusammenhang zwischen der wiederholten Verletzung des Ovarialepithels bei der Ovulation und der Häufigkeit der Entwicklung epithelialer Neoplasmen geben könnte (Fathalla, 1972). Auch Fleming et al. unterstützten 2006 einen möglichen Zusammenhang zwischen wiederkehrender Ovulation, Entzündung und epithelialer Ovarialkarzinogenese (Fleming et al., 2006). Die Einzigartigkeit des Ovulationsprozesses als hormoninduzierte Verletzung zieht Trauma- und Reparaturprozesse sowie DNA-Schäden nach sich, welche das Oberflächenepithel der Eierstöcke oder die Fimbrienschleimhaut verändern können (King et al., 2011). Im physiologischen Prozess wird die Epithelreparatur nach Freisetzung einer Oozyte ermöglicht, indem sich epitheliale Ovarialzellen in einen mesenchymalen Phänotyp umwandeln und dadurch ihre Motilität und Proliferationsrate erhöhen (Auersperg et al., 2001). Somit geht das Ovarialkarzinom häufig mit einer frühen Invasion des umgebenden Peritoneums einher (Kipps et al., 2013).

In nachfolgenden Studien wurde gezeigt, dass seröse Ovarialkarzinome viele biochemische Marker mit dem Eileiterepithel teilen, und dass sowohl die Ovarialoberfläche als auch die Eileiterfimbrien während der Ovulation mit Follikelflüssigkeit in Kontakt kommen und daher entzündlichen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt sind (Tone et al., 2012). Zudem wurden auf Eileitern, die Frauen mit einer genetischen Prädisposition für Eierstockkrebs entnommen wurden, Läsionen detektiert, welche stark dem *high-grade* serösen Ovarialkarzinom ähneln und daher als sogenannte STICs (*serous tubal intraepithelial carcinomas*) bezeichnet wurden (Piek et al., 2001). Dies und weitere Faktoren legen den Schluss nahe, dass das Fimbrienende des Eileiters ein alternativer oder sogar der Hauptursprungsort des serösen Ovarialkarzinoms sein könnte (Howitt et al., 2015; Kurman & Shih, 2010; Lee et al., 2007). Studien weisen darauf hin, dass Endometriose mit 15-50 % der klarzelligen und endometrioiden Karzinome assoziiert ist und dass Frauen mit Endometriose ein zwei- bis dreifach höheres Risiko haben, Eierstockkrebs

zu entwickeln (Brinton et al., 2005; Pavone & Lyttle, 2015). Der Ursprung von serösen *borderline* Tumoren und muzinösen Karzinomen ist noch nicht geklärt (National Academies of Sciences, 2016). Abbildung 2 veranschaulicht mögliche Ursprünge verschiedener Ovarialkarzinome.

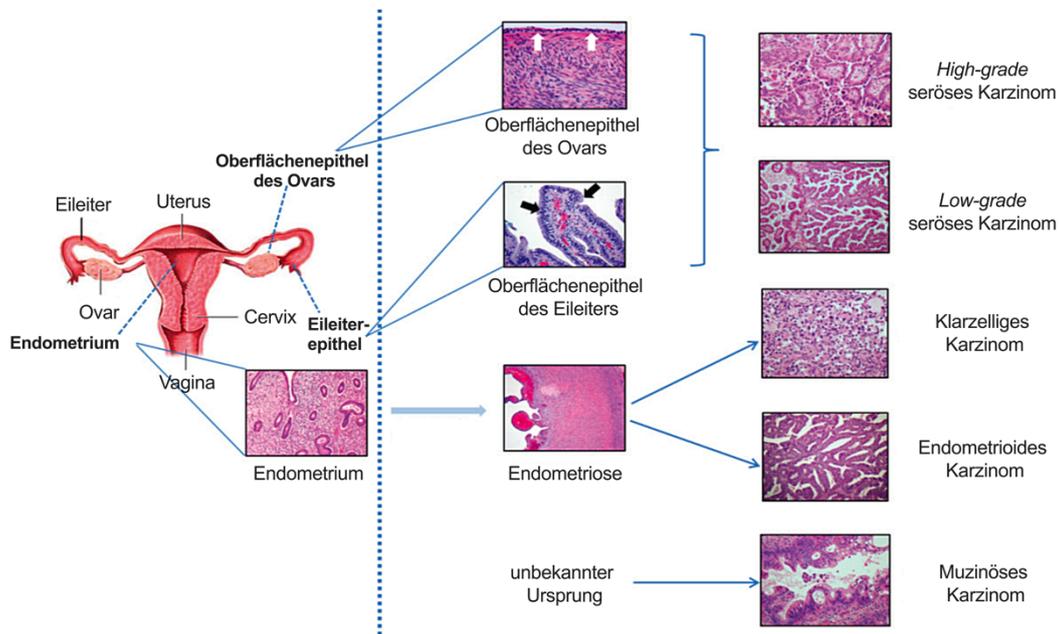


Abbildung 2: Potenzielle zelluläre Ursprünge verschiedener Ovarialkarzinome

Adaptiert nach (National Academies of Sciences, 2016).

Die Karzinogenese des Ovarialkarzinoms unterscheidet sich von hämatogen metastasierenden Tumoren, da Ovarialkarzinomzellen primär innerhalb der Bauchhöhle disseminieren und nur oberflächlich invasiv sind (Lengyel, 2010). Während der Embryogenese entstehen die Oberflächenepithelzellen des Ovars aus dem koelomischen Mesothel, was erklären könnte, warum Eierstockkrebs über den transkoelomischen Weg in der Bauchhöhle disseminiert (Auersperg et al., 2001). Durch welche Mechanismen sich die malignen Zellen vom Primärtumor lösen ist bis heute nicht klar definiert, doch die intraabdominale Verbreitung durch die Bewegung der Peritonealflüssigkeit gilt als Voraussetzung sowohl für die initiale Makrometastasierung als auch für die Entstehung von Rezidivläsionen an anderen Geweben der Bauchhöhle, welche wie das Ovar von einem mesothelialen Oberflächenepithel umgeben sind (z.B. Peritoneum, Omentum) (Main et al., 2017; Tan et al., 2006).

Um Zell-Zell-Adhäsionen zu lösen und einen migratorischen Phänotyp zu erlangen, durchlaufen Tumorzellen eine EMT (epithelial-zu-mesenchymale Transformation), was eine Veränderung der Cadherin- und Integrin-Expression sowie eine Hochregulierung

proteolytischer Signalwege auslöst (Kalluri & Weinberg, 2009). Die Bildung von Sekundärläsionen erfolgt unter anderem durch eine kontrollierte Interaktion von Adhäsionsrezeptoren und Proteasen, sowie durch die Rückwandlung zum epithelialen Phänotyp (MET, mesenchymal-zu-epitheliale Transformation) (Lengyel, 2010). Die Adhäsion an Mesothelzellen der Peritonealhöhle wird beispielsweise durch die Expression von CD44 (*cluster of differentiation 44*) (Gardner et al., 1996), β -Integrinen (Wagner et al., 2011) und CA125 (Rump et al., 2004) auf der Oberfläche der Ovarialkarzinomzellen erleichtert. Tumorzellen in Sekundärläsionen weisen zudem genetische Veränderungen auf, die zu aggressiveren Klonen führen können (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011).

Bei mehr als einem Drittel der Ovarialkarzinom-Patientinnen entwickelt sich unabhängig vom histologischen Subtyp im Krankheitsverlauf ein malignitätsassoziiertes Peritonealerguss, welcher als maligner Aszites bezeichnet wird (Kipps et al., 2013). Im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom erhöht sich der Anteil des Aszitesvorkommens auf etwa 70 % (Moughon et al., 2015). Intraperitoneale Metastasen sind zu diesem Zeitpunkt bereits weit verbreitet und die physiologisch produzierte Peritonealflüssigkeit kann nicht mehr ausreichend resorbiert werden. Der im Ovarialkarzinom häufig überexprimierte Endothelwachstumsfaktor VEGF trägt durch die Permeabilisierung von Blutgefäßen wesentlich zur Aszitesbildung bei (Lengyel, 2010; Neufeld et al., 1999): Ist bei Patientinnen mit Tumoren in der Peritonealmembran die Flüssigkeits-Filtrationsfläche durch die Zunahme an semi-permeablen Mikrogefäßen erhöht (Nagy et al., 1993), sinkt die kolloidosmotische (onkotische) Druckdifferenz zwischen Endothel- und Mesothelschicht ab und es kann keine Wasserrückresorption in die Kapillaren aus dem interstitiellen Raum mehr erfolgen (siehe Abbildung 3). Durch die hohe Proteinkonzentration in malignem Aszites wird der onkotische Effekt weiter verstärkt und die Richtung des Flüssigkeitsstroms führt in die Peritonealhöhle (Kipps et al., 2013).

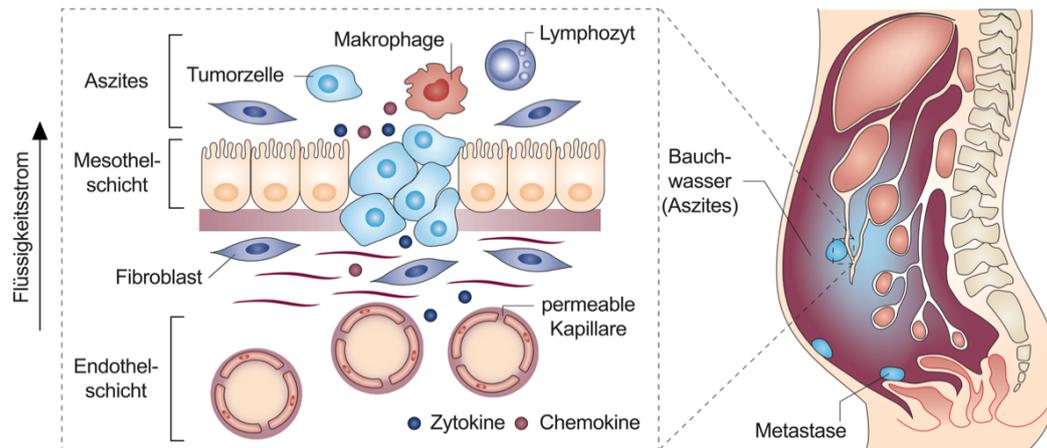


Abbildung 3: Die Veränderung des kolloidosmotischen Drucks durch Läsionen im Mesothel und die Permeabilisierung des Endothels führt zur Bildung von Bauchwasser (Aszites).

Adaptiert nach (Kipps et al., 2013).

Die zellulären Bestandteile in malignem Bauchwasser bestehen laut B. Sheid aus 37 % Lymphozyten, 29 % Mesothelzellen, 32 % Makrophagen und <0,1 % Adenokarzinomzellen (Sheid, 1992). Zudem herrscht im Aszites ein effizienter Austausch löslicher Entzündungs- und Wachstumsfaktoren, welche die Invasion von Tumorzellen unterstützen können (Wang E. et al., 2005). Eine hohe IL-6 und IL-10 Konzentration im Aszites wurde mit einem schlechteren Chemotherapieansprechen und einem schlechteren Überleben assoziiert (Matte et al., 2012; Penson et al., 2000).

Stellt sich die Patientin in der Klinik mit karzinose-assoziiertem Aszites vor, so werden die Symptome meist mittels perkutaner Drainage kurzfristig gelindert und die Diagnose durch eine anschließende zytologische Beurteilung des Aszites gestellt (National Academies of Sciences, 2016). Die zellulären und löslichen Bestandteilen sind eine vielversprechende Quelle für die Untersuchung von biologischen Aspekten wie Therapieresistenz oder Tumorprogression sowie von therapeutischen Zielstrukturen und prognostischen oder prädiktiven Biomarkern (Kipps et al., 2013).

1.4. Therapie

1.4.1. *Debulking*-Operation und adjuvante Chemotherapie

Aufgrund fehlender effektiver *Screening*-Strategien wird wie bereits erwähnt bei der Mehrzahl der Patientinnen die pathologisch bestätigte Diagnose Ovarialkarzinom erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt (Bowtell et al., 2015; Lengyel, 2010). Wenn bereits eine Fernmetastasierung stattgefunden hat, ist die erste Therapieoption in aller

Regel die *Debulking*-Operation bestehend aus Hysterektomie, bilateraler Salpingo-Oophorektomie, Omentektomie und dem Entfernen der peritonealen Metastasen (Chang et al., 2015; Pomel et al., 2007). Da ein optimales *Debulking*, d.h. eine postoperative makroskopische Tumorfreiheit, mit einem signifikanten Überlebensvorteil verbunden ist, liegt der Fokus des chirurgischen Ansatzes auf der bestmöglichen Reduzierung der Resttumorlast (Bristow et al., 2014; Chi et al., 2012). Beim Vorhandensein von Komorbiditäten oder schlecht zugänglichen Tumorarealen besteht zudem die Möglichkeit, die Tumorlast durch eine „neoadjuvante“ Chemotherapie initial zu reduzieren und die anschließende chirurgische Resektion zu erleichtern (Morrison et al., 2012). Je nach operativer Zugänglichkeit wird der Tumorstatus nach der Operation schließlich als komplette Resektion (kein Resttumor), optimale Zytoreduktion (Resttumor mit Durchmesser unter 10 mm) oder suboptimale Zytoreduktion (Resttumor mit Durchmesser über 10 mm) beschrieben (Hacker, 2013).

Spätestens sechs Wochen nach der primären Operation wird der Leitlinie entsprechend chemotherapeutisch mit einer Kombination aus Platin- und Taxan-basierten Medikamenten therapiert (Leitlinienprogramm AWMF, 2020). Der zytotoxische Effekt beruht bei Carboplatin auf der Quervernetzung von DNA-Molekülen, während Paclitaxel zur Familie der Zytoskelett-Inhibitoren gehört und einen Zellzyklusarrest herbeiführt (Lipp & Bokemeyer, 2005). Die Kombination aus beidem bleibt bis heute das Rückgrat der chemotherapeutischen Erstbehandlung des Ovarialkarzinoms (Boyd & Muggia, 2018). In Deutschland kann zudem adjuvant der antiangiogene monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin®) eingesetzt werden (Leitlinienprogramm AWMF, 2020). Dieser ist gegen den bereits erwähnten Endothelwachstumsfaktor VEGF gerichtet, welcher in fast allen Ovarialkarzinomen exprimiert wird und Signalwege stimuliert, die zur Bildung und Verzweigung neuer Tumorblutgefäße und somit zum Tumorwachstum führen (Hicklin & Ellis, 2005). Durch die Kombinationstherapie mit Bevacizumab kann laut Studien das progressionsfreie Überleben verlängert werden (Burger et al., 2007). Obwohl die initialen Ansprechraten auf die Chemotherapie hoch sind (Bowtell et al., 2015), gelingt es aufgrund von intrinsischen oder erworbenen Resistenzmechanismen oftmals nicht, alle Tumorzellen zu eliminieren (Colombo et al., 2014). Patientinnen mit einem progressionsfreien Überlebensintervall von weniger als sechs Monaten nach Abschluss der Chemotherapie gelten dabei als „platinresistent“ (Davis et al., 2014). Infolgedessen kommt es häufig zu einem Wiederauftreten von Metastasen im Peritoneum und anderen peritonealen Organen, was schließlich zur

Entwicklung eines letztendlich meist tödlichen Rezidivs führt. Angesichts der hohen Rezidivraten bei verfügbaren Standardtherapien besteht also dringender Bedarf an alternativen Erhaltungstherapien.

1.4.2. Erhaltungstherapie mit PARP-Inhibition

Die im Jahr 2018 auf dem ESMO (*European Society for Medical Oncology*) Kongress veröffentlichten Ergebnisse der SOLO-1 Studie stellen als Möglichkeit der Erstlinien-Erhaltungstherapie den Durchbruch in der Behandlung von neu diagnostiziertem fortgeschrittenen Eierstockkrebs dar: Bei 391 eingeschlossenen Patientinnen mit *BRCA*-Mutation, FIGO III-IV Stadium, zytoreduktiver Operation und Platinansprechen betrug das progressionsfreie Überleben in der Placebo Gruppe drei Jahre nach Randomisierung 26,9 %, wohingegen der Median in der Erhaltungstherapiegruppe mit dem PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) Inhibitor Olaparib mit 60,4 % noch nicht erreicht wurde. Zudem konnte durch den überschaubaren Einfluss von Nebenwirkungen kein Unterschied zwischen beiden Gruppen in der gesundheitsbezogenen Lebensqualität festgestellt werden (Moore K. et al., 2018).

Der Therapieerfolg der PARP-Inhibition basiert auf dem Prinzip der synthetischen Letalität (siehe Abbildung 4). DNA-Schäden, die beispielsweise durch den Einsatz von Chemotherapeutika entstanden sind, können in einer gesunden Zelle durch den Prozess der Basen-Exzisionsreparatur vermindert werden, wobei die Aktivität des PARP-Enzyms die entscheidende Rolle spielt (Amé et al., 2004; Dantzer et al., 2000). Das Enzym bindet an Einzelstrangbrüche und führt DNA-Reparaturproteine wie XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*) durch die als „PARylierung“ bezeichnete, posttranslationale Modifikation verschiedener Proteinsubstrate an die richtige Stelle (Lindahl et al., 1995; Rouleau et al., 2010). PARP-Inhibitoren konkurrieren als Nicotinamid-Analogon am katalytischen Zentrum des PARP-Enzyms mit NAD^+ (oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) und hemmen somit die nachfolgende „PARylierung“ (Curtin & Szabo, 2013; Purnell & Whish, 1980). Ein weiterer Effekt von PARP-Inhibitoren ist das sogenannte „PARP-Trapping“, wobei die normalerweise an eine DNA-Reparatur anschließende Dissoziation der PARP-Enzyme verhindert wird (Shen et al., 2015). Durch den stabilisierten PARP-DNA-Komplex wird die DNA-Replikation verhindert und es entstehen Doppelstrangbrüche, die nur durch einen alternativen Reparaturprozess korrigiert werden können (Murai et al., 2012). Bei Patientinnen mit einer bestehenden *BRCA1*- oder *BRCA2*- Mutation ist der zweite wichtige DNA-Reparaturprozess der homologen Rekombination (HR) stark

beeinträchtigt (Gudmundsdottir & Ashworth, 2006). Wird also mittels PARP-Inhibition zusätzlich zur homologen Rekombination auch die Basen-Exzisionsreparatur deaktiviert, können Fehler bei der Replikation nur noch über die fehleranfällige nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) repariert werden und die ohnehin genetisch instabilen Tumorzellen werden durch die starke Mutationslast in die Apoptose gezwungen (Ashworth, 2008).

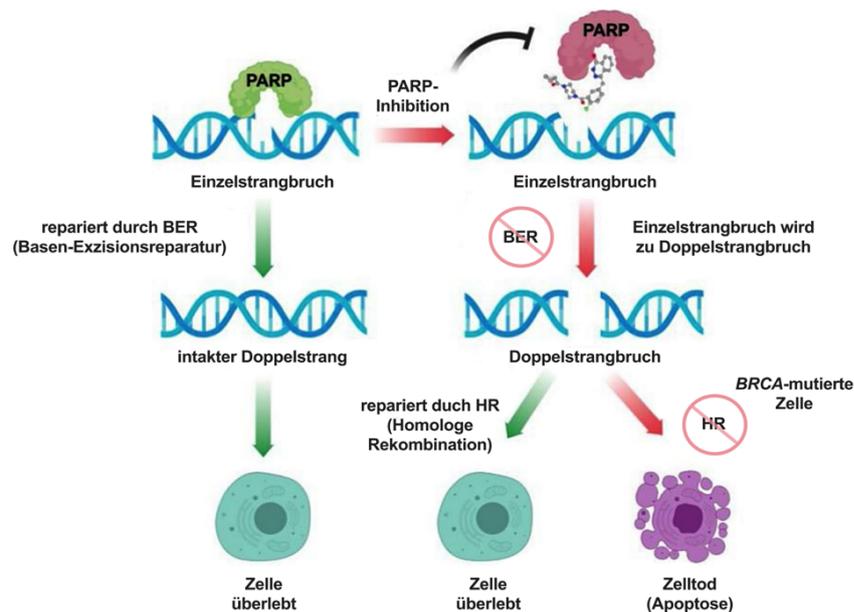


Abbildung 4: Prinzip der synthetischen Letalität durch PARP-Inhibition bei *BRCA*-mutierten Zellen.

Unter PARP-Inhibition kann keine Basen-Exzisionsreparatur (BER) mehr stattfinden und es entstehen Doppelstrangbrüche, welche durch den Vorgang der homologen Rekombination (HR) repariert werden können. Bei *BRCA*-mutierten Zellen ist der HR-Prozess stark beeinträchtigt und die Zelle geht in Apoptose. Adaptiert nach (Zheng et al., 2020).

Basierend auf den Daten der PRIMA-Studie (González-Martín et al., 2019) kann zudem auch bei nicht *BRCA*-mutierten Patientinnen ein PARP-Inhibitor (Niraparib) eingesetzt werden (Leitlinienprogramm AWMF, 2020).

Ein Nebeneffekt der PARP-Therapie ergibt sich ähnlich wie bei der Anwendung von Chemotherapeutika oder bei Tumoren mit *BRCA*-Mutation durch die Ansammlung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten im Zytosol der Tumorzelle. Diese aktivieren über den sogenannten *second messenger* cGMP (Zyklisches Guanosinmonophosphat) den STING-(*stimulator of interferon genes*) Signalweg, welcher wiederum über die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren eine Interferon-Typ I Antwort auslöst. So werden im Nachgang mehr tumorsuppressive T-Zellen und natürliche Killerzellen in den Tumor gelockt, welche zu einer verbesserten Prognose führen

können (Ding et al., 2018; Shen J. et al., 2018).

In Aussicht stehen des Weiteren Entwicklungen für neuartige immunologische Therapiestrategien wie beispielsweise die Immun-Checkpoint-Inhibition, worauf unter Punkt 2.3 noch näher eingegangen wird. Auch Technologien wie das *Next-Generation-Sequencing* und Initiativen wie *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) werden die Forschung durch die Aufdeckung von Aberrationen und gestörten Signalwegen beim Ovarialkarzinom in Zukunft weiter vorantreiben und die Entwicklung personalisierter und vor allem subtypspezifischer Therapieoptionen unterstützen.

2. Rolle des Immunsystems beim Ovarialkarzinom

2.1. Schlüsselkomponenten des Tumormikromilieus

Wie bei vielen anderen Krebserkrankungen spielt das Tumormikromilieu auch beim Ovarialkarzinom eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsprogression und der Beeinflussung der Malignität (Freedman et al., 2004; Wang et al., 2006). Die Tumorphiliferation hängt im Allgemeinen von einer Reihe genetischer und epigenetischer Aberrationen in den Krebszellen ab, welche wiederum auch die zelluläre und humorale Zusammensetzung des Mikromilieus beeinflussen (Ugel et al., 2015). Durch die Aszitesbildung und die damit einhergehende intraperitoneale Dissemination ist das Immunsystem im Ovarialkarzinom vor eine ganz spezielle Herausforderung gestellt. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit eines genauen Verständnisses der Rolle spezifischer Entzündungszelltypen bei der Progression oder Hemmung von Ovarialtumoren. Eine erfolgreiche Eindämmung des Tumorgewebes erfordert eine effektive Infiltration durch tumorsuppressive Immunzellen. Innerhalb der antigenspezifischen adaptiven Immunantwort spielen hierbei neben den CD4-positiven T-Helferzellen die CD8-positiven T-Zellen die wohl wichtigste Rolle, da sie zytotoxische Moleküle wie Perforin und Granzym ausschütten und inflammatorische Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$ (Interferon-gamma) und $\text{TNF}\alpha$ (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) sezernieren (Martínez-Lostao et al., 2015). Als Teil der humoralen Immunantwort regulieren diese Zytokine durch die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege nicht nur Zellproliferation und Apoptose (Pfeffer, 2003), sondern führen auch extrazellulär zu einer Rekrutierung und Aktivierung weiterer zytotoxischer Immunzellen wie beispielsweise natürlicher Killerzellen (Lee et al., 2012). Krebszellen entgehen der immunologischen Eliminierung indem sie immunsuppressiv orientierte Zelltypen anlocken, die sich neben den regulatorischen T-Zellen, welche die Aktivität

von Effektor-T-Zellen unterdrücken (McCaw et al., 2019), hauptsächlich aus der angeborenen Immunabwehr zusammensetzen. Während der Tumorgenese werden beispielsweise myeloide Suppressorzellen (MDSCs) rekrutiert, welche die Vaskularisierung fördern und die Effektor-Immunantwort stören können (Quail & Joyce, 2013). Auch Adipozyten im von Metastasen befallenen Omentum sezernieren oft Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation von Tumorzellen weiter fördern können (Wagner & Dudley, 2013). Zudem infiltrieren alternativ aktivierte Makrophagen das neoplastische Gewebe (Hanahan & Weinberg, 2011), was durch die Produktion von Schlüsselmediatoren sowohl bei serösen als auch bei muzinösen Ovarialkarzinomen zum Wachstum, zur Invasion und zur Metastasierung von Tumoren beitragen kann (Hagemann et al., 2006; Kawamura et al., 2009; Takaishi et al., 2010) und daher im nächsten Absatz noch ausführlicher erklärt wird.

2.2. Tumor-assoziierte Makrophagen

Makrophagen, welche als ein Hauptbestandteil des angeborenen Immunsystems verschiedene maligne Tumoren infiltrieren, werden als tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) bezeichnet und stellen die am häufigsten vorkommende Leukozytenpopulation in menschlichen Ovarialtumoren und im Aszites dar (Takaishi et al., 2010). Die Zusammensetzung der Population hängt hierbei von einem dynamischen Gleichgewicht zwischen gewebsansässigen und rekrutierten Makrophagen ab. Gewebsresidente Makrophagen stammen aus dem embryonalen Dottersack und der fetalen Leber (Hoeffel et al., 2015; Perdiguero et al., 2015), wohingegen rekrutierte Makrophagen in einem stetigen Austausch von zirkulierenden Vorläuferzellen (Ly6C⁺CCR2⁺ Monozyten) aus dem Knochenmark und der Milz gebildet werden (Cortez-Retamozo et al., 2012; Shand et al., 2014). Die Rekrutierung von TAMs erfolgt durch lösliche Faktoren wie CSF-1 (*colony-stimulating factor 1*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und TGF- β (*transforming growth factor beta*), sowie durch die Chemokine CCL2, CCL5, CXCL12 und CX3CL1 (Balkwill, 2004). Folgenden Makrophagen-Rezeptoren wird zudem eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion zugesprochen: CSF1-R (*Colony stimulating factor 1 receptor*), SR-A (*Scavenger Receptor A*) und CX3CR1 (*CX3C chemokine receptor 1*) (Burnett et al., 2004; Evrard et al., 2015).

Im Gegensatz zu klassisch aktivierten (M1) Makrophagen, welche in Antwort auf IFN γ Stimulation die Immunantwort verstärken und die Tumorprogression eindämmen (Pollard, 2009), werden TAMs im Falle einer entzündungshemmenden Funktion zur alternativ aktivierten Makrophagenpopulation (M2) gezählt (Gordon, 2003; Mantovani

et al., 2003, 2004). Der flexible Polarisierungsstatus ist dabei unter anderem auf die diverse Signalübertragung im Tumormilieu zurückzuführen (Hagemann et al., 2006; Ruffell et al., 2012). M1- und M2-Phänotypen sollten daher als zwei mögliche Extreme der dynamischen Makrophagen-Plastizität angesehen werden (Ugel et al., 2015). Makrophagen im Aszites fortgeschrittener Ovarialkarzinom-Patientinnen werden beispielsweise durch lösliche Faktoren wie IL-6 (Interleukin 6) und M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*) zum M2-Phänotyp polarisiert (Duluc et al., 2007; Hagemann et al., 2006). Auch die Tumorzellen selbst sollen dazu in der Lage sein, die Makrophagen in einen M2-Phänotyp umzuwandeln (Hagemann et al., 2006). Die Anzahl der M2-polarisierten TAMs und die lokale Produktion von M-CSF korrelieren dabei positiv mit dem histologischen Grad der Malignität beim epithelialen Ovarialkarzinom (Kawamura et al., 2009). Des Weiteren wurde beim Ovarialkarzinom gezeigt, dass TAMs durch die Induktion von Angiogenese und Tumorzellinvasion, sowie durch die Unterdrückung der adaptiven Immunität zur Tumorprogression beitragen können (Noy & Pollard, 2014; Pollard, 2004; Qian & Pollard, 2010; Sica & Mantovani, 2012). Peritonealkarzinosen sind daher häufig mit makrophagenreichem Aszites assoziiert (Haskill et al., 1982) und das Vorhandensein von TAMs im Tumorgewebe korreliert mit einer schlechteren Patientenprognose (Cook & Hagemann, 2013; De Palma & Lewis, 2013). Bestärkt wird dies durch die Annahme, dass das makrophagenspezifische F4/80-Protein an der Rekrutierung von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (*T-regs*) beteiligt ist (Lin et al., 2005) und dass lösliche Makrophagen-Produkte Wachstums- und Angiogenesefaktoren beinhalten (Schoppmann et al., 2006; Wang et al., 2006).

2.3. Mutationslast und Lymphozyteninfiltration

Obwohl das Ovarialkarzinom wie oben aufgeführt von einem immunsuppressiven Mikromilieu geprägt ist, wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass eine intratumorale T-Zell-Präsenz sowohl mit einem verbesserten Chemotherapie-Ansprechen als auch mit einer besseren Gesamtprognose assoziiert ist (Goode et al., 2017; Mariya et al., 2014; Zhang L. et al., 2003). Speziell die intraepitheliale Präsenz von CD8 positiven T-Zell-Infiltraten wurde mit einem verzögerten Aufkommen von Rezidiven und insgesamt verbesserten Überlebensdaten korreliert (Sato et al., 2005). Konecny und Kollegen teilten das *high-grade* seröse Ovarialkarzinom 2014 durch Genexpressions-Analysen in einen proliferativen, differenzierten, mesenchymalen und immunreaktiven Subtyp ein, wobei der immunreaktive Subtyp mit einer verbesserten T-

Zell-Infiltration und mit dem besten Gesamtüberleben einherging (Konecny et al., 2014; Wang C. et al., 2017).

Im *Cancer Immunity Cycle* von Chen und Mellman wird als erster Schritt einer erfolgreichen tumoralen T-Zell-Antwort die Freisetzung von Tumorzellantigenen benannt, welche anschließend zur T-Zell-Aktivierung von dendritischen und antigen-präsentierenden Zellen an Histokompatibilitäts-Komplex-Moleküle (MHC I und MHC II) gebunden werden (Chen & Mellman, 2013). Erhöht sich während der Tumorprogression beispielsweise durch fehlerhafte DNA-Reparatur-Prozesse wie bei einer *BRCA1/2*-Mutation die allgemeine Mutationslast, so ist es wahrscheinlich, dass sogenannte „Neo-Antigene“ entstehen (Budczies et al., 2015), welche die Immunogenität des Tumors wesentlich erhöhen und es daher für das Immunsystem einfacher wird, entartete Tumorzellen von gesundem Gewebe zu unterscheiden und zu eliminieren. Auf das Ovarialkarzinom bezogen könnte dies erklären, warum Patientinnen mit *BRCA*-Mutation zum einen durch die erhöhte Platin-Sensitivität, zum anderen aber auch durch immunreaktive Gensignaturen und eine erhöhte Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten (TILs) ein verbessertes Fünf-Jahres Gesamtüberleben aufweisen (Bolton et al., 2012; George et al., 2013; Strickland et al., 2016). Verglichen mit anderen Entitäten reiht sich das Ovarialkarzinom hinsichtlich der Mutationslast allerdings im unteren Mittelfeld ein (Alexandrov et al., 2013). Die Exposition gegenüber PARP-Inhibitoren kann die Neo-Antigen-Menge erhöhen und somit beispielsweise die Wirkung immuntherapeutischer Substanzen verbessern (Fotopoulou & Herzog, 2018). Nach der Antigenpräsentation erfolgt im Lymphknoten das sogenannte *Priming* und die Aktivierung der zytotoxischen T-Lymphozyten, welche anschließend über die Blutbahn tumorales Gewebe infiltrieren. Dort erfolgt im letzten Schritt des *Cancer Immunity Cycle* die Erkennung und die Bindung von Tumorzellen durch die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem Tumorzellantigen, sowie die anschließende Zelltodinduktion (Chen & Mellman, 2013). Ein Risiko besteht allerdings darin, dass selektiert Tumorzellen mit einer geringeren Immunogenität der initialen Immunantwort entgehen und sich später als Rezidiv umso proliferativer durchsetzen können (Shankaran et al., 2001). Da gynäkologische Malignome eher zu den moderat immunogenen Tumoren gezählt werden (Schumacher & Schreiber, 2015) ist es das Ziel aktueller Forschungsarbeiten, den immunsuppressiven „kalten“ Tumor in einen Effektor-T-Zell infiltrierte „heißen“ Tumor zu verwandeln (Galon & Bruni, 2019; Nagarsheth et al., 2017) und somit verschiedenste Therapieansätze der Immun-

Modulation zu verbessern oder gar erst möglich zu machen.

2.4. Immuncheckpoint Inhibition

Immuntherapien zielen im Allgemeinen darauf ab, die eigene Immunfunktion zu stärken und entartete Zellen zu eliminieren. Ganz entscheidend für den Erfolg oder Misserfolg des Immunsystems ist hierbei die richtige Gewichtung von stimulatorischen und inhibitorischen Signalen innerhalb der T-Zell-vermittelten Immunantwort (Gaillard et al., 2016). Intrinsische inhibitorische Signale entstehen beispielsweise, wenn naive T-Zellen durch die Antigenpräsentation dendritischer Zellen aktiviert wurden und infolgedessen die Expression von sogenannten Checkpointproteinen erhöhen. Durch diese negative Regulation wird die Dauer der T-Zell-Aktivierung zeitlich begrenzt. Somit kann einer pathologischen Überaktivierung des Immunsystems vorgebeugt werden, genau wie einer damit verbundenen Schädigung des Gewebes oder der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen. Hinzu kommen extrinsische inhibitorische Signale wie beispielsweise von regulatorischen T-Zellen oder verschiedenen Zytokinen (Doo et al., 2019; Gaillard et al., 2016).

Die Einführung von Immuncheckpoint-Inhibitoren hat die Behandlung verschiedener Krebsarten wie beispielsweise die des malignen Melanoms oder des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms revolutioniert (Kwok et al., 2016). Aufgrund der einfachen Verabreichung, des günstigen Nebenwirkungsprofils und der effektiven Wirksamkeit bei bestimmten Tumorarten (Brahmer et al., 2012) wird mit Nachdruck daran gearbeitet, diese Ergebnisse in klinischen Eierstockkrebsstudien zu replizieren. Der Fokus präklinischer Studien aus dem letzten Jahrzehnt lag dabei vor allem auf den Immuncheckpoint-Rezeptoren PD-1 (*programmed cell death protein 1*) und CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*).

Bindet der PD-1-Rezeptor einer zytotoxischen T-Zelle an einen seiner programmierten Zelltod-Liganden (PD-L1 oder PD-L2), so wird die Effektor-T-Zell-Antwort unterdrückt, die Zytokinproduktion, Proliferation und Migration gehemmt, sowie die eigene Apoptoserate erhöht (Sharpe & Pauken, 2018). PD-1 ist auch auf regulatorischen T-Zellen hoch exprimiert, wobei die Aktivierung des Rezeptors deren suppressive Aktivität weiter verstärkt (Doo et al., 2019). Diese allgemeine Minimierung der Immunantwort kann jedoch als kritischer immunsuppressiver Mechanismus von Tumorzellen ausgenutzt werden und dabei wesentlich zur Immun-Evasion beitragen (Gottlieb et al., 2017; Hashimoto et al., 2018). Von den beiden Liganden scheint PD-L1

der relevantere im Tumormikromilieu zu sein und wird daher zur Abschwächung von CD8-positiven T-Zellen auf einer Vielzahl von Tumorzellen exprimiert. Die PD-L1 Expression könnte hierbei auf eine Reihe von Genamplifikationen oder onkogenen Signalkaskaden zurückzuführen sein (Atefi et al., 2014; Green et al., 2010). Des Weiteren haben präklinische Modelle gezeigt, dass von TILs produziertes IFN γ und die Anwendung von Chemotherapeutika die PD-L1-Expression auf Tumorzellen induzieren können (Abiko et al., 2015; Peng J. et al., 2015). Auch M2-polarisierte Makrophagen exprimieren PD-L1, was deren immunsuppressiven Phänotyp weiter unterstützt (Fang et al., 2021).

Um die intratumorale Immunantwort wieder in Richtung eines protektiven Phänotyps zu verschieben, wirkt die Anwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren, indem sie die negativ regulierten Rezeptor/Ligand-Interaktionen verhindern und die Funktion effektiver zytotoxischer T-Zellen wiederherstellen (Chen & Mellman, 2017; Sakuishi et al., 2010). Obwohl CD8-positive T-Zellen als das primäre Ziel von anti-PD-1 Antikörpern gelten, kann die Therapie auch PD-L1 exprimierende Makrophagen beeinflussen und deren phagozytische M1-Aktivität rekonstruieren (Gordon et al., 2017). Während anti-PD-1/L1-Effekte auf das Tumormikromilieu beschränkt zu sein scheinen, bewirken anti-CTLA-4-Antikörper eine Aktivierung von T-Zellen in peripheren lymphoiden Geweben. Der Immuncheckpoint-Rezeptor CTLA-4 ist ausschließlich auf T-Zellen zu finden, wo er direkt mit dem kostimulatorischen Rezeptor CD28 um die Bindung des Oberflächenproteins B7-1 oder B7-2 (synonym zum Lymphozyten-Aktivierungsantigen CD80) auf dendritischen Zellen konkurriert. Die Bindung von CD28 wirkt hierbei T-Zell-aktivierend und die Bindung von CTLA-4 T-Zell-inhibierend, wobei auch die Helfer-T-Zell-Aktivität reduziert und die Treg-vermittelte Immunsuppression hochreguliert wird (Doo et al., 2019) (siehe Abbildung 5).

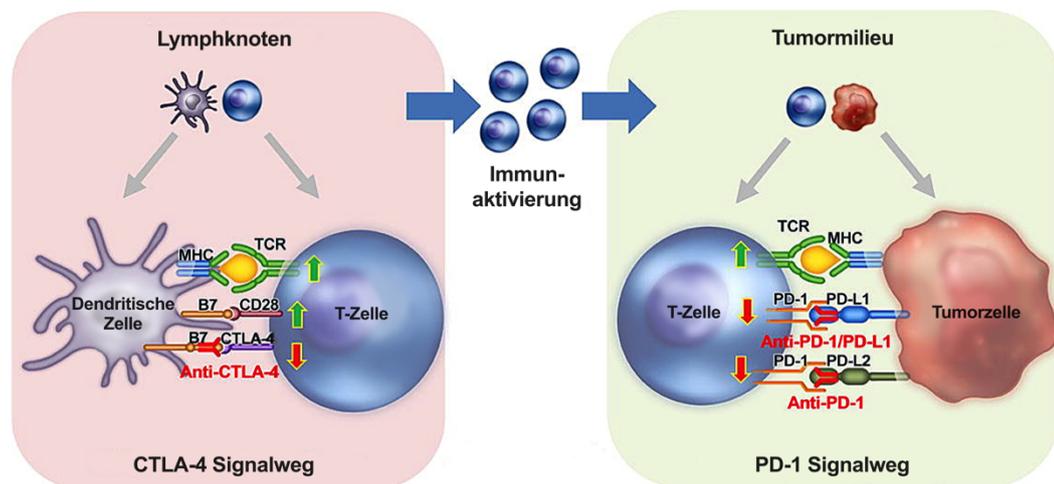


Abbildung 5: Checkpoint Inhibition der T-Zell-vermittelten Immunantwort

T-Zellen werden aktiviert indem der T-Zell-Rezeptor (TCR) an ein Antigen im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) bindet oder das T-Zelloberflächenprotein CD28 an das Lymphozytenaktivierungsantigen B7 auf dendritischen Zellen andockt. Inhibitorisch wirkt hingegen die Bindung des zytotoxischen T-Lymphozyten-assoziierten Proteins CTLA-4 an B7 oder des programmierten Zelltod Rezeptors PD-1 an die Liganden PD-L1 oder PD-L2, welche neben verschiedenen Immunzellen auch von Tumorzellen exprimiert werden können. Adaptiert nach (Hassel et al., 2017).

Die PD-1/PD-L1-Blockade ist die am häufigsten untersuchte Immuncheckpoint-Therapie beim Ovarialkarzinom, wobei deren Einsatz in zahlreichen Mausmodellen sowohl einzeln als auch in Kombination mit weiteren Checkpoint- oder PARP-Inhibitoren sowie Chemotherapeutika untersucht wurde. Interessant für den Ansatz der Blockade ist auch die Tatsache, dass der immunreaktive Subtyp des serösen Ovarialkarzinoms eine besonders starke PD-L1 Expression aufweist (Chin et al., 2020). Trotz des Erfolgs bei anderen Tumorentitäten und neuen klinischen Daten beim Ovarialkarzinom liegt die Wirksamkeit der Checkpoint-Inhibitoren bei objektiven Ansprechraten von lediglich 10-15 %, was bisher zu keiner Zulassung geführt hat (Gaillard et al., 2016). Im Kontrast zu den zahlreichen effektiven präklinischen Modellen geht man davon aus, dass die Misserfolge der klinischen Studien möglicherweise durch ein falsches *Timing* in der Medikamentenverabreichung entstanden sein könnten, da die Therapiengabe mit der zeitlich maximalen Infiltrationsrate von Lymphozyten im Tumormikromilieu zusammenfallen sollte (Doo et al., 2019). Wichtig ist natürlich auch das aktuell vorherrschende intratumorale Verhältnis von Effektor-Immunzellen (zytotoxische T-Zellen, dendritische Zellen, M1-Makrophagen) zu immunsuppressiven Immunzellen (regulatorische T-Zellen, myeloide Suppressorzellen, M2-Makrophagen). Um künftig also die Ansprechraten anzuheben, müssen durch intensivere Forschungsarbeiten verlässliche Biomarker gefunden werden,

welche Tumorprofile identifizieren, die grundlegend besser auf Immuncheckpoint-Inhibitoren ansprechen. Von großem Nutzen wären zudem auch Marker für die frühzeitige Erkennung von immunvermittelten Nebenwirkungen, welche unter anderem dermatologischer, gastrointestinaler oder rheumatologischer Natur sein können und nur bei sofortiger Behandlung in der Regel reversibel sind (Gaillard et al., 2016).

3. Chemokine und ihre intratumorale Funktion

3.1. Struktur, Funktion und Wirkung

Für die erfolgreiche Absolvierung des vierten Schritts aus dem bereits erwähnten *Cancer Immunity Cycles* (Chen & Mellman, 2013), nämlich der Lymphozyteninfiltration in das Tumorgewebe, ist die Interaktion des Chemokinsystems ein entscheidender Schlüsselfaktor (Abastado, 2012; Zhang L. et al., 2003). Zahlreiche korrelative Studien haben die Bedeutung von Chemokinliganden (chemotaktischen Zytokinen) für die Infiltration Chemokinrezeptor-positiver Lymphozyten und für das Überleben der Patienten bereits hervorgehoben (Bindea et al., 2013; Hwang et al., 2012; Messina et al., 2012; Sato et al., 2005). Auch wenn der exakte Mechanismus der Diapedese von Leukozyten aus dem Blutgefäßsystem noch lange nicht vollständig geklärt ist, so stellt die Wanderung in Richtung des aufsteigenden Konzentrationsgradienten der Chemokine ein wichtiges Element dar (Gevrey et al., 2005). Aktiviert wird die Chemokinproduktion beispielsweise durch IFN γ -Exposition, die darauf folgende intrazelluläre Phosphorylierung der Janus Kinase (JAK) und die Translokation von STAT (*signal transducers and activators of transcription*) Proteinen in den Zellkern (Dutta & Li, 2013; Groom & Luster, 2011a). Daraufhin können Chemokine auf eine dynamische Weise an Glykosaminoglykane (GAGs) auf der Oberfläche von Endothelzellen binden und einen lokalen Chemokin-Gradienten ausbilden (Thompson et al., 2017). Leukozyten wie Monozyten, Neutrophile und Lymphozyten treten dort durch ihre Chemokinrezeptoren mit den Chemokinliganden in Interaktion (Wojdasiewicz et al., 2014).

Strukturell gesehen teilen alle 48 Mitglieder der Chemokine eine gemeinsame monomere Struktur, die aus einem flexiblen N-Terminus, gefolgt von einer N-Schleife, drei antiparallelen β -Strängen und einer C-terminalen α -Helix besteht (Fernandez & Lolis, 2002). Durch die Organisation der ersten Cysteinreste, welche an strukturstabilisierenden intra-molekularen Disulfidbindungen beteiligt sind, werden Chemokine in vier verschiedene Gruppen eingeteilt: CXC, CC, XC und CX3C, wobei X

für eine beliebige Aminosäure steht (Zlotnik & Yoshie, 2000). Die zugehörigen Rezeptoren wurden passend zu jener Nomenklatur benannt: CR, CCR, CXCR oder CX3CR. Die Gruppe der bislang 16 beschriebenen Chemokinrezeptoren gehört zur γ -Rhodopsin-Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und können sowohl durch sezernierte als auch durch membrangebundene Chemokinliganden aktiviert werden (Latek et al., 2012; Murphy et al., 2000). Hierfür interagiert der extrazelluläre N-Terminus des Rezeptors zunächst mit der N-Schleife des Chemokins, worauf anschließend der Liganden-N-Terminus mit der Bindungstasche des Rezeptors in Verbindung kommt und eine Transmembran-Signalisierung auslöst (Rajagopalan & Rajarathnam, 2006), welche unter anderem Proliferation, Migration und Adhäsion ermöglicht (Neptune & Bourne, 1997; Raman et al., 2011) (siehe Abbildung 6).

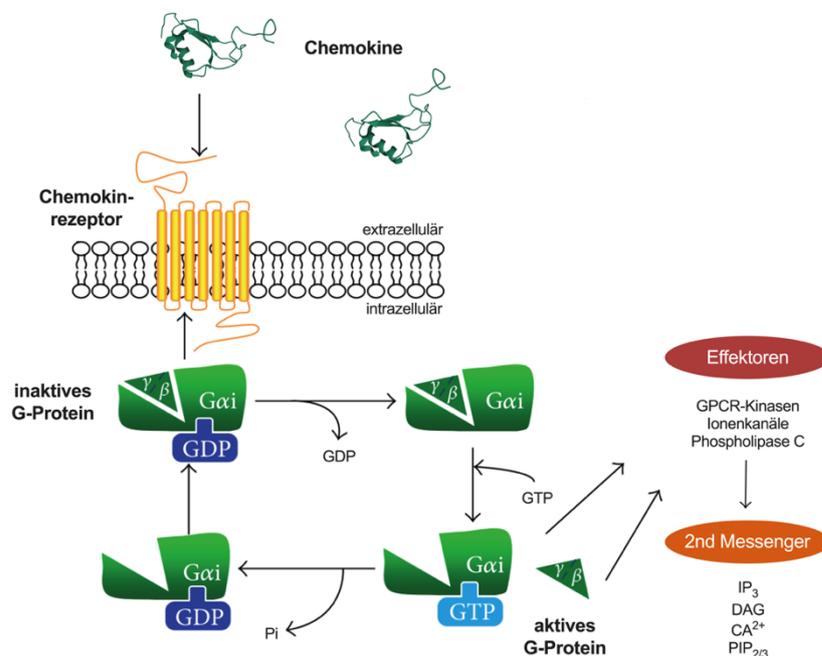


Abbildung 6: *Downstream*-Signalisierung eines G-Protein gekoppelten Chemokinrezeptors

Chemokine wie das dargestellte CX3CL1 (PDB code 1B2T) binden an G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren, welche intrazelluläre Effektoren und *second messenger* aktivieren um unter anderem eine Morphologieänderung und eine gerichtete Chemotaxis zu ermöglichen. Adaptiert nach (Patel et al., 2013).

Durch die Konformationsänderung der sieben Transmembrandomänen des Rezeptors wird intrazellulär die Bindung eines heterotrimeren G-Proteins ermöglicht, welches aus einer α -, β - und γ -Untereinheit besteht. Mit der Aktivierung findet an der Nukleotid-Bindestelle der $G\alpha$ -Untereinheit ein Guanosindiphosphat (GDP) - Guanosintriphosphat (GTP) Austausch statt (Ritter & Hall, 2009), wodurch sich die GTP-gebundene $G\alpha$ -Untereinheit vom $G\beta\gamma$ -Heterodimer abkoppelt und durch beide Untereinheiten

Downstream-Signaltransduktionen ausgelöst werden. Zunächst werden Signal-Effektoren wie GPCR-Kinasen, Ionenkanäle oder die Phospholipase C- β aktiviert, welche anschließend sogenannte *second messenger* wie Inositoltriphosphat (IP₃), Diacylglycerol (DAG) und Calciumionen (Ca²⁺) auf den Weg bringen (Patel et al., 2013). Zudem können durch beide Untereinheiten die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die Proteinkinase B (Akt) und die *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase aktiviert werden (Patel et al., 2013; Servant et al., 2000). Die PI3K nimmt für Chemokinrezeptoren eine besondere Rolle ein, da sie das PIP₃ (Phosphatidylinositol-Triphosphat)-Level erhöht und damit Signalproteine anlockt, welche zur Aktinpolymerisation sowie zur Morphologieänderung am Rand der Zelle führen und diese somit entlang eines Chemokingradienten wandern lassen (Jin & Hereld, 2006). Eine Inaktivierung des G-Proteins erfolgt schließlich durch die Hydrolyse des GTPs, wodurch sich die Untereinheiten wieder vereinen (Patel et al., 2013). Eine Internalisierung des Rezeptors nach Ligandenbindung reduziert die chemotaktische Aktivität von Leukozyten unter Entzündungsbedingungen, kann aber auch zur Resensibilisierung des Rezeptors beitragen, solange er nicht in Endosomen abgebaut, sondern wieder an die Zelloberfläche zurückgeführt wird. Zur allgemeinen Desensibilisierung kann der Rezeptor zudem vom heterotrimeren G-Protein abgekoppelt werden (Dagan-Berger et al., 2006).

Allgemein werden Chemokine konstitutiv und/oder induzierbar exprimiert (Vandercappellen et al., 2008). Einige können zudem post-translational durch eine proteolytische Spaltung aktiviert oder inaktiviert werden (Wolf et al., 2008). Die Komplexität des Systems ergibt sich daraus, dass einige Chemokine mehrere verschiedene Rezeptoren aktivieren und dass sowohl tumorsuppressive als auch tumorfördernde Leukozyten durch das intratumorale Chemokin angelockt werden. Bezogen auf das Tumormikromilieu können schließlich sowohl Chemokine als auch Chemokinrezeptoren von den Tumorzellen selbst exprimiert werden und den Nettoeffekt der Chemotaxis nachhaltig beeinflussen (Nagarsheth et al., 2017). Die Chemokine CCL2 und CCL5 rekrutieren beispielsweise myeloide Suppressorzellen und tumor-assoziierte Makrophagen, die wie bereits erwähnt mit einem verschlechterten Überleben assoziiert werden (Pollard, 2004). Der CXCL12-CXCR4-Signalweg fördert intratumoral die Invasivität und Metastasierung durch eine erhöhte Angiogeneserate (Darash-Yahana et al., 2004; Kryczek et al., 2005). An humanen Ovarialkarzinomzellen wurde gezeigt, dass die CXCL12-Expression durch Hypoxie hervorgerufen werden

kann (Kryczek et al., 2005). Als maßgeblich beteiligt an der Rekrutierung tumorsuppressiver T-Zellen gelten schließlich die Chemokine CXCL9 und CX3CL1, deren Rolle im Ovarialkarzinom den Kern dieser Doktorarbeit bildet und daher in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben wird. Das epigenetische *Silencing* von Chemokinen des sogenannten TH1-Typs wurde beim Ovarialkarzinom als Immunevasions-Mechanismus identifiziert, was wiederum zu einer schlechteren Tumorinfiltration durch T-Helfer-Zellen führen kann (Nagarsheth et al., 2016; Peng D. et al., 2015a).

3.2. Das CXCL9/CXCR3-Chemokinsystem

Das CXCL9/MIG (*monokine induced by interferon-gamma*)-Gen kodiert für ein Zytokin mit einer Größe von 125 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 14 kDa. Das sezernierte Protein beeinflusst das Wachstum, die Bewegung oder den Aktivierungszustand von Immunzellen und wirkt vor allem chemotaktisch auf aktivierte T-Zellen (Genecards, 2021; Uniprot, 2021c). Als Liganden können CXCL9, CXCL10 und CXCL11 an den CXCR3-Rezeptor binden. In Antwort auf IFN γ -Stimulation werden die Chemokinliganden beispielsweise von Antigen-präsentierenden Zellen, Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten, aber auch von B-Zellen, T-Zellen und Monozyten exprimiert (Bronger et al., 2019; Park et al., 2002). Intratumoral werden CXCL9 und CXCL10 neben den Tumorzellen selbst vorwiegend von myeloiden Zellen produziert, wobei an der CD8⁺ T-Zell-Antwort beteiligte dendritische Zellen fast ausschließlich CXCL9 sezernieren und an der CD4⁺ T-Zell-Antwort beteiligte dendritische Zellen eher CXCL10 produzieren (Bronger et al., 2016; Chow et al., 2019; Durai & Murphy, 2016).

Der CXCR3-Rezeptor ist neben Mastzellen, Endothelzellen und dendritischen Zellen hauptsächlich auf tumorsuppressiven T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen zu finden (Griffith et al., 2014; Groom & Luster, 2011b; Wendel et al., 2008; Zhang C. et al., 2018). Er ist somit maßgeblich an der TH1-Immunantwort beteiligt (Harris et al., 2012) und nimmt essentielle Rollen beim funktionellen und migratorischen Verhalten von T-Zellen, sowie auch bei deren räumlicher Verteilung ein (Groom & Luster, 2011a, 2011b). Neben den bereits genannten Zelltypen kann CXCR3 erwiesenermaßen auch von Tumorzellen exprimiert werden, wie beispielsweise bei Eierstockkrebs (Furuya et al., 2011; Windmüller et al., 2017) oder bei Brustkrebs (Bronger et al., 2017; Datta et al., 2006). Funktionell unterscheidet sich der Rezeptor durch verschiedene Spleißvarianten: Die CXCR3-A-Isoform kodiert für ein 368 Aminosäuren langes

Protein mit chemotaktischen, proliferativen und anti-apoptischen Effekten, während die 415 Aminosäuren lange CXCR3-B-Isoform nicht chemotaktisch aktiv ist und durch die vorwiegende Expression auf Endothelzellen eher für angiostatische Effekte sorgt (Billottet et al., 2013). Die erst kürzlich entdeckte dritte Isoform des Rezeptors CXCR3-alt bindet als Liganden ausschließlich CXCL11 (Ehlert et al., 2004). Im murinen System ist nur die CXCR3-A-Isoform vertreten. Bei der Rezeptor/Liganden Bindung führen CXCL9 und CXCL10 zum Calcium-Influx, zur STAT-Phosphorylierung, sowie zur Chemotaxis, Adhäsion und Migration, wohingegen die Bindung von CXCL11 eher für die Rezeptor-Internalisierung verantwortlich ist (Colvin et al., 2004). Neben der Chemotaxis verschiedenster Lymphozyten zu vorherrschenden Entzündungsorten kann das CXCR3 Chemokinsystem auch die Interaktionen von T-Zellen mit Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen sowie die Lokalisierung und Abtötung von viral infizierten Zellen erleichtern (Groom et al., 2012; Sung et al., 2012).

Auch innerhalb eines Tumormilieus erleichtert der CXCL9/CXCR3-Signalweg hauptsächlich die Chemotaxis von CXCR3-aktivierten Immunzellen und somit die Anti-Tumor-Immunität (Muralidhar & Barbolina, 2013; Shahabuddin et al., 2006). Nichtsdestotrotz wird dem CXCR3-System im Tumormilieu eine duale Rolle zugeschrieben: Auf der einen Seite zeigt es eine positive Relevanz in der therapeutischen Effizienz von Chemotherapeutika (Sistigu et al., 2014) und der anti-PD-1 Immuncheckpoint-Blockade (Chow et al., 2019). Eine Studie bezüglich der prognostischen Gen-Expressions-Signatur für HGSOC reihte CXCL9 zudem unter den Top 5 Genen mit der höchsten prognostischen Aussagekraft ein (Millstein et al., 2020). Auch kann durch den bereits erwähnten therapeutischen Einsatz von PARP-Inhibitoren intratumoral die Expression von CXCL10 über den STING-Signalweg induziert werden, was eine kontinuierliche T-Zell Rekrutierung weiter unterstützt (Ding et al., 2018; Shen J. et al., 2018). Weiterhin können CXCL9 und CXCL10 eine T-Zell-Polarisation zu Effektor-T-Zellen induzieren (Karin & Wildbaum, 2015) sowie durch ihre angiostatischen Eigenschaften die Tumorangiogenese verhindern. Auf der anderen Seite können Tumorzellen das CXCR3-System ausnutzen, indem sie selbst den Rezeptor exprimieren und somit in andere Gewebe mit hohen Chemokingradienten metastasieren (Kawada & Taketo, 2011; Pradelli et al., 2009). Darüber hinaus binden CXCR3-positive Tumorzellen im Mikromilieu vorhandene Liganden und verringern somit deren chemotaktische Aktivität auf anti-tumorale Lymphozyten. Zudem können durch das CXCR3-System auch immunsuppressive Zelltypen wie beispielsweise

regulatorische T-Zellen das Tumorgewebe infiltrieren und somit zur Immunevasion der Tumorzellen beitragen (Redjimi et al., 2012).

Klinisch gesehen ist die CXCR3-Expression durch Tumorzellen mit dem Tumorgrad und der Lymphknoten-Metastasierung assoziiert (Muralidhar & Barbolina, 2013) und geht bei verschiedenen Entitäten mit einem schlechteren Überleben der Patienten einher (Ma et al., 2009; Windmüller et al., 2017). Hohe intratumorale Konzentrationen von CXCL9 und CXCL10 sind dagegen mit einer erhöhten Immunzellinfiltration und einem verbesserten Überleben von Patienten mit soliden Tumoren wie Eierstock-, Brust- und Darmkrebs vergesellschaftet (Bronger et al., 2016; Denkert et al., 2015; Wu et al., 2016). Der immunreaktive Subtyp des Ovarialkarzinoms zeichnet sich dabei laut Wang und Kollegen durch das Vorhandensein von CXCR3-Liganden aus, was einen Überlebensvorteil gegenüber den anderen Subtypen liefert (Wang C. et al., 2017). In einer Fallstudie mit einer HGSOE-Patientin stellten die Beobachter durch immungenomische Ansätze fest, dass im Vergleich zu Immunzell-exkludierten progredienten Metastasen in regredienten Läsionen das Chemokin CXCL9 am stärksten hochreguliert war (Jiménez-Sánchez et al., 2017). Die Überexpression von CXCR3-Liganden hat in verschiedenen Modellen eine verbesserte Lymphozyteninfiltration sowie eine verringerte Metastasierung erwirken können (Gorbachev et al., 2007; Au et al., 2017; Yang et al., 2006), jedoch wurde dies noch nicht im murinen Ansatz mit CXCL9 und Ovarialkarzinomzellen in Bezug auf das Gesamtüberleben getestet.

3.3. Das CX3CL1/CX3CR1-Chemokinsystem

CX3CL1 (Fraktalkin) ist das einzige CX3C-Chemokin und nimmt funktionell eine besondere Rolle ein, da es sowohl in löslicher als auch in membranständiger Form vorkommen kann (Bazan et al., 1997; Kim K.-W. et al., 2011). Das Protein besteht extrazellulär aus der N-terminalen Chemokin-Domäne an einem glykosylierten, „mucin-ähnlichen“ Strang (insgesamt 317 Aminosäuren), gefolgt von einer Transmembran-Domäne (21 Aminosäuren) und einem intrazellulären C-Terminus (35 Aminosäuren) (Bazan et al., 1997; Uniprot, 2021b). Exprimiert wird CX3CL1 vorwiegend von aktivierten Mikrogliazellen, Neuronen und Endothelzellen (Pan et al., 1997; Poniatowski et al., 2017). Durch die Hochregulation in Folge einer Entzündungsmodulator-Exposition mit IFN γ oder TNF α ist das Chemokin aber auch in inflammatorischem Gewebe zu finden (Wojdasiewicz et al., 2014). CX3CL1 wurde zudem in malignem Aszites und bei Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen (Gaudin et al., 2011; Kim M. et al., 2012). Die extrazelluläre Domäne des membrangebundenen

Peptids kann durch Proteasen wie ADAM (A disintegrin and metalloprotease)-17 und ADAM-10 sowie durch Cathepsin S in eine aktive, lösliche Form abgespalten werden (Clark & Malcangio, 2012; Garton et al., 2001; Hundhausen et al., 2003). In Diskussion sind bis heute weitere CX3CL1-Sheddasen wie beispielsweise die Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9, welche das Chemokin allerdings in eine inaktive Form spaltet (Wildenberg et al., 2008). Fraktalkin kann als sowohl als Ligand für Integrine als auch für den CX3CR1-Rezeptor fungieren (Fujita et al., 2014). Der heptahelikale Rezeptor besteht aus 355 Aminosäuren und bindet ausschließlich das CX3CL1-Chemokin (Combadiere et al., 1998; Uniprot, 2021a). Exprimiert wird CX3CR1 beispielsweise im Gehirn und in der Milz, sowie auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen (Harrison et al., 1998; Wojdasiewicz et al., 2014). Besonders hoch ist die Expression auf CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (Nishimura et al., 2002). Auch auf primären und metastasierten Ovarialkarzinomzellen wurde der Rezeptor bereits nachgewiesen (Kim M. et al., 2012).

Funktionell gesehen fungiert die membranständige Form des Chemokins in der Zelladhäsion, da die Bindung von CX3CL1 exprimierenden Zellen an CX3CR1-positive Zellen begünstigt wird (Ostuni et al., 2014). Synergistisch verstärkt wird dies durch die Interaktion mit Integrinen (Fujita et al., 2014). Im Gegensatz dazu vermittelt die lösliche Form Vorgänge wie Zellmigration und Zellproliferation (Bazan et al., 1997). CX3CR1-positive Zellen können also einem löslichen CX3CL1-Gradienten folgen. Durch die Kombination der zwei verschiedenen Funktionen nimmt das CX3CL1/CX3CR1-System seine wesentliche Rolle in der Extravasation von proinflammatorischen Leukozyten ein (Haskell et al., 2000; Mizoue et al., 1999): CX3CR1-positive Leukozyten gehen mit membranständigem CX3CL1 auf Endothelzellen eine feste Adhäsion ein und folgen in der anschließenden Leukodiapedese einer nach dem löslichem CX3CL1-Liganden gerichteten Chemotaxis (Haskell et al., 2000). Bezogen auf die Anti-Tumor-Immunität können somit beispielsweise tumor-suppressive NK-Zellen, T-Zellen und dendritische Zellen aus der Blutbahn ins Tumormilieu rekrutiert werden (Guo et al., 2003). In einigen präklinischen Krebsmodellen wie beim Leberzellkarzinom, beim metastasierten Kolonkarzinom und bei Lungenkrebs konnte durch die Beteiligung von CX3CL1 eine Eindämmung der Tumorproliferation beobachtet werden (Richard-Fiardo et al., 2011; Tang et al., 2007; Vitale et al., 2007). Andererseits gibt es aber auch einige Eigenschaften, die dem System eher tumorfördernde Aspekte zuschreiben: Zum einen spielt CX3CL1 auch eine

Rolle bei der Rekrutierung tumor-assoziiertes Makrophagen (Balkwill, 2004), zum anderen können CX3CR1-positive Tumorzellen den Rezeptor für eine erleichterte Migration und Metastasierung in CX3CL1-positives Gewebe nutzen. Dies führt besonders dann zur Metastasierung, wenn das CX3CL1 vor Ort in der adhäsiven membranständigen Form vorliegt (Main et al., 2017; Marchesi et al., 2008; Shulby et al., 2004). Bezogen auf das Ovarialkarzinom wurde beschrieben, dass peritoneale Mesothelzellen membranständiges CX3CL1 exprimieren und somit die Bildung von CX3CR1-positiven Sekundärläsionen fördern können (Kim M. et al., 2012). Nichtsdestotrotz ist bis heute nicht vollständig geklärt, welche der genannten Effekte im Ovarialkarzinom die größere regulatorische Rolle einnehmen und wie sich das letztendlich aufs Gesamtüberleben auswirken kann.

IV. ZIELSETZUNGEN

Um in Anlehnung an die Hypothese einer verbesserten Immuninfiltration (Abbildung 7) die Rolle von CXCL9 und CX3CL1 in der Immunantwort des Ovarialkarzinoms zu erforschen, wurden folgende molekulare Fragestellungen adressiert:

- Wird humanes CXCL9 in unterschiedlichen Subtypen des Ovarialkarzinoms divers exprimiert und könnte dies vielleicht konträre Ansprechraten auf molekulare Immuntherapien erklären?
- Führt eine intratumorale, murine Cxcl9-Überexpression zu einem verbesserten Überleben im Mausmodell und ist dieser Effekt abhängig vom adaptiven Immunsystem? Gibt es hierbei Unterschiede zwischen HR-(homologen Rekombinations) profizienten und HR-defizienten Tumormodellen?
- Hat intratumorales Cxcl9 einen Einfluss auf das Ansprechen einer Immuncheckpoint-Blockade?
- Verändert Cxcl9 die vorherrschende PD-L1 Expression von murinen und humanen Ovarialkarzinomzellen *in vitro*?
- Wird CX3CL1 im humanen Kollektiv des *high-grade* serösen Ovarialkarzinoms exprimiert und hat dies einen Einfluss auf das progressions-freie Überleben und auf das Gesamtüberleben der Patientinnen?
- Kann humanes CX3CL1 *in vitro* durch Stimulation mit den PARP-Inhibitoren Olaparib und Niraparib induziert werden?
- Welche Rolle spielt Cx3cl1 im metastasierten Mausmodell und im subkutanen Primärtumor-Modell? Welche zellulären Subtypen des Immunsystems sind in den verschiedenen Modellen primär vertreten?

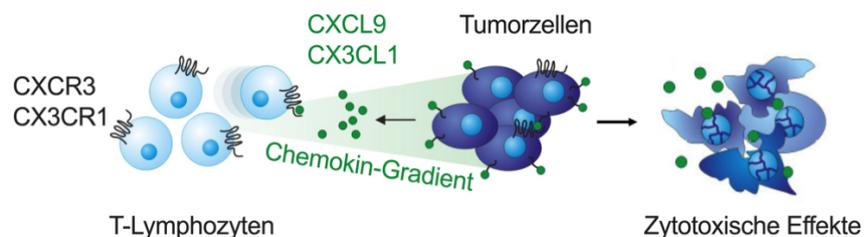


Abbildung 7: Hypothese der verbesserten Immunzellinfiltration durch Chemokingradienten zwischen intratumoralem CXCL9/CX3CL1 und den CXCR3/CX3CR1 Rezeptoren auf zytotoxischen T-Lymphozyten.

V. MATERIAL

1. Tumorgewebe und Patientencharakteristika

Für immunhistochemische Studien wurden FFPE Präparate (*formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue*) aus zwei verschiedenen humanen Kollektiven verwendet. Alle Patientinnen wurden zwischen 1990 und 2014 in der Frauenklinik im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München behandelt. Die Studien wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt und schriftliche Einwilligungen der Patientinnen wurden dokumentiert.

Das erste Kollektiv bestand aus 219 Patientinnen mit *high-grade* serösem Ovarialkarzinom (HGSOC) der Stufe FIGO III oder IV (klinische Parameter siehe Tabelle 1). Innerhalb des HGSOC Kollektivs wurden auch omentale (n=122) und peritoneale (n=126) Metastasen immunhistochemisch analysiert.

Tabelle 1: Demografische und klinisch-pathologische Parameter der Patientinnen mit *high-grade* serösem Ovarialkarzinom (n=219).

Klinische Parameter HGSOC Kollektiv	Anzahl	Spanne/Prozent
Medianes Alter bei Diagnose (Jahre)		64 (33-88)
≤ 60 Jahre	79	36,1%
> 60 Jahre	180	63,9%
Medianes Follow up PFS (Monate)		15 (1-86)
Medianes Follow up OS (Monate)		34 (1-269)
FIGO Stadium		
III	163	74,4%
IV	56	25,6%
Resttumor		
0 cm	89	40,6%
≤ 1 cm	63	28,8%
> 1 cm	63	28,8%
Keine verfügbaren Daten	4	1,8%
Aszitesvolumen		
0 ml	25	11,4%
≤ 500 ml	35	16,0%
> 500 ml	57	26,0%
Keine verfügbaren Daten	102	46,6%
Lymphknotenstatus		
Negativ (pN0)	57	26,0%
Positiv (pN1)	128	58,4%

Keine verfügbaren Daten	34	15,5%
-------------------------	----	-------

Abkürzungen: **OS**, Gesamtüberleben; **PFS**, progressionsfreies Überleben; **FIGO**, International Federation of Gynecology and Obstetrics.

Das zweite Kollektiv setzte sich aus Patientinnen mit folgenden Ovarialkarzinom-Subtypen zusammen: klarzellig (n=16), muzinös (n=16), *borderline* (n=18), endometrioid (n=30) und *low-grade* (n=15). Weitere klinische Informationen sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Demografische und klinisch-pathologische Parameter von Patientinnen mit unterschiedlichen histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms (n=95).

Klinische Parameter Subtypen-Kollektiv	Anzahl	Spanne/Prozent
<u>Klarzelliger Subtyp</u>	16	
Medianes Alter bei Diagnose (Jahre)		60,5 (48-88)
≤ 60 Jahre	8	50%
> 60 Jahre	8	50%
FIGO Stadium		
I	8	50%
II	1	6%
III	4	25%
IV	2	13%
Keine verfügbaren Daten	1	6%
Lymphknotenstatus		
Negativ (pN0)	8	50%
Positiv (pN1)	5	31%
Keine Lymphadenektomie durchgeführt	3	19%
<u>Muzinöser Subtyp</u>	16	
Medianes Alter bei Diagnose (Jahre)		54,5 (30-78)
≤ 60 Jahre	11	69%
> 60 Jahre	5	31%
FIGO-Stadium		
I	13	81%
II	1	6%
III	2	13%
IV	-	-
Keine verfügbaren Daten	-	-
Lymphknotenstatus		
Negativ (pN0)	7	44%
Positiv (pN1)	-	-
Keine Lymphadenektomie durchgeführt	9	56%
<u>Borderline-Subtyp</u>	18	
Medianes Alter bei Diagnose (Jahre)		54 (27-85)

≤ 60 Jahre	12	67%
> 60 Jahre	6	33%
FIGO-Stadium		
I	12	67%
II	1	5%
III	-	-
IV	-	-
Keine verfügbaren Daten	5	28%
Lymphknotenstatus		
Negativ (pN0)	2	11%
Positiv (pN1)	-	-
Keine Lymphadenektomie durchgeführt	16	89%
<u>Endometrioider Subtyp</u>	30	
Medianes Alter bei Diagnose (Jahre)		65 (39-82)
≤ 60 Jahre	13	43%
> 60 Jahre	17	57%
FIGO-Stadium		
I	12	40%
II	3	10%
III	13	43%
IV	2	7%
Keine verfügbaren Daten	-	-
Lymphknotenstatus		
Negativ (pN0)	14	47%
Positiv (pN1)	10	33%
Keine Lymphadenektomie durchgeführt	6	20%
<u>Low-grade-Subtyp</u>	15	
Medianes Alter bei Diagnose (Jahre)		52 (23-85)
≤ 60 Jahre	9	60%
> 60 Jahre	6	40%
FIGO-Stadium		
I	4	26%
II	1	7%
III	9	60%
IV	-	-
Keine verfügbaren Daten	1	7%
Lymphknotenstatus		
Negativ (pN0)	7	46%
Positiv (pN1)	4	27%
Keine Lymphadenektomie durchgeführt	4	27%

Abkürzungen: **FIGO**, International Federation of Gynecology and Obstetrics.

2. Zelllinien und Zellkulturzusätze

2.1. Zelllinien

Die Zelllinien ID8Trp53^{-/-} und ID8Trp53^{-/-}Brca2^{-/-} wurden von Josephine Walton (Glasgow, Schottland) zur Verfügung gestellt (Walton et al., 2016). OV-MZ-6 Zellen erhielten wir in Unterstützung von Volker Möbus aus Mainz (Möbus et al., 1992). OVCAR-3, CAOV-3 und SKOV-3 Zellen wurden bei ATCC (American Type Culture Collection) bestellt. HEK293T Zellen wurden vom Leibniz Institut DSMZ bezogen. Die Kultivierung der Zellen fand in T-75 Zellkulturflaschen von Greiner bio-one statt. Die angefügte Tabelle zeigt die verschiedenen Kulturbedingungen und Passagier-Verhältnisse.

Zelllinie	Ursprung	Kulturmedium	Passage
CAOV-3 (human)	Adenokarzinom aus Epithelzellen des Ovars	DMEM Medium 10 % (v/v) FCS 10 mM HEPES	1:3
HEK293-T (human)	Embryonales Nierenepithel	DMEM Medium 10 % (v/v) FCS 10 mM HEPES	1:10
ID8-Derivate (murin)	C57BL/6 Oberflächenepithelzellen des Ovars	DMEM Medium 10 % (v/v) FCS 10 mM HEPES 1 % (v/v) ITS	1:30
OV-MZ-6 (human)	Seröses Zystadenokarzinom aus dem Ovar (FIGO IV), kultiviert aus Aszites	DMEM Medium 10 % (v/v) FCS 10 mM HEPES	1:8
OVCAR-3 (human)	Adenokarzinom aus Epithelzellen des Ovars	RPMI Medium 20 % (v/v) FCS 10 mM HEPES 1 µg/ml Insulin	1:3
SKOV-3 (human)	Adenokarzinom kultiviert aus Aszites, klarzelliger Phänotyp	McCoy's Medium 10 % (v/v) FCS 10 mM HEPES	1:5

2.2. Zusätze für Zellkulturmedien

Medium / Zusatz	Firma, Bestellnummer
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x) + GlutaMAX TM -I [+] 4,5 g/l D-Glucose [-] Pyruvate	Thermo Fisher, #61965-026
FCS Fötale Kälberserum (hitzeinaktiviert bei 57 °C, 30 min)	Thermo Fisher, #10270106

HEPES Pufferlösung (1M)	Thermo Fisher, #15630-056
Insulinlösung aus Rinderpankreas 10 mg/ml Insulin in 25 mM HEPES	Sigma-Aldrich, #I0516
ITS (100X) Insulin-Transferrin-Selenium	Thermo Fisher, #41400-045
McCoy's 5A Modified Medium	Thermo Fisher, #16600082
Neomycin / Geneticin G-418 Sulfat	Thermo Fisher, #11811-031
OPTI-MEM Reduced-Serum Medium	Thermo Fisher, #31985-062
RPMI Medium 1640 (1x) [+] L-Glutamine	Thermo Fisher, #21875-034

2.3. Zellkultur-Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Ablösereagenz für ID8-Derivate, CAOv-3 und OVCAR-3	0,05 % EDTA in PBS
Ablösereagenz für OV-MZ-6 und SKOV-3 Lösung zum Picken von Zellklonen	0,25 % Trypsin in PBS
Einfriermedium	10 % DMSO in FCS
Selektionsmedium	1 g/l Neomycin (G418) in Vollmedium
Serum-freies Medium	Kulturmedium ohne FCS
Waschreagenz	DPBS (1X) [-] CaCl ₂ ; [-] MgCl ₂

3. Bakterienkulturen

Kompetente DH5 α -Bakterien für Transformationen wurden bei Thermo Fisher Scientific gekauft und bei -80 °C gelagert.

4. Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Klonalität	Firma, Bestellnummer	Anwendung, Verdünnung
Alexa-Fluor 488 Anti-mCX3CL1	Ratte	Monoklonal (126315)	R&D Systems, #FAB571G-025	FACS, 1:25
Alexa-Fluor 488 Isotype Control	Ratte	Monoklonal (54447)	R&D Systems, #IC006G	FACS, 1:25
Anti-CD206	Hase	Polyklonal	Proteintech #18704-1-AP	IHC, 1:750

Anti-CD3	Hase	Monoklonal (SP7)	DCS Diagnostics, #CI597C01	IHC, 1:100
Anti-CD49b/DX5	Ratte	Monoklonal	BioLegend, #108902	IHC, 1:50
Anti-CD8	Ratte	Monoklonal (GHH8)	Dianova, #DIA-808	IHC, 1:100
Anti-CX3CL1	Maus	Monoklonal (81513)	R&D Systems, #MAB3651	IHC, 1:100
Anti-CX3CR1	Hase	Polyklonal	Abcam, #ab8021	IHC, 1:750
Anti-CXCL9	Hase	Polyklonal	Thermo Fisher, #PA5-34743	IHC, 1:100
Anti-F4/80	Hase	Monoklonal (D2S9R)	Cell Signaling, #70076	IHC, 1:300
Anti-Foxp3	Hase	Polyklonal	Abcam, #ab4728	IHC, 1:2.000
Anti-GAPDH	Maus	Monoklonal	Sigma-Aldrich, #MAB374	Western Blot, 1:10.000
Anti-Granzyme-B	Hase	Polyklonal	Abcam, #ab4059	IHC, 1:1.000
Anti-Ki67	Hase	Polyklonal	Novus Biologicals, #NB500-170	IHC, 1:1.000
Anti-Ly6G	Ratte	Monoklonal (RB6-8C5)	Abcam, #ab25377	IHC, 1:200
Anti-PD-1	Maus	Monoklonal (NAT105)	Cell Marque, #315	IHC, 1:50
Anti-PD-L1/CD274	Hase	Polyklonal	Proteintech, #17952-1-AP	Western Blot, 1:600

Sekundärantikörper	Firma, Bestellnummer	Anwendungsbereich, Verdünnung
Goat anti-mouse IgG-HRP	Thermo Fisher, #G21040	Western Blot, 1:10.000
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Thermo Fisher, #G21234	Western Blot, 1:10.000
HRP Polymer anti-mouse/rabbit	Zytomed, #ZUC053	Immunhistochemie, unverdünnt

5. Plasmide

Zur stabilen Überexpression von Cxcl9 bzw. Cx3cl1 in murinen Ovarialkarzinomzellen mittels lentiviraler Transduktion wurden folgende Plasmide verwendet:

Bezeichnung	Plasmid	Firma, Bestellnr.
Cxcl9 (NM_008599) Mouse Untagged Clone	pCMV6-Kan/Neo	Origene, #MC200015
Cx3cl1 (NM_009142) Mouse Untagged Clone	pCMV6-Kan/Neo	Origene, #MC200619
Lentiviral Expression Vector	pSMPUW-Neo	ViraSafe™ Lentiviral Expression System (Neo), Ecotropic, Cell Biolabs, #VPK-213-ECO
Packaging Vector	pRSV-Rev	
Envelope Vector	pCMV-Eco	
Packaging Vector	pCgpV	

6. Primer

Alle aufgelisteten Primer wurden über die Firma Metabion in Planegg/Steinkirchen bestellt (fw = forward, rv = reverse).

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Anwendung
mCxcl9 K1-fw	ATGAAGTCCGCTGTTCTTTTCC	Dreistufige Klonierung von Restriktions- Schnittstellen mit Überhang an mCxcl9
mCxcl9 K1-rv	TTATGTAGTCTTCCTTGAACG	
mCxcl9 K2-fw	GGCCGGCCATGAAGTCCGC	
mCxcl9 K2-rv	TTAATTAATTATGTAGTC	
mCxcl9 K3-fw	TTGTTTTGGCCGGCCATGAAGTCC	
mCxcl9 K3-rv	AAAACAATTAATTAATTATGTAG	
mCx3cl1 K1-fw	ATGGCTCCCTCGCCGCTCGC	Dreistufige Klonierung von Restriktions- Schnittstellen mit Überhang an mCx3cl1
mCx3cl1 K1-rv	TCACACTGGCACCAGGACGT	
mCx3cl1 K2-fw	GGCCGGCCATGGCTCCCTCGCCGCT	
mCx3cl1 K2-rv	TTAATTAATCACACTGGCACCAGGA	
mCx3cl1 K3-fw	TTGTTTTGGCCGGCCATGGCTCCC	
mCx3cl1 K3-rv	AAAACAATTAATTAATCACACTGG	
mCxcl9-fw	GCATCGATTCCCTTATCA	qPCR Analyse
mCxcl9-rv	CTTTTCCTCTTGGGCATCAT	
mHpvt-fw	CCTCCTCAGACCGCTTTTT	
mHpvt-rv	AACCTGGTTCATCATCGCTAA	

mTrp53-fw	CTCCCTCACATTCTTTCTTG	PCR zur Knockout-Detektion
mTrp53-rv	GCTGTAAAGTAGACCCTGGGC	
mBrca2-fw	CATGGAGGGAGTCACCTTTG	
mBrca2-rv	GCTCTGGCTGTCTCGAACTT	

7. qPCR-Sonden

Sonde	Amplikon	Bestellnummer
Roche Universal Probe #1	mCxcl9	#318501
Roche Universal Probe #95	mHprt	#263935
Thermo Fisher Probe and Primer Mix	mCx3cl1	#Mm00436454_m1Cx3cl1
Thermo Fisher Probe and Primer Mix	mHprt	#Mm03024075_m1Hprt
Thermo Fisher Probe and Primer Mix	mPD-L1	#Mm00452054_m1Cd274

8. Chemikalien und Reagenzien

8.1. Chemikalien

Chemikalie	Firma	Anwendungsbereich
7-AAD Viability Staining Solution #00-6993-50	eBioscience, San Diego, CA, USA	FACS Färbung
96%-iger bzw. 50%-iger Alkohol	Institut für Pathologie, TU München, DE	Immunhistochemie
Acrylamid Rotiphorese 40	Carl Roth, Karlsruhe, DE	Western Blot
Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., DE	<i>In vitro</i> Stimulations-experimente
Antibody Diluent #ZUC025	Zytomed Systems GmbH, Berlin, DE	Immunhistochemie
APS (Ammonium Persulfat)	Sigma, St. Louis, MN, USA	Western Blot
Brilliant III Ultra Fast QPCR Master Mix with Low ROX #600890-51	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	qPCR-Analyse
BSA Pulver #1470	Sigma, St. Louis, MN, USA	Bradford Assay
Citronensäure Monohydrat #C 1909	Sigma, St. Louis, MN, USA	Immunhistochemie
Coomassie Brilliant Blue G-250 #27815	Sigma, St. Louis, MN, USA	Bradford Assay

Cut Smart Buffer #B7204S	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE	Puffer für Restriktionsenzym- Verdau
D-Luciferin Substrat	PJK Biotech, Kleinblittersdorf, DE	<i>In vivo</i> Imaging
DPBS (1X) #14190-094	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Zellkultur
EDTA (Versen) 1% #L2113	Biochrom GmbH, Berlin, DE	Zellkultur
Eosin G Lösung 1% wässrig #3137.2	Carl Roth, Karlsruhe, DE	Immunhistochemie
Fc-Block Mouse #553142	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	FACS Färbung
FCS (Fötale Kälberserum) #10270106	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Zellkultur, Zusatz im Kulturmedium
FseI #R0588S	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE	Restriktionsenzym
Geneticin G-418 Sulfat #11811-031	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Zellkultur
Hämalaunlösung #T865-2	Carl Roth, Karlsruhe, DE	Immunhistochemie
Isofluran CP #1214	CP-Pharma, Burgdorf, DE	Tierversuche
Isopropanol	Institut für Pathologie, TU München, DE	Immunhistochemie
Lämmli 4-fach Roti-Load #K929.1	Carl Roth, Karlsruhe, DE	Western Blot
Lipofectin Reagent #18292-011	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Lentivirale Transduktion
Milchpulver	Sigma, St. Louis, MN, USA	Western Blot
MTT Reagenz #M2128-1G	Sigma, St. Louis, MN, USA	Zellviabilitätsassay
Natriumchlorid #1.06404	Merck, Darmstadt, DE	Immunhistochemie
PacI #R0547S	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE	Restriktionsenzym
Pertex #41-4012-00	Medite GmbH, Burgdorf, DE	Immunhistochemie
Polybrene #sc-134220	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	Lentivirale Transduktion
Ponceau S	AppliChemo, Darmstadt, DE	Western Blot
Proteinase K #P8102S	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland	Proteinase K Verdau
PVDF Membran #T830.1	Carl Roth, Karlsruhe, DE	Western Blot

Reagent Diluent Concentrate 2 #DY995	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	ELISA
Ribolock RNase Inhibitor 2500 U (40 U/ μ l) #EO0381	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	cDNA-Synthese
Salzsäure 2N	Carl Roth, Karlsruhe, DE	Bradford Assay
TRIZMA-Base #T-1503	Sigma, St. Louis, MN, USA	Immunhistochemie
Trypanblau Lösung #T8154	Sigma, St. Louis, MN, USA	Zellkultur
Trypsin 2,5% (10X) #15090-046	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Zellkultur
Tween [®] 20 #P 1379	Sigma, St. Louis, MN, USA	Immunhistochemie
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 % #9681.4	Carl Roth, Karlsruhe, DE	Immunhistochemie
Xylol	Institut für Pathologie, TU München, DE	Immunhistochemie

8.2. Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammenstellung	Anwendungsbereich
12%-iges Trenngel (für 2 Stück)	8,6 ml H ₂ O; 5 ml Tris (1,5 M pH 8,8); 200 μ l 10% SDS; 6 ml 40% Acrylamid; 100 μ l 10% APS; 10 μ l TEMED	Western Blot
4,5%-iges Sammelgel (für 2 Stück)	6,3 ml H ₂ O; 2,5 ml Tris-HCl (0,5 M pH 6,8); 100 μ l 10% SDS; 1 ml 40% Acrylamid; 50 μ l 10% APS; 10 μ l TEMED	Western Blot
Citratpuffer	2,1 g Citronensäure Monohydrat ad 1.000 ml dest. H ₂ O pH 6,0 einstellen	Immunhistochemie
Elektrophorese Puffer (10x)	144 g Glycin; 30 g Tris; 10 g SDS ad 1.000 ml dest. H ₂ O	Western Blot
FACS-Puffer	PBS; 0,5% FCS; 2 mmol EDTA	FACS Analyse
RIPA-Puffer	2,5 ml HEPES; 1,5 ml NaCl; 100 μ l EDTA (0,5 M); 5 ml Glycerin; 500 μ l Triton; 0,223 g Na ₄ P ₂ O ₇ ad 50 ml dest. H ₂ O	Proteinisolation
Lysepuffer mit Protease Inhibitor	10 ml Lysepuffer; 0,01g Complete Protease Inhibitor	Proteinisolation
PBS (10x)	80 g NaCl; 2 g KCl; 2,4 g KH ₂ PO ₄ ; 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ad 1.000 ml dest. H ₂ O pH 7,4 einstellen	ELISA

PBS-T (1x)	100 ml PBS (10x) 500 µl Tween20 ad 1.000 ml dest. H ₂ O	ELISA
Ponceau S Lösung	5 % Essigsäure; 0,1 % Ponceau S	Western Blot
TBS (10x)	60,5 g Trizma-Base ad 700 ml dest. H ₂ O pH 7,6 einstellen 90 g NaCl ad 1.000 ml dest. H ₂ O	Immunhistochemie, Western Blot
TBS-T (1x)	100 ml TBS (10x) 1 ml Tween20 ad 1.000 ml dest. H ₂ O	Immunhistochemie, Western Blot
Wet-Blot Puffer (1x)	3,03 g Tris; 14,4 g Glycin; 200 ml MeOH ad 1.000 ml dest. H ₂ O	Western Blot

8.3. Stimulationsreagenzien

Bezeichnung	Firma, Bestellnummer
BSA (Bovines Serum-Albumin)	Sigma-Aldrich, #A2153
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, #D2650
GI254023X (ADAM10 Inhibitor)	Bio-Techne, #3995
IFN γ (human)	PeptoTech, #300-02
IFN γ (murin)	PeptoTech, #315-05
Niraparib MK-4827 (PARP-Inhibitor)	Selleck Chemicals, #S2741
Olaparib AZD2281 (PARP-Inhibitor)	Selleck Chemicals, #S1060
TAPI-2 Acetat-Salz (ADAM17 Inhibitor)	Sigma-Aldrich, #SML0420
TNF α (human)	PeptoTech, #300-01A
TNF α (murin)	PeptoTech, #315-01A

8.4. Therapeutika für *in vivo* Applikationen

Bezeichnung	Firma, Bestellnummer
<i>InVivo</i> MAb anti-mouse PD-L1 (B7-H1) Clone: 10.F.9G2	Bio X Cell, #BE0101
<i>InVivo</i> MAb rat IgG2b isotype control (anti-keyhole limpet hemocyanin) Clone: LTF-2	Bio X Cell, #BE0090
<i>InVivo</i> Pure pH 7.0 Dilution Buffer	Bio X Cell, #IP0070

8.5. Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Firma, Bestellnummer
BOND Polymer Refine DAB Kit	Leica Biosystems, #DS9800
DAB Substrate Kit	Zytomed, #DAB5000Plus
DuoSet ELISA human CX3CL1/Fractalkine	R&D Systems, #DY365
DuoSet ELISA human CXCL10/IP-10	R&D Systems, #DY266
DuoSet ELISA human CXCL9/MIG	R&D Systems, #DY392
DuoSet ELISA mouse CX3CL1/Fractalkine	R&D Systems, #DY472
DuoSet ELISA mouse CXCL10/IP-10	R&D Systems, #DY466
DuoSet ELISA mouse CXCL9/MIG	R&D Systems, #DY492
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche, #11796828001
Immobilon® Western Chemiluminescent HRP Substrate Kit	Millipore, #WBKLS0500
Monarch DNA Gel Extraction Kit	New England Biolabs, #T1020
Monarch PCR & DNA Cleanup Kit	New England Biolabs, #T1030S
NucleoBond® Xtra Midi Plasmid Isolation Kit	Macherey Nagel, #740410
NucleoSpin® Plasmid Isolation Mini Kit	Macherey Nagel, #740499
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher, #23225
Pierce™ TMB Substrate Kit	Thermo Fisher, #34021
Qiagen RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen, #74134
SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System	Thermo Fisher, #18091050

8.6. Marker

Bezeichnung	Firma, Bestellnummer
GeneRuler DNA Ladder 1 kb	Thermo Fisher, #SM0311
PageRuler Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa	Thermo Fisher, #26616

9. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsartikel	Firma	Anwendungsbereich
Combitips	Eppendorf, Hamburg, DE	ELISA
Deckgläser 24x32 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE	Immunhistochemie
Einwegskalpell	Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka, JPN	Tumoraufschluss

Falcon Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, AUT	Zellkultur
Injektionskanülen Sterican 20G 0,9 x 70 mm #4665791	B.Braun, Melsungen, DE	Absaugen von Aszites
Insulinspritzen U100 30G 0,3 x 12 mm #9151141	B.Braun, Melsungen, DE	Intraperitoneale <i>in vivo</i> Inokulation
Kryo Einfrierbox #5100-0001	NALGENE Labware, Thermo Fisher, Roskilde, DNK	Einfrieren von Zellen
Kryoröhrchen	NALGENE Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DNK	Zellkultur
Microplate 96-well, F- Bottom, Clear	Greiner bio-one, Kremsmünster, AUT	Bradford und BCA Assay
Mikrotommesser #A35	Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka, JPN	Immunhistochemie
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE	Zellkultur
NUNC MaxiSorp™ flat- bottom 96 well plates #44-2404-21	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA	ELISA-Platten
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE	Immunhistochemie
Pasteurpipetten aus Glas	Hirschmann Laborgeräte, Berestadt, DE	Zellkultur
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	Allgemein
qPCR Platten 96-well Mx3000P Skirted #401334	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	qPCR-Analyse
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, DE	Allgemein
Sealing Tape #236366	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA	ELISA
Serologische Pipetten	Greiner, Kremsmünster, AUT	Allgemein
Spritze Injekt Luer Solo 10 ml #4606108V	B.Braun, Melsungen, DE	Absaugen von Aszites
Sterilfilter 0,45 µm Sartorius Minisart 25 mm	Fisher Scientific, Schwerte, DE	Filtern von Virionen
Sterilfilter Minisart 0,1 / 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen, DE	Zellkultur
Stripes Optical Cap 8x #401425	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	qPCR-Analyse
Transfektionsröhrchen #352054	Corning Incorporated, Corning, NY, USA	Lentivirale Transduktion

Wet Blot Papier #MN8273	Machery-Nagel, Düren, DE	Western Blot
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Greiner bio-one, Kremsmünster, AUT	Zellkultur
Zellkulturplatten	Corning Incorporated, Corning, NY, USA	Zellkultur

10. Technische Geräte

Laborgerät	Firma	Anwendungsbereich
AT-2 Slide Scanner	Leica Biosystems, Nußloch, DE	Immunhistochemie
Automatischer Immunostainer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	Immunhistochemie
Bandelin Sonopuls	Bandelin electronic, Berlin, DE	Ultraschallstab
Blotting chamber	Bio-Rad, Hercules, CA, USA	Westernblot
Chemi Doc XRS+	Bio-Rad, Hercules, CA, USA	Geldokumentation und Westernblot Entwicklung
FACS Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	FACS
HERACELL 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Zellinkubator
Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Sterilbank / Zellkultur
Innova 4200 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA	Bakterienschüttler
Integra Vacusafe	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, DE	Absaugpumpe, Zellkultur
IVIS Spectrum <i>In Vivo</i> Imaging System	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA	<i>In vivo</i> Imaging
Lightcycler MX3005P	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	qPCR-Analyse
Microm HM335E	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Mikrotom, Herstellung von Gewebeschnitten
Mikro-Dismembrator	Sartorius AG, Göttingen, DE	Gewebeaufschluss
MS2 Minishaker	Ika-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE	Vortexer
MTA-1 manual TMA device	Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA	Herstellung von TMAs
Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	ELISA Reader

NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE	Messung von RNA und DNA
NanoZoomer Digital Pathology RS	Hamamatsu, Hamamatsu, JPN	Scannen von histologischem Gewebe auf Objektträgern
Olympus CK30	Olympus, Tokyo, JPN	Lichtmikroskop, Zellkultur
Rotina 420 R	Hettich, Kirchlingern, DE	Zentrifuge
Sartorius BP 1200	Sartorius AG, Göttingen, DE	Waage
Stripettor Plus	Corning GmbH, Wiesbaden, DE	Pipettor
Vortex Genie 2	Bender und Hobein AG, Zürich, CHE	Vortexer
Zeiss Axio Observer	Zeiss, Oberkochen, DE	Mikroskop

11. Software

Software	Firma	Anwendungsbereich
Aperio Image Scope (V12.4.0.7018)	Leica Biosystems, Nussloch, DE	IHC Auswertung
BD CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg, DE	FACS Analyse
Flowing (V2.5.1)	Turku Bioscience, Turku, FIN	FACS Analyse
Graph Pad Prism (V9.0.1)	GraphPad Software, San Diego, CA, USA	Statistik, Erstellung von Abbildungen
Image J	National Institute of Health, Bethesda, MD, USA	IHC Auswertung
Image Lab (V6.1)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA	Western Blot Detektion
Living Image	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA	<i>In Vivo</i> Biolumineszenz
MxPro qPCR Software	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	qPCR Analyse
Nanodrop ND-1000 (V3.8.1)	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA	DNA/RNA Messung
NDP.view 2 (V2.8.24)	Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, DE	IHC Auswertung
NEBcutter (V2.0)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	Test für Restriktionsenzyme
QuPath (V0.2.3)	(Bankhead et al., 2017)	IHC Auswertung
SPSS Statistics (V26)	IBM, Armonk, NY, USA	Patientenkollektive

VI. METHODEN

1. Analyse der humanen Kollektive

1.1. FFPE-Präparationsmethodik zur mikroskopischen Beurteilung

Um entnommenes Tumorgewebe histologisch beurteilen und immunhistochemisch analysieren zu können, wurde die Paraffineinbettung nach Formaldehydfixierung (FFPE) verwendet. Hierfür wurden die Tumore nach operativer Entfernung und pathologischer Begutachtung zunächst für mindestens 24 Stunden in einem quervernetzenden Fixiermittel (4 %-iges Paraformaldehyd) gelagert und anschließend in Paraffin eingebettet. Im weiteren Verlauf wurden aus den Tumorböcken der Patientenkollektive *Tissue Microarrays* (TMAs) von Primärtumoren und Peritoneum- bzw. Omentum-Metastasen erstellt. Pro Tumorblock wurden mit Hilfe eines *Manual Tissue Microarray Device* je drei zylindrische Kernbiopsien mit einem Durchmesser von einem Millimeter in den vorpräparierten TMA-Paraffinblock übertragen. Ein TMA erhielt somit Tumorproben in Triplikaten von bis zu 28 verschiedenen Patientinnen. Zudem wurden verschiedene Biopsien von gesundem Gewebe aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Technischen Universität München zur Kontrolle und Orientierung am Rande der TMAs arrangiert (z.B. Niere, Omentum, Leber). Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden die Paraffinblöcke auf 2–4 µm Schichtdicke geschnitten und auf Glasobjektträger übertragen.

1.2. Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung

Um in einer Übersichtsfärbung das Vorhandensein von Tumorgewebe und dessen histologisches *Grading* von einem Pathologen beurteilen lassen zu können, wurde mit den Schnitten der jeweiligen TMAs eine Routinefärbung mit Hämatoxylin und Eosin durchgeführt. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen und somit negativ geladene Gruppen der Nukleinsäuren im Zellkern blau, wohingegen Eosin namensgebend eosinophile Strukturen wie zum Beispiel positiv geladene Aminogruppen der Zellplasmaproteine rötlich anfärbt. Um die Färbung in wässriger Phase zu ermöglichen, wurden die Schnitte zunächst deparaffiniert und rehydriert. Da sich Xylol gleichermaßen mit Paraffin und Alkohol mischen lässt, wurde dieses vor der absteigenden Alkoholreihe als Intermedium eingesetzt. Das genaue Verlaufsprotokoll lautete wie folgt: Zweimal zehn Minuten Xylol; zweimal fünf Minuten Isopropanol;

fünf Minuten 96 %-iger Ethanol; fünf Minuten 50 %-iger Ethanol; zweimal drei Minuten TBS (Tris-buffered Saline). Anschließend wurden die Schnitte für sechs Minuten in Hämatoxylin-Lösung getaucht, für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und mit destilliertem Wasser gespült. Die Schnitte wurden für eine Minute in Eosin-Lösung getaucht und danach wieder mit destilliertem Wasser gespült. Um die Färbung anschließend zu fixieren und ein optisch homogenes Dauerpräparat herzustellen, wurden die Schnitte in umgekehrter Reihenfolge durch die oben beschriebene Alkohol- und Xylolreihe geführt. Abschließend wurden die Schnitte mit einer synthetischen Pertex-Lösung eingedeckelt und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

1.3. Immunhistochemische Färbungen auf humanem Gewebe

Expressionsunterschiede verschiedener Chemokine wurden durch immunhistochemische Färbungen nach dem HRP-Polymer-Prinzip detektiert. Hierbei wird nach Primärantikörperbindung an das gesuchte Antigen ein Polymer-Nachweisreagenz hinzugegeben. Dieses beinhaltet Aminosäureketten, an die mehrere Moleküle Sekundärantikörper mit mehreren Molekülen Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish-peroxidase*) kovalent gebunden sind. Die Lokalisation des Komplexes wird schließlich über eine Enzym-Substrat-Reaktion ermöglicht, bei welcher das zugegebene lösliche DAB-Substrat (3,3'-Diaminobenzidin) in ein unlösliches, chromogenes Produkt umgewandelt wird (Auflistung der Antikörper siehe Punkt V.4).

Die Objektträger wurden zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe (siehe Punkt 1.2) entparaffiniert und anschließend zweimal für drei Minuten mit 1x TBS-T Puffer gewaschen. Der Waschschrift mit TBS-T wurde im Folgenden nach jeder Reagenzzugabe bis zur Hämatoxylin-Gegenfärbung wiederholt. Um bei der Nutzung des HRP-gekoppelten Polymer-Systems eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch 3 %-iges Wasserstoffperoxid abgesättigt (20 min bei RT). Die Schnitte wurden anschließend zwei bis drei Minuten lang in Leitungswasser gestellt und nach dem TBS-T Waschschrift in eine Feuchtkammer gelegt. Dort erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen humanes CX3CL1. Dieser wurde mit *Antibody Diluent* 1:100 verdünnt und mit einem Volumen von 120 µl pro Objektträger verteilt (1 Std. bei RT). Im nächsten Schritt wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur je 120 µl an HRP-Polymer Reagenz pipettiert. Für die folgende Substratreaktion wurde das DAB-Chromogen 1:21 im zugehörigen Substratpuffer verdünnt und mit 120 µl pro Objektträger für eine

Inkubationszeit von acht Minuten auf die Schnitte verteilt. Um den Ort des gebundenen Antigens besser in die Zellanatomie einordnen zu können, wurde anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt (siehe Punkt 1.2). Durch die aufsteigende Alkoholreihe und das Eindeckeln mit Pertex wurde das angefärbte Gewebe für die Lagerung konserviert und der Kontrast für die Mikroskopie verbessert.

In Abweichung zur CX3CL1-Färbung erfolgte bei der CXCL9-Detektion vor der Durchführung des Peroxidase-Blocks eine hitze-induzierte Demaskierung der Antigene. Dabei wurden die Schnitte für vier Minuten mit Citratpuffer (pH 6) im Schnellkochtopf erhitzt und anschließend mit Leitungswasser abgekühlt. Alle anderen Schritte erfolgten wie oben beschrieben. Der Primärantikörper gegen humanes CXCL9 wurde 1:100 verdünnt eingesetzt.

1.4. Scoring und Auswertung

Die eingedeckelten Objektträger wurden mit Hilfe des *NanoZoomer Digital Pathology RS* von Hamamatsu eingescannt und manuell mit der Software *NDP.view 2* oder digital mit der Software *Image J* ausgewertet. Die Analyse der CX3CL1- und CXCL9-Färbung wurde manuell durchgeführt. Da keine auffällige intratumorale Heterogenität in den verschiedenen Färbungen nachgewiesen werden konnte, wurde die Analyse der Proteinexpression allein durch die Intensität der Färbung bestimmt und an den Kontrollorganen der TMAs orientiert. Bei beiden Färbungen wurde in drei Scores aufgeteilt: „Score +1“ (schwache Färbung), „Score +2“ (moderate Färbung) und „Score +3“ (starke Färbung). Für gefärbte Triplets wurde der Modalwert angegeben. Durch technisch bedingte abgeschwemmte Gewebepunkte ergaben sich für unterschiedliche Färbungen unterschiedliche Gesamtfallzahlen. Für die jeweilige Korrelationsberechnung mit dem PFS (progressionsfreies Überleben) und OS (Gesamtüberleben) wurden Score +1 und +2 zur moderat exprimierenden Gruppe zusammengefügt und gegen Score +3 als stark exprimierende Gruppe getestet. Für die digitale Auswertung der CX3CL1-Färbung wurde jeder TMA-Dot bei 10-facher Vergrößerung als TIF-Datei exportiert und in *Image J* geladen. Durch das *IHC Profiler Plugin* wurde ausschließlich die DAB-Färbung rausgefiltert und exportiert. Im nächsten Schritt wurden per Freihandzeichnung drei verschiedene Tumorregionen umrandet und analysiert. Der Intensitätsmittelwert der Triplikate wurde hierfür durch den Flächenmittelwert geteilt und anschließend vom maximalen Schwellenwert mit dem Wert 255 abgezogen. Hierdurch ergab sich ein linear aufsteigender Zusammenhang mit der Färbintensität. Werte bis 75 wurden der moderat exprimierenden Gruppe zugeordnet und Werte ab 75

der stark exprimierenden Gruppe.

2. Zellkultur und *in vitro* Experimente

2.1. Kultivierungsbedingungen

Alle Zelllinien wurden in einem Zellinkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt und die Zellen wurden passagiert, sobald sie in der Zellkulturflasche eine Konfluenz von 70 % bis 80 % erreicht hatten. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, um tote Zellen sowie saure Stoffwechselprodukte zu entfernen. Danach wurde für fünf bis zehn Minuten mit dem jeweiligen Ablösereagenz inkubiert (EDTA fängt für die Adhäsion wichtige Calciumionen ab; Trypsin spaltet als Protease für den Zellverband wichtige Proteine). Die abgelösten Zellen wurden mit Medium abgewaschen, in ein 15 ml Falcon überführt und für drei Minuten bei 300 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde sorgfältig in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einem zell-spezifischen Passagier-Verhältnis (siehe Punkt V.2.1) in eine neue Kulturflasche überführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl einer gut resuspendierten und mit Trypanblau verdünnten Zellsuspension unter das Deckglas einer Neubauer-Zählkammer pipettiert und nur lebende Zellen ausgezählt. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmen getestet.

2.2. Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Zellen

Da sich Zelllinien durch die andauernde Kultivierung im Laufe der Zeit in Phänotyp, Proliferationsrate und Proteinexpressionsmuster verändern können, ist es ratsam in relativ frühen Passagen Gefrierkonserven anzulegen, auf die nach Bedarf zurückgegriffen werden kann. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO fungiert hierbei als Gefrierschutzmittel, indem es den intrazellulären Gefrierpunkt stark herabsetzt und den Zellen zusätzlich Wasser entzieht. Somit kann der Eiskristallbildung und der damit verbundenen Verletzung von Zellorganellen vorgebeugt werden. Um Zelllinien einzufrieren und für längere Zeit zu lagern, wurden diese mit einer Konzentration von circa 10⁶ Zellen/mL in Einfriermedium resuspendiert und auf Kryogefäße aufgeteilt. Die Zellsuspension wurde anschließend in Isopropanolboxen mit einem konstanten Gradienten von 1 °C/min bis auf -80 °C heruntergekühlt und dann in flüssigen Stickstoff (-196 °C) übertragen.

Um eine in flüssigem Stickstoff gehaltene Zellsuspension wieder in Kultur zu bringen,

wurde diese zunächst in 8 ml Zellkulturmedium resuspendiert und für drei Minuten bei 300 x g abzentrifugiert. Somit konnte das im Überstand enthaltene DMSO wieder entfernt werden, welches in der hohen Konzentration in Kultur zelltoxisch wirken würde. Das Zellpellet wurde anschließend wieder in Kulturmedium resuspendiert und vollständig in eine Kulturflasche überführt. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.3. Zellproliferationsanalyse

Um vor der *in vivo* Inokulation zu zeigen, dass die Überexpression des jeweiligen Chemokins keine Veränderung in der Zellproliferation ausgelöst hatte, wurden folgende Methoden verwendet:

Der ID8Trp53^{-/-}SFeGFPlucpSMPUW-*mCx3cl1* Klon wurde in der Proliferation mit dem zugehörigen Kontrollvektor-Klon verglichen, indem 50.000 Zellen pro Klon in mehreren 12-Well-Duplikaten ausgesät und nach drei, 24 und 48 Stunden wieder abgelöst wurden. Die Zellen wurden anschließend mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Proliferationsrate wurde auf den Startwert normalisiert. Die Proliferation der Klone ID8Trp53^{-/-} pSMPUW-*mCx3cl1*, ID8Trp53^{-/-} pSMPUW-*mCxcl9* und ID8Trp53^{-/-}Brca2^{-/-}pSMPUW-*mCxcl9* wurde mit dem jeweiligen Kontrollklon verglichen, indem 2.000 Zellen pro 70 µl Medium mit 5 % FCS in mehreren 96-Well Triplikaten ausgesät und nach drei, 24 und 48 Stunden mit 14 µl MTT Reagenz (5 mg/ml in PBS) versetzt wurden. Innerhalb einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C wurde das wasserlösliche gelbe Tetrazoliumsalz durch die metabolische Aktivität der Zellen, welche stark mit der Zellviabilität korreliert, in ein violette, wasserunlösliches Formazan reduziert. Dieses wurde durch die Zugabe von DMSO in den Überstand freigesetzt und die Intensität der Färbung wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die analysierte Proliferationsrate wurde auf den Startwert normalisiert. Auch die Zelllinien ID8Trp53^{-/-} und ID8Trp53^{-/-}Brca2^{-/-} wurden mittels dieser Methode im Wachstum verglichen.

2.4. Beurteilung der Zellmorphologie

Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen ID8Trp53^{-/-} und ID8Trp53^{-/-}Brca2^{-/-} Zellen wurden bei 10-facher Vergrößerung visuell dargestellt (Zeiss Axio Observer).

2.5. *In vitro* Stimulationsexperimente

Für die Durchführung von *in vitro* Stimulationsexperimenten wurden murine und

humane Zelllinien zu einer 50 %-igen Konfluenz ausgesät, für 24 Stunden mit serum-freien Medium gehungert und schließlich in 500 µl Stimulationsmedium inkubiert. Durch die Zugabe rekombinanter Zytokine konnte die Basis-Chemokinsekretion erhöht werden und durch die Zugabe unterschiedlicher FCS Konzentrationen wurde die Proliferationsrate gesteuert. Für weitere Analysen wurden nach 24 oder 48 Stunden Stimulation die Überstände abgenommen oder nach 72 Stunden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert. Jeder Stimulationsansatz wurde in Triplets durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt. Im Stimulationsmedium wurden folgende Reagenzien und Lösungsmittelkontrollen eingesetzt:

Reagenz	Endkonzentration	Stimulation	FCS Zugabe	Lösungsmittel
TAPI-2	50 µM	24 Std.	0%	Ultrareines Wasser
Olaparib	10 µM	48 Std.	5%	DMSO
Niraparib	10 µM	48 Std.	5%	DMSO
CXCL9	100 ng/ml	72 Std.	10%	0,1% BSA in PBS
TNF α	10 oder 50 ng/ml	24 oder 48 Std.	0% oder 5%	0,1% BSA in PBS
IFN γ	10 oder 50 ng/ml	24, 48 oder 72 Std.	0,5% oder 10%	0,1% BSA in PBS

2.6. Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS)

Um membranständige Cx3cl1-Veränderungen zu analysieren, wurden 250.000 ID8Trp53^{-/-} Zellen in 6-Wells ausgesät, für 24 Stunden gehungert und für 24 Stunden mit 0,05 ng/µl TNF α oder der Lösungsmittelkontrolle BSA stimuliert. In einem weiteren Ansatz wurde den Wells zusätzlich noch 50 µM TAPI-2 als ADAM17 Inhibitor zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit EDTA abgelöst, gezählt und mit einer Zellzahl von 500.000 pro Probe in eine 96-Well V-Shape Platte pipettiert. Abzentrifugierte Pellets wurden mit je 100 µl FACS-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 1:300 verdünntem Maus-Fc-Block inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Pellets für eine Stunde im Dunkeln mit 2 µg/ml Anti-Cx3cl1- oder Isotyp-Antikörper inklusive Alexa-Fluor-488-Konjugat inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die gefärbten Zellen schließlich in 175 µl FACS-Puffer resuspendiert, in konische FACS-Gefäße übertragen und etwa zehn Minuten vor der Messung zusätzlich mit 1 µl 7-AAD *viability staining solution* versetzt. Im Becton Dickinson FACS-Calibur wurden mithilfe der CellQuest Pro Software 20.000 Events pro Probe mit grünem FL-1 Filter (530 nm) und rotem FL-3 Filter (670 Longpass) gemessen und mit der Software

Flowing von Turku Bioscience ausgewertet. 7-AAD gefärbte Zellen und Dubletten wurden für die Darstellung der stimulierten Proben im *Overlay*-Histogramm ausgeschlossen.

2.7. Lentivirale Transduktion muriner Zelllinien

Um eine stabile Überexpression der Chemokine Cxcl9 oder Cx3cl1 in murinen Ovarialkarzinomzellen (ID8-Derivaten) zu erreichen, musste zunächst die cDNA des jeweiligen Zielgens aus einem Plasmid (siehe V.5) in einen lentiviralen Transfervektor (siehe Abbildung 8) kloniert werden:

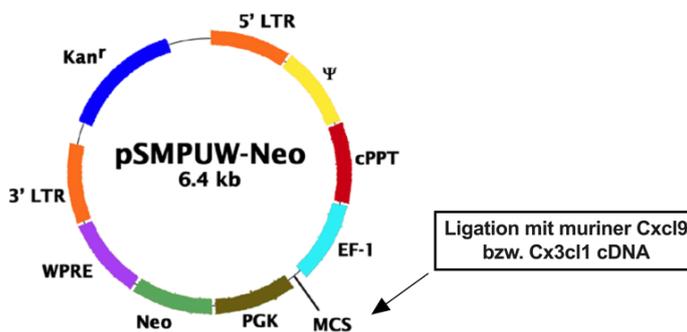


Abbildung 8: pSMPUW-Neo Lentiviral Expression Vector (Kanamycin-resistent), Cell Biolabs

Mit Hilfe einer dreistufigen PCR wurden an die jeweilige cDNA-Sequenz im Plasmid Restriktionsenzymstimmstellen mit Überhang für FseI und PacI kloniert, welche sich auch in der *Multiple Cloning Site* des im weiteren Verlauf verwendeten pSMPUW-Neo Transfervektors befinden und innerhalb der cDNA nur je einmal an der finalen Sequenz schneiden. Die PCR wurde nach Herstellerangaben mit einer *Herculase II fusion polymerase* und den unter Punkt V.6 aufgelisteten Primern durchgeführt. Um die entstandene Zielsequenz von den Vektorresten zu trennen, wurde das PCR-Produkt über ein 1 %-iges Agarose-/Ethidiumbromid-Gel in TAE-Puffer aufgetrennt, und die Zielbande unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Ziel-cDNA wurde nach Herstellerangaben mittels des *Monarch DNA Gel Extraction Kits* aus dem Gelstück extrahiert und mögliche PCR-Polymerase Rückstände wurden mittels Proteinase-K-Verdau entfernt. Anschließend wurde die cDNA über eine Säule (*Monarch PCR & DNA Cleanup-Kit*) oder mittels Alkoholfällung aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurden 1 µg der cDNA beziehungsweise des pSMPUW-Transfervektors mit je 10 Units der Restriktionsenzyme FseI und PacI in *Cut Smart*-Puffer verdaut und wieder mit dem *Monarch Cleanup*-Kit aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurden 50 ng des pSMPUW-Vektors zusammen mit einem zehnfachen molaren Überschuss an cDNA-Insert in

einem T4-DNA-Ligase Reaktionsansatz ligiert. 5 µl des Ligationsansatzes wurden mittels *Heat-Shock*-Methode in 90 µl DH5α-Bakterien transformiert und das Pellet auf einer Kanamycin-LB-Agar-Platte über Nacht ausplattiert. Am nächsten Tag wurden Klone isoliert und wiederum über Nacht in Bakterienröhrchen mit Kanamycin (1:1000) und LB-Medium angezüchtet. Um die Klone auf den eingebauten Vektor zu testen, wurden sie mittels NucleoSpin® Plasmid Isolations Kit isoliert und zum Test auf das eingebaute Insert erneut mit den Restriktionsenzymen FseI und PacI verdaut. Das Vorhandensein einer Bande für den Vektor und einer Bande für das Insert wurde mittels 1 %-igem Agarosegel ermittelt. Ein positiver Klon wurde schließlich zur Sequenzierung zu Eurofins Scientific geschickt. Wurde das Insert fehlerfrei eingebaut, so wurden Glycerinstocks der erfolgreich transformierten Bakterien angelegt und das Plasmid bei Bedarf mittels NucleoBond®Xtra Midi Plasmid Isolations Kit erneut isoliert.

Für die Transfektion der Vektoren aus dem *ViraSafe™ Lentiviral Expression System* in die Verpackungszelllinie HEK293T wurden 6 µg pSMPUW-Vektor (mit oder als Vektorkontrolle ohne ligierter Chemokin-cDNA), 2 µg pRSV-Rev, 2 µg pCMV-Eco und 2 µg pCgpV mit 24 µl Lipofectin inkubiert und tröpfchenweise auf eine konfluente Zellkulturschale mit HEK293T Zellen und 1,5 ml OPTI-MEM Kulturmedium pipettiert. Das OPTI-MEM wurde nach sechs Stunden verworfen und die Schale mit 4 ml DMEM-Medium aufgefüllt. Innerhalb der nächsten Tage wurden durch die HEK293T Zellen aus den aufgenommenen Vektoren Virionen produziert und in den Überstand abgegeben. Der Überstand wurde nach 24, 48 und 72 Stunden abgenommen, durch 0,45 µm filtriert, 1:1000 mit Polybrene versetzt und unter ständigem Schwenken in der Zellkulturschale mit den zu transduzierenden ID8-Derivaten inkubiert. Nach der dritten Virionen-Inkubation wurde die konfluente Zellkulturschale in Medium mit 1 g/l G418 Neomycin passagiert und auf Zellen mit stabil aufgenommenen Virionen selektiert. Nach etwa zehn Tagen wurden Einzelzellklone hochgezogen, isoliert und mittels ELISA auf eine erfolgreiche Überexpression des Zielchemokins getestet.

Der lentivirale Einbau einer *click beetle* Luciferase zur Ermittlung des Tumorwachstums von ID8*Trp53^{-/-}* Zellen mittels Biolumineszenz wurde freundlicherweise von Martina Anton aus dem Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie durchgeführt: Das PCR-Fragment mit einer *eGFP2Aluc* (*enhanced green fluorescent protein – 2A self-cleaving peptide – click beetle luciferase*) Sequenz wurde durch *blunt-end*-Ligation an der BamHI Schnittstelle des pHIV-7 Transfervektors mit SF- (*spleen-focus-forming virus*) Promotor eingebaut (Wübbenhorst

et al., 2010). Virale Überstände wurden anschließend durch eine transiente Calcium-Phosphat-Transfektion von 293T Zellen mit drei Verpackungs-plasmiden (pMD.GP, pRSV-rev und pHCMV.G) und dem pHIV-7 SF eGFP2Aluc Transfektor generiert. $2,5 \times 10^5$ ID $Trp53^{-/-}$ Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion mit 1 ml gefiltertem lentiviralem Überstand und 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene für drei Stunden bei 37 °C unter ständigem Schwenken transduziert. Mittels FACS-*Sorting* wurden eGFP positive Zellen isoliert und weiterkultiviert.

2.8. Detektion von *Trp53*- bzw. *Brca2*-Knockout in ID8-Zellen mittels PCR

Um durch eine Polymerase-Kettenreaktion einen *Trp53*- bzw. *Brca2*-Knockout in der murinen ID8-Zelllinie nachzuweisen, wurde zunächst aus 200 μL Zellsuspension in PBS mittels des *High Pure PCR Template Preparation Kits* von Roche (#11796828001) DNA isoliert. Anschließend wurde folgender PCR-Ansatz pipettiert:

Reagenz	Volumen
10x PCR-Puffer	5 μL
dNTPs (2,5 mM)	5 μL
5'-Primer (10 pmol/ μL)	3 μL
3'-Primer (10 pmol/ μL)	3 μL
dd H ₂ O	32 μL
DNA	1 μL
Taq-Polymerase	1 μL
Gesamt	50 μL

Das gesuchte Amplikon wurde schließlich durch eine Polymerase-Kettenreaktion (30 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 94 °C, 1 min Hybridisierung bei 58 °C und 18 s Elongation bei 72 °C) vervielfältigt und mit einem 1 %-igen Agarose-Gel bei 90 V für 50 min aufgetrennt.

3. Durchführung und Analyse syngener Mausmodelle

3.1. Tierschutzantrag und Tierhaltung

Alle Tierversuchsvorhaben wurden nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes von der Regierung Oberbayern genehmigt und innerhalb der gentechnischen Anlage des Zentrums für präklinische Forschung der Technischen Universität München durchgeführt. Die Tiere wurden unter Einhaltung der Ruhezeiten täglich durch Tierpfleger beobachtet und gemäß *Score Sheet* mindestens einmal die Woche durch den Versuchsdurchführenden gewogen,

beziehungsweise der Gesundheitszustand bewertet sowie dokumentiert.

3.2. Murine Ovarialkarzinommodelle

Zur Durchführung syngener Mausmodelle wurden acht Wochen alte weibliche C57BL/6J, bzw. *athymic nude* Mäuse von Charles River bestellt. Nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche in der neuen Umgebung wurden die Mäuse mit 10^7 Zellen verschiedener, mykoplasmenfreier ID8-Derivate subkutan oder intraperitoneal inokuliert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension gleichmäßig in einer Menge von 250 μ l PBS pro Tier verteilt war. Eine Gruppe bestand aus vier bis sieben Mäusen. Schlüsselexperimente wurden zweimal durchgeführt. Die subkutane Injektion führte nach etwa 100 Tagen zur Bildung eines tastbaren, soliden Tumors, welcher zweimal die Woche mittels Messschieber im Durchmesser dokumentiert wurde. Abbruchkriterien wurden durch den Aufbruch des Tumors durch die äußerste Hautschicht, durch das Erreichen eines Tumordurchmessers von 1,5 cm und/oder durch eine anhaltende Verschlechterung des Allgemeinzustands festgelegt. Die intraperitoneale Injektion der Tumorzellen führte nach etwa vier Wochen zur Ausbildung eines metastasierten Ovarialkarzinom-Phänotyps mit diffuser Karzinomatose innerhalb der Bauchhöhle und mit hämorrhagischer Aszitesbildung. Die Abbruchkriterien wurden hierbei durch einen stark verschlechterten Allgemeinzustand und/oder durch eine schwere Aszitesansammlung festgelegt. Alle Mäuse wurden unter Isofluranbetäubung durch zervikale Dislokation finalisiert.

3.3. Überwachung des Tumorwachstums mittels *in vivo* Biolumineszenz

Das Tumorwachstum von *click beetle*-Luciferase exprimierenden Zellen konnte *in vivo* gemessen werden, indem einer Maus pro Messung zunächst 150 μ l D-Luciferin-Substrat (50 mM) intraperitoneal verabreicht wurde. Die Mäuse wurden anschließend unter anhaltender Betäubung durch ein 2,5 %-iges Isofluran-Inhalationssystem in das *IVIS Spectrum In Vivo Imaging System* von Perkin Elmer gelegt. Fünf Minuten nach der Substratapplikation wurden sowohl ein Graustufen-Referenzbild als auch ein Biolumineszenzbild mit zweiminütiger Belichtungszeit aufgenommen. Beide Bilder wurden zur optischen Darstellung in der *Living Image Software* von Perkin Elmer übereinandergelegt und die von den Luciferase-exprimierenden Zellen emittierten Photonen wurden quantifiziert. Die Pseudofarben repräsentieren hierbei die durchschnittliche Strahldichte (*radiance*) in der Einheit p/s/cm²/sr. Zur Auswertung wurden stets gleich große ROIs (*regions of interest*) auf das Abdomen der Mäuse

gesetzt und darin der sogenannte Flux in der Einheit Photonen/Sekunde gemessen. Das *in vivo Biolumineszenz Imaging* wurde nach Tumorinokulation einmal wöchentlich durchgeführt.

3.4. *In vivo* Therapiedurchführung

Zur *in vivo* Anwendung der PD-L1 Immuncheckpoint-Inhibition im metastasierten Tumormodell wurde den Mäusen ab Tag 30 nach Tumorinokulation zweimal die Woche eine 200 µg Dosis des *InVivoMAB anti-mouse* PD-L1- oder *InVivoMAB rat* IgG2b Isotyp-Kontrollantikörpers intraperitoneal injiziert. Verdünnt wurden die Antikörper zu 2 µg/µl in *InVivoPure* Verdünnungspuffer (pH 7,0). Die Therapie wurde bis zum Erreichen der Abbruchkriterien fortgesetzt.

3.5. Finalisierungsprotokoll

Nach der zervikalen Dislokation wurde die Haut entlang der Bauchhöhle vorsichtig mit einem Längsschnitt abpräpariert. Subkutane Tumore wurden mit einer stumpfen Schere vollständig entfernt, gewogen und vermessen. Aszites wurde mithilfe einer 20G Einmal-Injektionskanüle abgenommen und für 10 Minuten bei 10 °C und 10.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80 °C weggefroren. Die restliche Flüssigkeit wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle mit einem Tupfer entfernt. Das Aszitesgewicht wurde durch Wiegen der Maus vor und nach der Aszitesentnahme festgestellt. Tumorbefallenes Mesenterium wurde entlang einer Inzision des Enddarms von den Darmschlingen abpräpariert und zur Hälfte in einer Einbettkassette in 4 %-igem Formaldehyd fixiert und zur anderen Hälfte kryokonserviert. Weiteres Tumorgewebe wurde vom Zwerchfell und entlang der Eileiter entnommen, sowie bei -80 °C weggefroren. Zu Dokumentationszwecken des Tumorbefalls wurden Fotos von der uneröffneten Bauchhöhle, des Peritoneums, Mesenteriums, Zwerchfells und eines Eileiters abgespeichert.

3.6. Immunhistochemische Analyse des Tumorgewebes

Murine FFPE-Präparate wurden, wie bereits für humanes Gewebe beschrieben, entparaffiniert, mit 3 µm geschnitten und immunhistochemisch gefärbt. Bei allen Färbungen wurde ein Peroxidblock angewendet. Einzelne Färbungen (CD3, CD8, Foxp3, PD-1, Granzym-B und Ly6G) wurden mit dem automatischen Immunostainer von Agilent Technologies am Institut für vergleichende experimentelle Pathologie von Katja Steiger und Kollegen durchgeführt. Die Signaldetektion erfolgte hier durch das *BOND Polymer Refine DAB Detection Kit* von Leica Biosystems. Eingesannt wurden

die Schnitte am AT-2 Slide Scanner von Leica Biosystems. Die einzelnen Verdünnungen und Protokollinhalte der durchgeführten Färbungen sind folgender Tabelle zu entnehmen:

Erkanntes Antigen	Erkannter Zelltyp	Einsatz	Antigen-Demaskierung
CD206	M2-aktivierte Makrophagen	1:750	Citrat-Puffer pH 6
CD3	T-Zellen	1:100	Citrat-Puffer pH 6
CD49b/DX5	Natürliche Killerzellen	1:50	Citrat-Puffer pH 6
CD8	Zytotoxische T-Zellen	1:100	Citrat-Puffer pH 6
Cx3cr1	z.B. T-Lymphozyten und Tumorzellen	1:750	Citrat-Puffer pH 6
F4/80	Makrophagen	1:300	Citrat-Puffer pH 6
Foxp3	Regulatorische T-Zellen	1:2.000	EDTA-Puffer pH 9
Granzym-B	Zytoplasmatische Granula aus NK-Zellen und T-Zellen	1:1.000	Citrat-Puffer pH 6
Ki67	Proliferationsmarker	1:1.000	Citrat-Puffer pH 6
Ly6G	Myeloide Zellen	1:200	EDTA-Puffer pH 9
PD-1	Aktivierte T-Zellen, B-Zellen & Monozyten	1:50	Citrat-Puffer pH 6

Die manuelle Auswertung der positiv gefärbten Zellen erfolgte mit der Software *Aperio Image Scope* von Leica Biosystems, indem innerhalb von fünf Bildausschnitte mit 640 x 480 *fixed region size* Pixeln ausschließlich DAB-positive Zellen händisch gezählt wurden. Zur Darstellung in Dot-Plots wurde für jeden Gewebeschnitt der Mittelwert aus den fünf Rechtecken als Zellen/Bildausschnitt angegeben. Tumor-infiltrierende Lymphozyten wurden intraepithelial ausgezählt, während stromale Felder vermieden wurden.

Die digitale Auswertung positiver Zellen wurde mithilfe der Software *QuPath* (Bankhead et al., 2017) durchgeführt. Bei einer 25-fachen Vergrößerung wurde im *Brightfield H-DAB* Modus in fünf verschiedenen Regionen das sichtbare Fenster als *Region of Interest* ausgewählt. Dieses bestand im Schnitt aus insgesamt 2.000 Zellen. Der prozentuale Anteil an positiven Zellen wurde durch die Funktion *Positive Cell Detection* berechnet. Hierbei wurde für Färbungen aus dem *AT-2 Slide Scanner* die Einstellung *Hematoxylin OD* angewählt und für Färbungen aus dem *NanoZoomer Digital Pathology RS Scanner* die Einstellung *Optical Density Sum*. Je nach Art der

Färbung wurde mit einem Schwellenwert von 0,2 entweder die Funktion *Nucleus* oder *Cytoplasm DAB Mean* verwendet. Es wurden somit pro Gewebeschnitt mindestens 10.000 Zellen ausgewertet und der gefärbte Zelltyp als „Prozent von allen Zellen“ angegeben. Für die murine Cx3cr1 Färbung erfolgte die Auswertung als Färbeintensität. Hierfür wurde wie oben beschrieben eine Auswahl über fünf verschiedene ROIs getroffen und über das *Compute Intensity Features Tool* der Mittelwert der *OD Sum* berechnet. Alle Beispielfotos für Färbungen wurden mit der Software *Aperio Image Scope* bei einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen.

3.7. Tumoraufschluss aus Kryogewebe

Beim Aufschluss von Tumorgewebe für eine anschließende RNA-Isolation wurden alle Materialien mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. 20 mg des kryokonservierten Gewebes wurden in einen Zylinder mit eingesetztem Kryogefäß und einer 9 mm Edelstahl-Mahlkugel übertragen und zweimal für 15 Sekunden bei 3.000 rpm im Mikrodismembrator von Sartorius pulverisiert. Das Pulver wurde mit 600 µl RLT-Puffer aus dem RNA-Isolations-Kit und 1:100 beta-Mercaptoethanol unter dem Abzug aufgenommen und bei höchster Stufe abzentrifugiert. Der Überstand wurde in der unten aufgeführten RNA-Isolation weiterverwendet.

4. Expressionsanalysen auf RNA-Ebene

4.1. RNA Isolation

Zur RNA-Isolation wurden 10^7 Zellen als Pellet oder 20 mg Tumorgewebe als Pulver in das Qiagen RNeasy® Mini Kit eingesetzt. Die Isolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurde genomische DNA über eine Säule entfernt und anschließend die RNA über eine weitere Säule isoliert und aufgereinigt. Nach Elution in 35 µl RNase-freiem Wasser wurden die Proben im *NanoDrop* auf eine ausreichende Konzentration und Reinheit (260/280 nm Verhältnis bei etwa 2,0) getestet, sowie anschließend bei -80 °C gelagert.

4.2. cDNA-Synthese

Im nächsten Schritt erfolgte eine cDNA-Synthese mit dem *SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System* von Thermo Fisher. Zunächst wurde 1 µl *Random Hexamers* zusammen mit 1 µl dNTP Mix auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt, das Volumen für eine RNA Menge von 1 µg pro Probe berechnet und hinzupipettiert, sowie anschließend mit RNase-freiem Wasser auf 13 µl Reaktionsansatz aufgefüllt. Die Proben wurden für 5

Minuten bei 65 °C erhitzt und mit 4,75 µl SSIV-Puffer, 1 µl DTT, 1 µl Ribonuklease-Inhibitor und 0,25 µl reverser Transkriptase versetzt. Es erfolgte für jeweils 10 Minuten eine Inkubation bei 23 °C, die c-DNA Synthese bei 52 °C und die Inaktivierung bei 80 °C. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert oder direkt in der qPCR eingesetzt.

4.3. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die durchgeführte qPCR Analyse basiert auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, welche durch den Einsatz einer gequenchten, fluoreszierenden Sonde zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Während eines PCR-Zyklus dissoziiert der Quencher ab und die Fluoreszenz, welche proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt, kann in Echtzeit gemessen werden. Für den qPCR-Mastermix wurden folgende Reaktionsansätze pipettiert (Primersequenzen siehe Punkt V.6, Sonden siehe Punkt V.7):

Cx3cl1/PD-L1 Amplifikation	Cxcl9 Amplifikation
6 µl Ultrareines Wasser	5,8 µl Ultrareines Wasser
1 µl Thermo Fisher Probe	0,4 µl Forward Primer
10 µl Brilliant III Mastermix	0,4 µl Reverse Primer
	0,4 µl Roche Universal Probe
	10 µl Brilliant III Mastermix

Die insgesamt 17 µl wurden mit 3 µl cDNA-Synthese-Reaktionsansatz versetzt, in Duplets pro Probe in eine qPCR-Platte pipettiert und dicht verschlossen. Um das Zielamplikon auf ein *Housekeeping*-Gen zu normalisieren, wurde von jeder cDNA Probe zusätzlich in Duplets das Purinstoffwechsellenzym Hprt (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) amplifiziert. Die PCR-Reaktion wurde mit einem initialen Denaturierungsschritt für 3 Minuten bei 95 °C gestartet und lief dann mit 40 Zyklen á 15 Sekunden bei 95 °C plus eine Minute bei 60 °C ab.

Die Daten wurden mit der Software *MxPro* generiert und mit der *Cycle Threshold* (Ct) Methode ausgewertet. Hierbei wird die Zahl des Zyklus, in dem die Fluoreszenz der Amplikon-Probe die exponentielle Phase erreicht, als Ct-Wert bezeichnet und auf den Ct-Wert des Housekeeping-Gens in der zugehörigen Probe normiert (=ΔCt).

5. Expressionsanalysen auf Proteinebene

5.1. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Beim Prinzip des ELISAs wird das nachzuweisende Antigen erst über einen *Capture Antikörper* an eine NUNC 96-Well Platte und anschließend an einen Enzymgekoppelten Detektionsantikörper gebunden, welcher dann zur Reaktion eines Farbstoffsubstrates führt. Die unbekannte Proteinkonzentration wird schließlich durch die Orientierung an der Farbintensität einer Verdünnungsreihe mit bekannter Proteinkonzentration berechnet.

Es wurden Zellüberstände oder Aszitesproben nach Herstellerangaben in die humanen und murinen *DuoSet ELISA Kits* CXCL9, CXCL10 oder CX3CL1 von R&D Systems (siehe Punkt V.8.5) eingesetzt. Im Kit beinhaltete Reagenzien wurden stets wie vorgeschrieben in PBS oder *Reagent Diluent 2* verdünnt. Während den Inkubationsschritten wurde die Platte mit einer Klebefolie verschlossen. Zwischen jedem Schritt bis zur Substratreaktion wurden die Wells dreimal mit PBS-T gewaschen und danach trocken geklopft.

Kurz gesagt wurden die Microtiter Platten über Nacht bei Raumtemperatur mit dem *Capture Antikörper* (100 µl) gecoatet und die freien Bindestellen anschließend mit 1%-igem BSA (200 µl) geblockt. Im nächsten Schritt wurden die Proben und die Verdünnungsreihe für 2 Stunden bei Raumtemperatur geladen (100 µl). Nach einer weiteren zweistündigen Inkubation mit dem Detektionsantikörper wurde für 20 Minuten im Dunkeln das HRP-Reporterenzym (100 µl) hinzugegeben. In den zwei letzten Schritten wurde das TMB (Tetramethylbenzidin)-Substrat (100 µl) hinzupipettiert und die Reaktion nach 20 Minuten durch die direkt anschließende Zugabe von 50 µl Schwefelsäure (0,5 M) abgestoppt. Hierbei erfolgte ein Farbumschlag von Blau zu Gelb. Die Absorption der Wells wurde schließlich bei 450 nm im Multiskan-FC-Reader gemessen.

5.2. Konzentrationsbestimmung mittels Bradford Assay

Um die im ELISA gemessene Chemokin-Konzentration auf die insgesamt im Aszites vorhandene Proteinkonzentration zu beziehen, wurde mit murinen Aszitesproben eine photometrische Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Für einen 2x Coomassie Stock wurde eine 0,06 %-ige *Coomassie Blue* Lösung in 2N Salzsäure hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. Für einen 10x BSA Stock wurde BSA

Pulver in Wasser zu einer 10 mg/ml Lösung gelöst, durch 0,22 µm filtriert, und bei 4 °C gelagert. Für die Verdünnungsreihe wurde im Eppendorf Cup mit der höchsten Konzentration der 10x BSA Stock 1:80 eingesetzt. Die Aszitesproben wurden 1:800 in Wasser verdünnt. Die Platte wurde in Duplikaten mit je 200 µl pro Probe geladen und mit 50 µl einer 1x *Coomassie Blue* Lösung versetzt. Während der zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur bildete der Triphenylmethanfarbstoff in saurer Lösung Komplexe mit Proteinen, wodurch sich je nach Proteingehalt das Probenvolumen von Rot nach Blau färbte. Die Absorption wurde bei 595 nm im Multiskan-FC-Reader gemessen und mithilfe der Verdünnungsreihe in eine quantitative Konzentration umgerechnet.

5.3. Proteinaufschluss aus kultivierten Zellen

Für unstimulierte Zellen wurde das Protein aus einem mit PBS gewaschenen Zellpellet aufgeschlossen. Stimulierte Zellen wurden direkt im 6-Well mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber in 100 µl RIPA-Puffer inklusive Protease-Inhibitoren abgekratzt. In beiden Fällen wurde das Zelllysate 20 Minuten auf Eis inkubiert, 10 Sekunden mit dem Ultraschallstab aufgeschlossen und für 10 Minuten bei 14.000 x g / 4 °C abzentrifugiert.

5.4. Konzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure Assay

Das im Überstand der Zelllysate enthaltene Protein wurde mittels *PierceTM BCA Protein Assay Kit* auf seine Konzentration getestet. Je nach Zellanzahl der stimulierten Proteinlysate oder Pellets wurden diese unverdünnt oder 1:5 - 1:30 verdünnt eingesetzt. Zusammen mit einer BSA-Standardreihe wurden die Proben in Triplets mit 25 µl pro Well in eine unbehandelte 96-Well-Platte pipettiert. Im nächsten Schritt wurden 200 µl *Working Reagent* pro Well hinzupipettiert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch die Peptid-abhängige Reduktion von zweiwertigen zu einwertigen Kupferionen und die anschließende Komplexbildung mit BCA bildete sich ein blau-violetter Farbstoff, dessen Absorption schließlich bei 570 nm gemessen wurde.

5.5. Immunoblot

30 µg der Proteinlysate wurden mit 4-fach Lämmli und Wasser auf ein Volumen von 35 µl eingestellt, für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Die Auftrennung erfolgte zusammen mit einem *Prestained Protein Ladder* über ein 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel in Elektrophoresepuffer bei 120 Volt. Die Proteinbanden wurden bei 350 mA für 90 Minuten in einer Wet-Blot-Kammer aus dem

Gel auf eine äquilibrierte PVDF (Polyvinyliden Fluorid) Membran transferiert. Um den Verlauf der Banden auf der Membran visuell zu kontrollieren, wurde diese mittels Ponceau-S-Lösung angefärbt und mit destilliertem Wasser wieder ausgewaschen. Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen wurde die Membran erst mit 5%-igem Milchpulver in TBS-T geblockt und anschließend über Nacht bei 4 °C mit 1:600 anti-PD-L1-Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten mit TBS-T wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut mit TBS-T gewaschen und schließlich nach der Zugabe des Immobilon® HRP Substrats in der ChemiDoc™ XRS+ von Bio-Rad entwickelt. Im Anschluss wurde nach dem gleichen Schema als Ladekontrolle die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), ein Enzym aus der Glykolyse, detektiert. Hierfür wurden sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper 1:10.000 in 5 %-igem Milchpulver mit TBS-T verdünnt.

6. Statistik

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit der *GraphPad Prism* Software durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden quantitative Daten mit dem Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei Dot Plots mit *in vivo* Daten wurde der Median gewählt. Unterschiede zwischen zwei Gruppen oder Bedingungen wurden mit dem zweiseitigen *Student's* T-Test auf die Signifikanz getestet. Um mehr als zwei Gruppen untereinander auf signifikante Unterschiede zu testen, wurde der *one-way* ANOVA Test plus Tukey's *multiple comparisons* Test angewendet. Um Signifikanzen zwischen zwei Gruppen innerhalb eines Zeitverlaufs zu testen, wurde der *two-way* ANOVA Test plus Šidák's *multiple comparisons* Test gewählt. Kaplan-Meier-Kurven wurden mit dem *Log-Rank*-Test auf Signifikanz getestet. Relative Häufigkeiten wurden mit dem zweiseitigen *Fisher's exact* Test verglichen. *Heatmaps* wurden mittels Pearson-Korrelationskoeffizient erstellt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant angesehen.

VII. ERGEBNISSE

1. Expression von CXCL9 in Ovarialkarzinom-Subtypen

Die bereits 2016 von Bronger und Kollegen veröffentlichten Daten zur CXCL9 Expression im *high-grade* serösen Ovarialkarzinom wurden mit der IHC Analyse in fünf weiteren Subtypen ergänzt (Bronger et al., 2016). In jeder Untergruppe waren stark und moderat/negativ CXCL9-gefärbte Fälle vertreten. Abbildung 9 zeigt die Häufigkeitsverteilungen von 16 klarzelligeren Fällen (CXCL9 56% stark zu 44% moderat), 178 *high-grade* Fällen (15% stark zu 85% moderat), 16 muzinösen Fällen (25% stark zu 75% moderat), 18 *borderline* Fällen (28% stark zu 72% moderat), 30 endometrioiden Fällen (30% stark zu 70% moderat) und 15 *low-grade* Fällen (33% stark zu 67% moderat). Durch den *Fisher's Exact* Test wurde gezeigt, dass das klarzellige Ovarialkarzinom gegenüber allen anderen Subtypen signifikant mehr CXCL9-stark exprimierende Fälle aufweist ($p=0,0019$) und somit womöglich einen immunogeneren Subtyp darstellt.

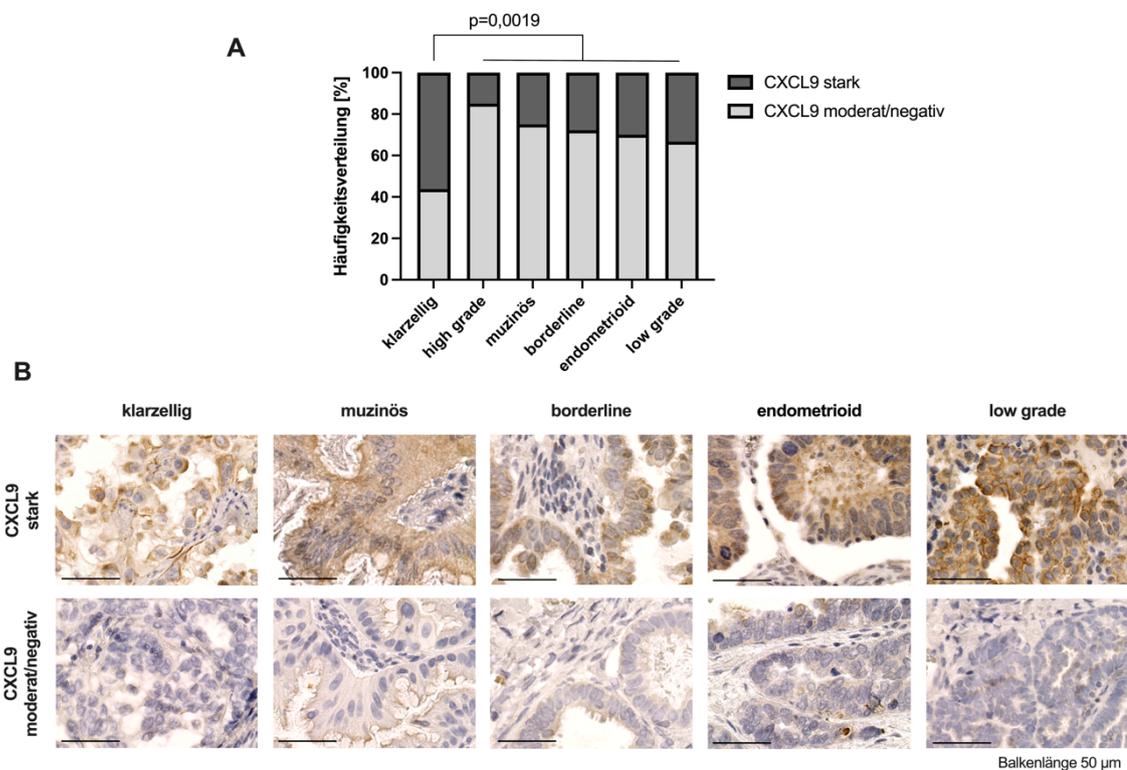


Abbildung 9: CXCL9 stark gefärbte Fälle gibt es am häufigsten im klarzelligen Ovarialkarzinom

A) Häufigkeitsverteilung von starker und moderater CXCL9 Färbung in sechs verschiedenen Ovarialkarzinom-Subtypen (Signifikanztestung mit *Fisher's Exact* Test). Die *high-grade* serösen Karzinomfälle stammen aus Bronger et al., 2016, und wurden nach gleichem Protokoll gefärbt und

ausgewertet. B) Repräsentative immunhistochemische Beispielfotos (Balkenlänge 50 μm).

2. Murine Ovarialkarzinommodelle mit Cxcl9 Überexpression

2.1. Lentivirale Überexpression in ID8*Trp53*^{-/-} und ID8*Trp53*^{-/-}*Brca2*^{-/-} Zellen

Das murine Modell zum serösen epithelialen Ovarialkarzinom mit der sogenannten ID8-Zelllinie (Roby et al., 2000) hat sich mit Erfolg in der Literatur durchgesetzt und eignet sich besonders gut für Studien bezüglich der intratumoralen Rolle des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Um das humane seröse Ovarialkarzinom, das ja in über 95% aller Fälle *TP53*-Mutationen aufweist, noch besser simulieren zu können, wurden von Josephine Walton aus Glasgow ID8-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *Trp53*- (und) *Brca2*-Knockout angefragt (Walton et al., 2016) und mittels PCR nochmals auf die Deletionen getestet (Abbildung 10A). Die zwei Zelllinien zeigten *in vitro* keinen Unterschied in der Proliferation und wiesen eine ähnliche Zellmorphologie auf (Abbildung 10B und C).

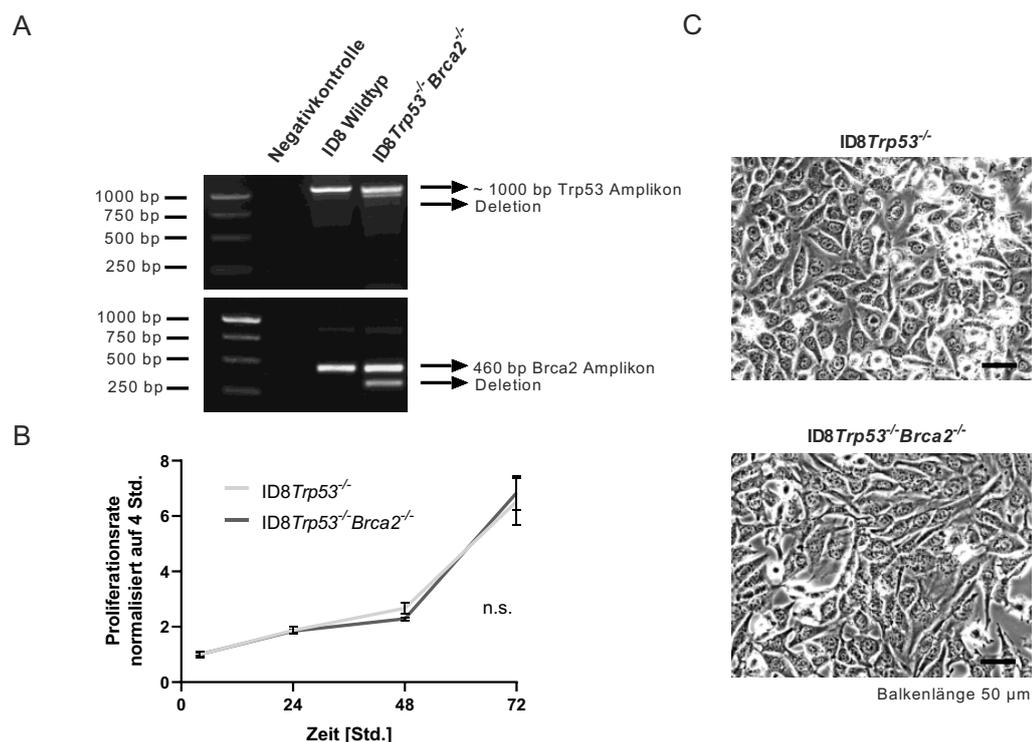


Abbildung 10: ID8-Zellen mit *Trp53*- (und) *Brca2*-Knockout zeigen eine vergleichbare Proliferation

A) PCR zur Detektion des *Brca2*-Amplikons. **B)** Proliferationsmessung mittels MTT-Reagenz über 4, 24, 48 und 72 Stunden (two-way ANOVA Test); repräsentative Mittelwerte mit technischen Triplikaten aus drei Wiederholungen. **C)** Beispielfotos am Durchlichtmikroskop mit 10-facher Vergrößerung.

ID8*Trp53*^{-/-} und ID8*Trp53*^{-/-}*Brca2*^{-/-}-Zellen wurden mittels lentiviraler Transduktion

stabil mit Cxcl9 überexprimiert. Für den Einsatz in den Mausmodellen wurden je ein stark Cxcl9 exprimierender Klon und ein Leervektor (LV)-Kontrollklon ausgewählt und auf eine vergleichbare *in vitro* Proliferationsrate getestet (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12).

Auf RNA-Ebene wurde im ID8Trp53^{-/-}Cxcl9-Klon mittels qPCR eine 19,8-fache Überexpression im Vergleich zum LV-Klon nachgewiesen. Für den Test auf Protein-Ebene wurden die Klone für 48 Stunden mit oder ohne IFN γ (25 ng/ml) stimuliert und die Überstände im Cxcl9-ELISA gemessen. Unstimuliert wurde im LV-Klon keine Cxcl9 Konzentration detektiert, im Cxcl9 Klon waren es im Schnitt 57,1 pg/ml. Unter IFN γ -Stimulation stieg die Cxcl9-Sekretion im LV-Klon auf 56,9 pg/ml, der Cxcl9-Klon erreichte mit 279 pg/ml eine knapp fünffach höhere Cxcl9-Konzentration (Abbildung 11C).

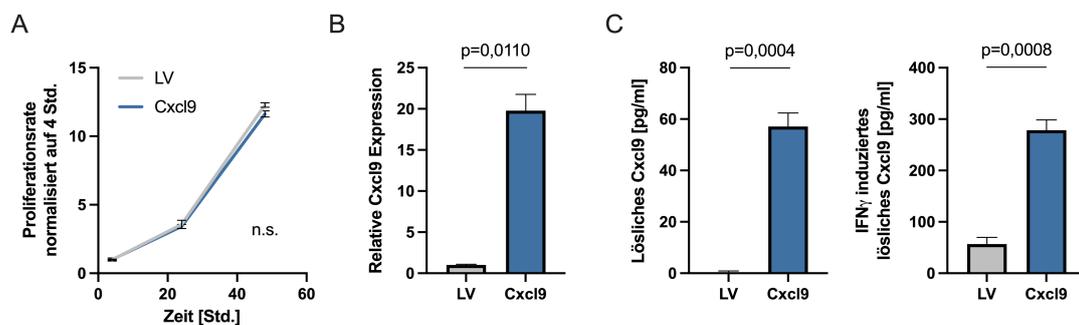


Abbildung 11: Erfolgreiche Cxcl9 Überexpression in ID8Trp53^{-/-} Zellen

A) Proliferationsmessung mittels MTT-Reagenz über 4, 24 und 48 Stunden (two-way ANOVA Test); repräsentative Mittelwerte mit technischen Triplikaten aus drei Wiederholungen. **B)** qPCR-Analyse der Überexpression mit angegebenen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werten; repräsentative Mittelwerte mit technischen Duplikaten aus drei Wiederholungen (Student's T-Test). **C)** ELISA Messung von löslichem Cxcl9 im Überstand mit und ohne IFN γ -Stimulation (25 ng/ml); Mittelwerte aus drei Wiederholungen (Student's T-Test).

Im ID8Trp53^{-/-}Brca2^{-/-}Cxcl9-Klon wurde auf RNA-Ebene eine 9,6-fache Überexpression festgestellt, auf Protein-Ebene wurde ohne Stimulation im Leervektor kein Cxcl9 detektiert, im Überexpressionsklon waren es 71,4 pg/ml. Unter IFN γ stieg die Konzentration im Leervektor auf 71,2 pg/ml und im Cxcl9-Klon auf das 5,6-fache mit 401 pg/ml (Abbildung 12C).

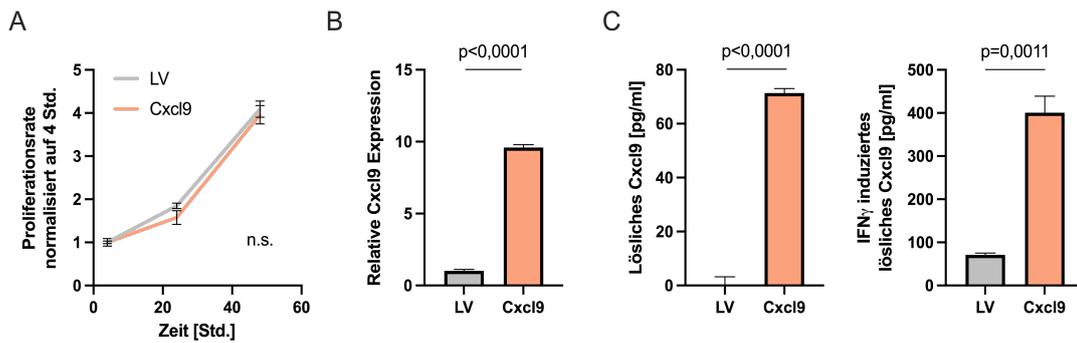


Abbildung 12: Erfolgreiche Cxcl9 Überexpression in ID8Trp53^{-/-}Brca2^{-/-} Zellen

A) Proliferationsmessung mittels MTT-Reagenz über 4, 24 und 48 Std. (Two-way ANOVA Test); repräsentative Mittelwerte mit technischen Triplikaten aus drei Wiederholungen. **B)** qPCR-Analyse der Überexpression mit angegebenen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werten; repräsentative Mittelwerte mit technischen Duplikaten aus drei Wiederholungen (Student's T-Test). **C)** ELISA Messung von löslichem Cxcl9 im Überstand mit und ohne 25 ng/ml IFN γ -Stimulation; Mittelwerte aus drei Wiederholungen (Student's T-Test).

2.2. Einfluss von Cxcl9 auf Wachstum, Überleben und Immuninfiltration im syngenem Ovarialkarzinom-Mausmodell (*Brca2*-Wildtyp)

Um den Effekt von intratumoralem Cxcl9 im HR-profizienten *Brca2*-Wildtyp Setting auf das Überleben zu untersuchen, wurden im syngenem Ovarialkarzinom-Mausmodell jeweils sieben weiblichen C57BL/6-Mäusen intraperitoneal 1×10^7 ID8Trp53^{-/-}Cxcl9 oder ID8Trp53^{-/-}Leervektor-Zellen inokuliert. Der Phänotyp des humanen Ovarialkarzinoms konnte durch die Bildung von Aszites sowie der Entstehung von Metastasen an Peritoneum, Mesenterium und Zwerchfell erfolgreich nachgestellt werden. Abbildung 13B zeigt Beispielfotos einer Finalisierung nach Erreichen des Abbruchkriteriums einer massiven Aszitesbildung.

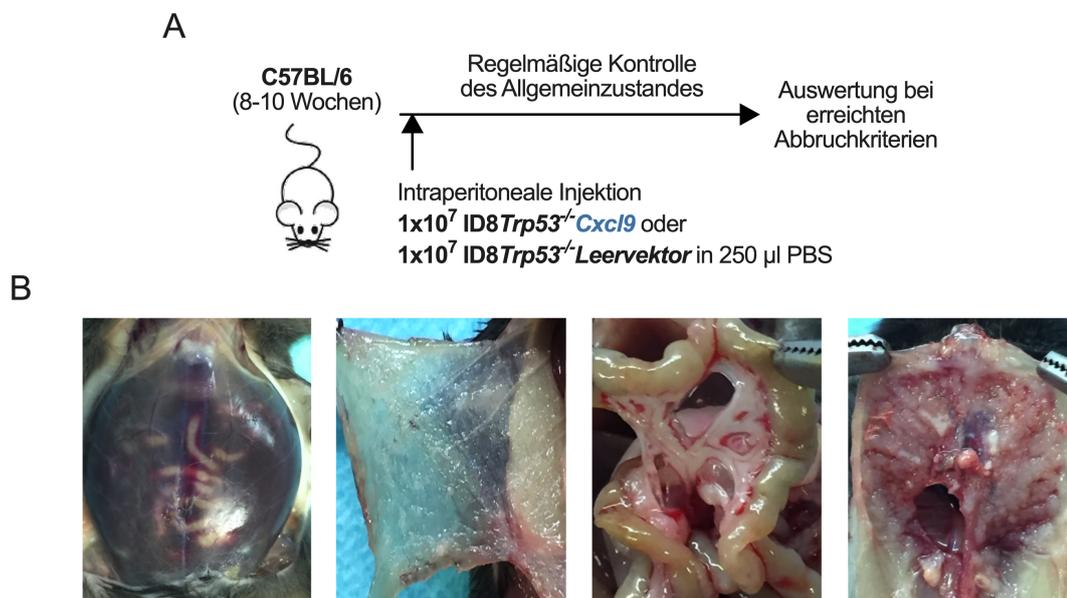


Abbildung 13: Syngenes Mausmodell mit Cxcl9 Überexpression im *Brca2*-Wildtyp Modell

A) Erläuterung des intraperitonealen Inokulationsschemas mit sieben C57BL/6-Mäusen pro Gruppe und 1×10^7 Zellen in 250 μ l PBS. B) Beispielfotos nach Erreichen der Abbruchkriterien mit hämorrhagischem Aszites und Tumorknoten im Peritoneum, Mesenterium und Zwerchfell.

2.2.1. Überlebenszeiten

Die erste Maus mit Aszitesbefund wurde an Tag 37 nach der Inokulation dokumentiert. Daraufhin ergab sich ein medianer Unterschied in der Aszitesbildung von 14 Tagen ($p=0,0017$) zwischen der LV- und der Cxcl9-Gruppe (39 vs. 53 Tage). Der positive Cxcl9-Effekt bestätigte sich auch signifikant im Gesamtüberleben mit einem medianen Unterschied von 10 Tagen ($p=0,0076$) zwischen LV- und Cxcl9-Gruppe (50 vs. 60 Tage). Zwei Mäuse aus der Cxcl9-Gruppe überlebten das festgelegte Ende des Experiments an Tag 90 (Abbildung 14).

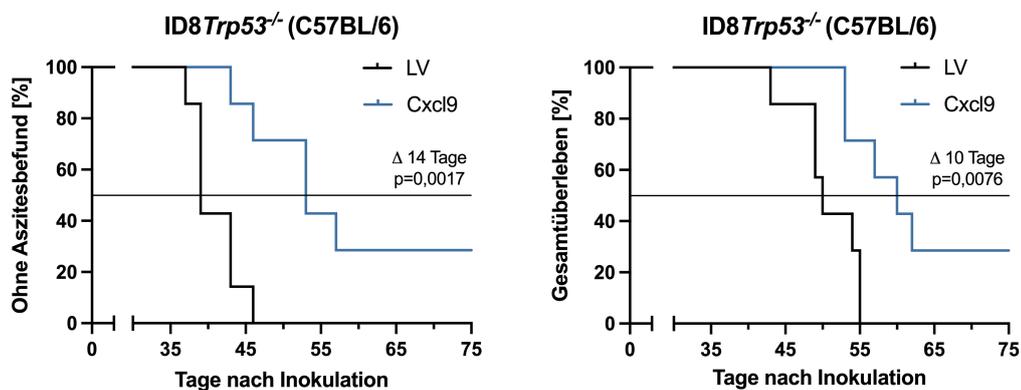


Abbildung 14: Cxcl9 verlängert das Überleben im *Brca2* Wildtyp Modell

Kaplan-Meier-Kurven, die die Zeit bis zur Aszitesbildung (links) bzw. bis zur Finalisierung aufgrund vordefinierter Kriterien (rechts) zeigen (Log-Rank-Signifikanztest). Darstellung bis Tag 75.

2.2.2. Expressionsanalysen und Immunzellpopulationen im Tumor

Laut Finalisierungsprotokoll wurde der abgesaugte Aszites abzentrifugiert und der Überstand im Chemokin-ELISA eingesetzt. Zur exakteren Analyse wurde die gemessene Chemokinkonzentration mittels Bradford Assay auf das Gesamtprotein im Aszites normalisiert (Abbildung 15). Die intratumorale Cxcl9-Überexpression konnte im Aszites mit einer 5,7-fach höheren Cxcl9-Konzentration gegenüber der LV-Gruppe nachgewiesen werden (0,5 vs. 3,1 pg/ml pro mg/ml Gesamtprotein; $p=0,0322$). Um auszuschließen, dass der Cxcl9-Klon allgemein höhere Chemokinkonzentrationen induziert, wurde zusätzlich Cxcl10 im Aszites gemessen, das normalerweise ähnlichen Regulationsmechanismen wie Cxcl9 unterliegt. Hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen festgestellt (9,8 vs. 11,0 pg/ml pro mg/ml

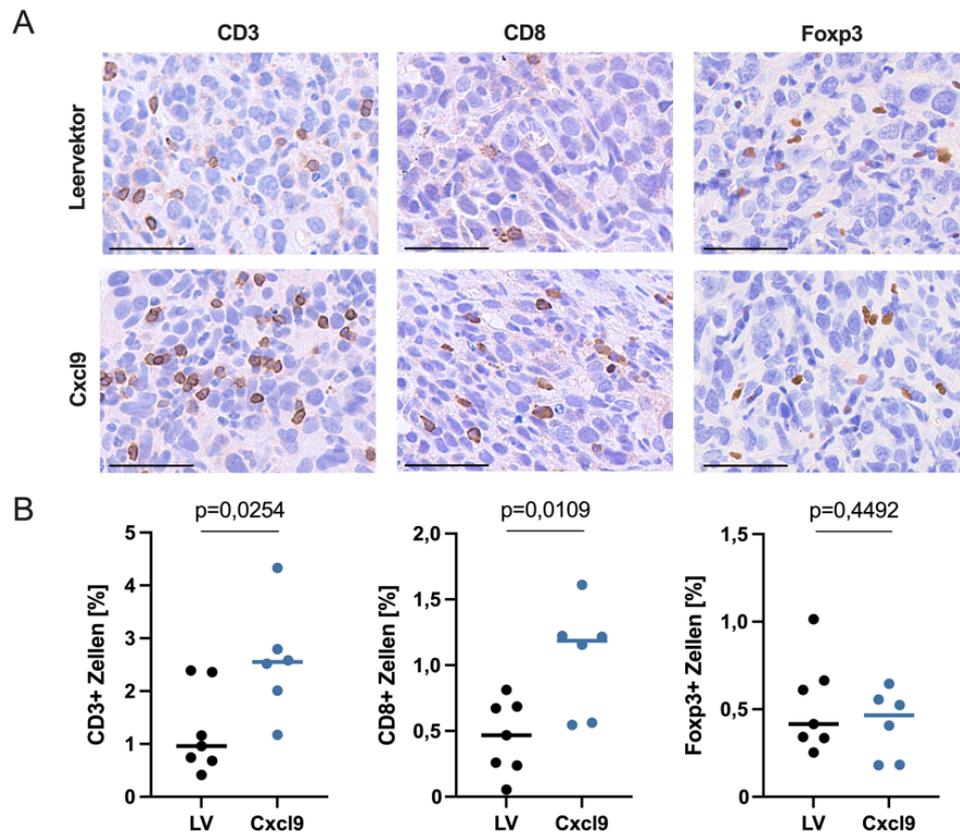


Abbildung 16: Cxcl9 erhöht die Infiltration zytotoxischer T-Zellen im *Brca2*-nicht mutierten ID8-Ovarialkarzinommodell

A) Beispielfotos zur immunohistochemischen Färbung auf CD3⁺ T-Lymphozyten, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen (Balkenlänge 50 µm). **B)** Zugehörige digitale Auswertung der positiven Zellen mit Angabe als Prozent aller Zellen im Tumor. Jeder Punkt stellt den Mittelwert eines Tumorgewebes mit fünf ausgewerteten Regionen dar. Innerhalb einer Gruppe ist der Median gezeigt. Statistischer Vergleich mittels T-Test.

Zusätzlich zu den tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten wurden natürliche Killerzellen durch eine CD49b-Färbung detektiert und ausgezählt (Abbildung 17). Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der LV- und Cxcl9-Gruppe (1,87% vs. 1,61% CD49b⁺ Zellen; $p=0,7833$). Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist der Anteil an Makrophagen im Tumormilieu des humanen Ovarialkarzinoms sehr hoch. Dieser Phänotyp zeigte sich mit über 60% F4/80-positiver Zellen auch in dem hier verwendeten Mausmodell. Im Vergleich zur LV-Gruppe war die Anzahl an F4/80-positiven Makrophagen in der Cxcl9-Gruppe signifikant niedriger (74,5% zu 60,2% F4/80⁺ Zellen; $p=0,0419$). Der Proliferationsmarker Ki67 zeigte passend zu den in Abbildung 11 dargestellten *in vitro* Daten auch *in vivo*, dass es keinen signifikanten intratumoralen Proliferationsunterschied zwischen beiden Gruppen gibt (30,6% vs. 32,6% Ki67⁺ Zellen; $p=0,5206$).

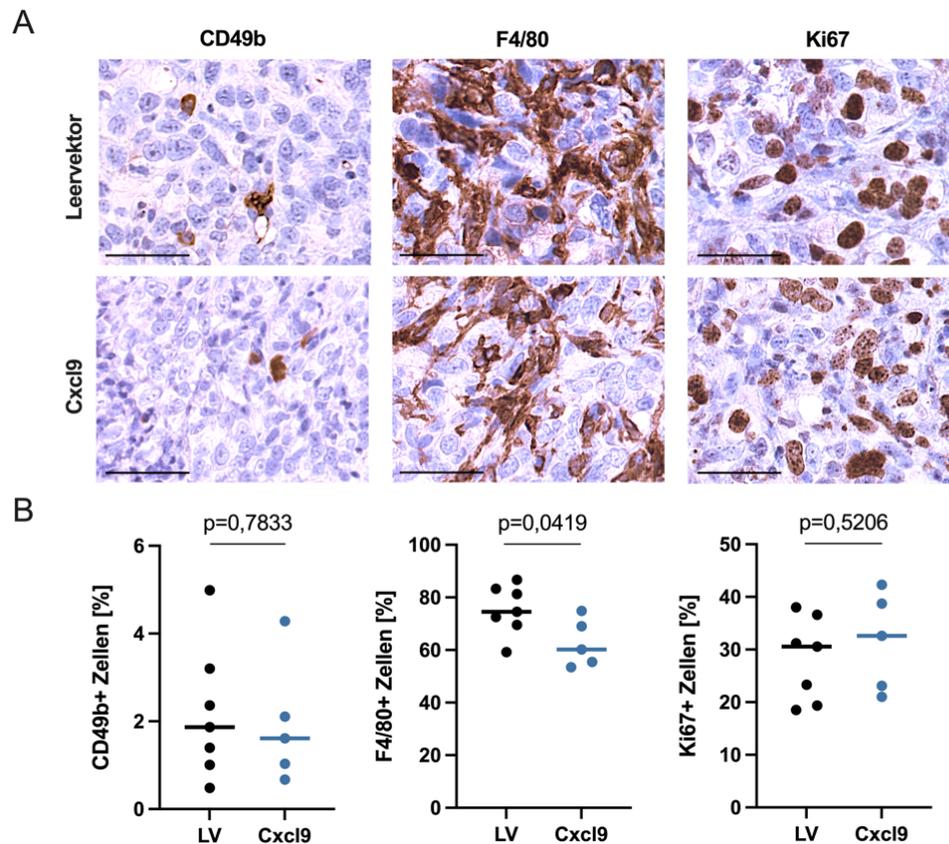


Abbildung 17: Cxcl9 senkt die Infiltration F4/80-positiver Makrophagen im *Brca2*-nicht mutierten ID8-Ovarialkarzinommodell **A)** Beispielfotos zur immunhistochemischen Färbung CD49b-positiver natürlicher Killerzellen, F4/80-positiver Makrophagen und Ki67-positiver, proliferierender Tumorzellen (Balkenlänge 50 μ m). **B)** Zugehörige digitale Auswertung der positiven Zellen mit Angabe als Prozent aller Zellen im Tumor. Jeder Punkt stellt den Mittelwert eines Tumorgewebes mit fünf ausgewerteten Regionen dar. Innerhalb einer Gruppe ist der Median gezeigt. Statistischer Vergleich mittels T-Test.

Die *Heatmap* in Abbildung 18 veranschaulicht, dass die Parameter Gesamtüberleben, Cxcl9 im Aszites und Infiltration von CD3⁺ bzw. CD8⁺ Zellen positiv miteinander korrelieren. Im Vergleich zum Gesamtüberleben ergaben sich Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,67 für Cxcl9 im Aszites ($p=0,0172$), von 0,71 für die CD3⁺ Infiltration ($p=0,0063$) und von 0,65 für die CD8⁺ Infiltration ($p=0,0171$). Cxcl9 im Aszites korrelierte zudem signifikant mit der CD8⁺ Infiltration ($p=0,0799$). Da die CD8⁺ Population einen Teil der CD3⁺ Population darstellt, korrelierten diese beiden Parameter erwartungsgemäß signifikant mit einem hohen Koeffizienten von 0,83 ($p=0,0005$).

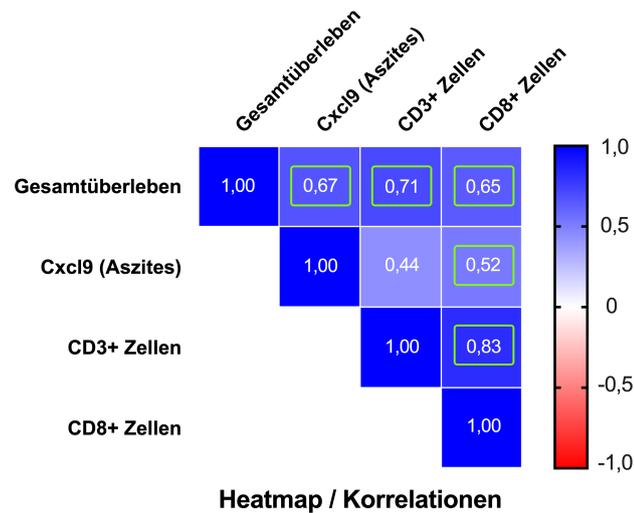


Abbildung 18: *Heatmap*, die die Korrelation von Überlebenszeit, Cxcl9-Konzentration im Aszites und T-zellulärem Infiltrat zeigt.

Signifikante Pearson-Korrelationen ($p < 0,05$) wurden mit einem grünen Rechteck gekennzeichnet.

2.3. Abhängigkeit der Cxcl9-Wirkung vom adaptiven Immunsystem im *Brca2*-Wiltypt Ovarialkarzinommausmodell

Um die Hypothese zu untermauern, dass das verbesserte Überleben durch intratumorales Cxcl9 auf das adaptive Immunsystem zurückzuführen ist, wurde die intraperitoneale Inokulation von 1×10^7 ID8Trp53^{-/-}Cxcl9 oder ID8Trp53^{-/-}Leervektor-Zellen in immunkompromittierten athymischen Nacktmäusen (*athymic nude*) wiederholt, die über keine ausgereiften T-Zellen verfügen. Die ID8-Zellen bildeten in zum C57BL/6-Modell vergleichbarer Zeit ähnliche phänotypische Merkmale in der Metastasierung der Bauchhöhle aus (Abbildung 19).

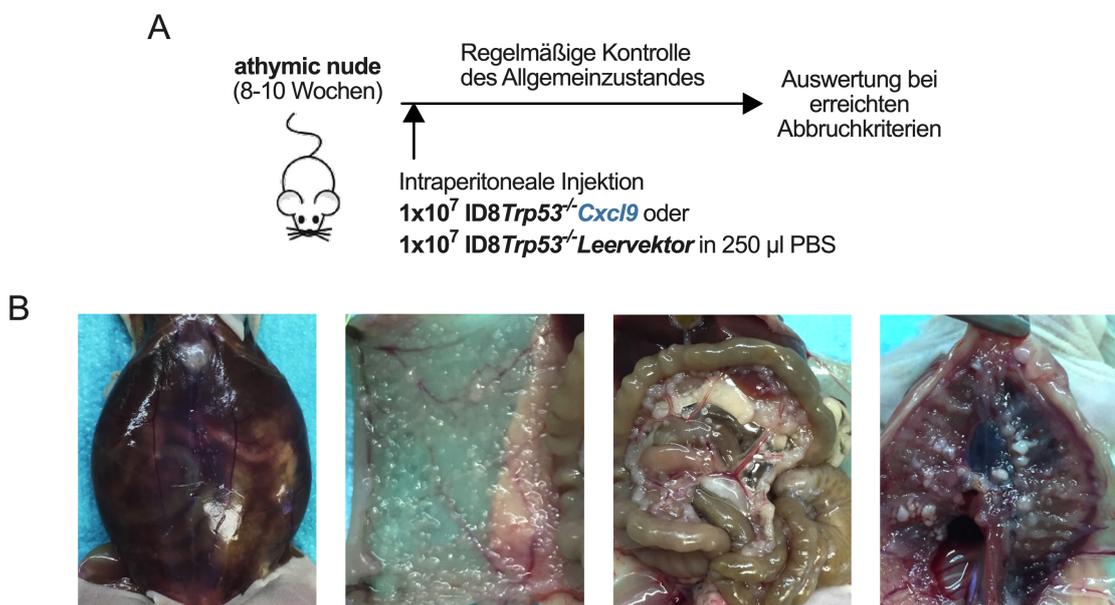


Abbildung 19: Immunkompromittiertes Mausmodell zur Untersuchung der Abhängigkeit Cxcl9-vermittelter Effekte vom adaptiven Immunsystem A) Versuchsaufbau mit sieben *athymic nude* Mäusen pro Gruppe. B) Beispielfotos nach Erreichen der Abbruchkriterien mit hämorrhagischem Aszites und Tumorknoten in Peritoneum, Mesenterium und Zwerchfell.

2.3.1. Überlebenszeiten

Beim immunkompromittierten Modell wurde im Vergleich zum immunkompetenten Modell bereits sechs Tage früher (Tag 31) die erste Maus mit Aszitesbildung dokumentiert. Bei drei Mäusen in der LV-Gruppe wurde eine Metastasierung ohne Aszitesbildung festgestellt. Der Median der Aszitesbildung bei der LV-Gruppe ergab einen nicht signifikanten Unterschied von 53 Tagen im Vergleich zur Cxcl9-Gruppe mit 42 Tagen ($p=0,1122$). Im Gesamtüberleben zeigte sich noch eindrucksvoller, dass der positive Cxcl9-Effekt auf das Überleben ohne die Beteiligung des adaptiven Immunsystems verloren geht. Das mediane Überleben beider Gruppen lag bei Tag 50 ($p=0,56$).

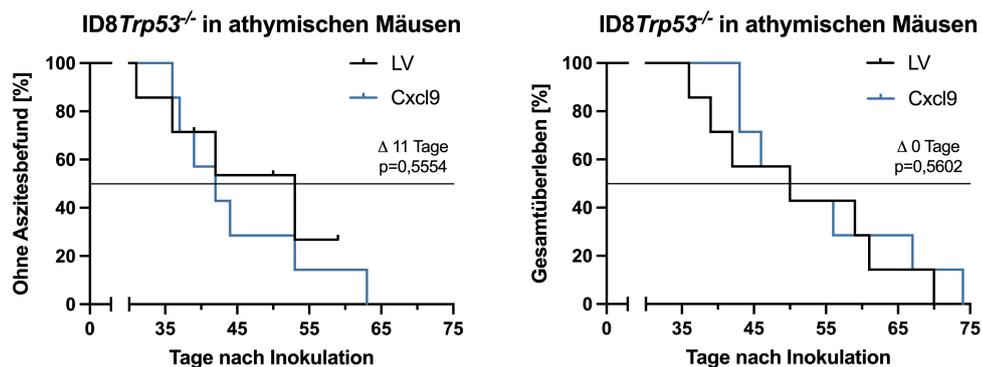


Abbildung 20: Cxcl9 hat keinen Effekt auf das Überleben im immunkompromittierten Tiermodell.

Kaplan-Meier-Kurven zur Aszitesbildung (links) und zum Gesamtüberleben (rechts). Log-Rank-Signifikanztest.

2.3.2. Expressionsanalysen und Immunzellpopulationen im Tumor

Die intratumorale Cxcl9-Überexpression übersetzte sich auch im immunkompromittierten Modell auf eine signifikant erhöhte Cxcl9-Konzentration im Aszites der Versuchstiere (0,1 vs. 2,1 pg/ml pro mg/ml Gesamtprotein im Vergleich zwischen LV- und Cxcl9-Gruppe; $p=0,013$). Immunhistochemisch fiel der mediane Anteil CD3-positiver Zellen im Tumor innerhalb der Cxcl9-Gruppen von 2,55% im immunkompetenten Modell auf 1,13% in den athymischen Tieren. Es ergab sich somit kein Unterschied mehr zur LV-Gruppe (0,98% CD3⁺ Zellen; $p=0,29$). Dass immer noch ein geringer Prozentsatz CD3-positiver Zellen vorhanden ist, lässt sich dadurch

erklären, dass vereinzelte CD3-Lymphozyten extrathymisch reifen können und somit auch in *athymic nude* Mäusen zu finden sind (Kennedy et al., 1992).

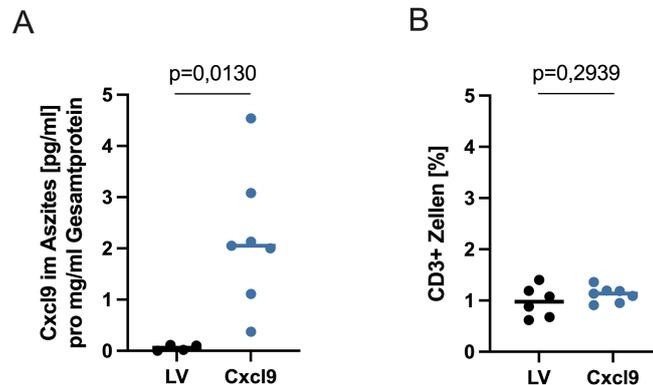


Abbildung 21: Cxcl9-Überexpression im Aszites athymischer, tumortragender Versuchstiere

A) Cxcl9-Konzentration im Aszites, gemessen mittels ELISA und normalisiert auf das Gesamtprotein im Aszites mittels Bradford Assay. **B)** Digitale Auswertung der immunhistochemischen CD3-Färbung (T-Lymphozyten). Jeder Punkt stellt den Mittelwert zur Auswertung eines Tumorgewebes dar. Innerhalb einer Gruppe ist der Median gezeigt. Signifikanztestung durch T-Test.

2.4. Einfluss von Cxcl9 auf Tumorwachstum, Überleben und Immuninfiltration im *Brca2*-defizienten Ovarialkarzinommodell

Wie in der Einleitung unter Punkt III.1.2 bereits erläutert wurde, beläuft sich das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken bei einer BRCA2-Mutation auf etwas über 10% (Kiechle et al., 2014; Tinelli et al., 2010). Um die Rolle von Cxcl9 auch im HR-defizienten Ovarialkarzinom untersuchen zu können, wurden ID8*Trp53*^{-/-}*Brca2*^{-/-} Zellen (Walton et al., 2016) lentiviral mit Cxcl9 transduziert. Ausgewählte Klone (in Kurzform *Brca2/Cxcl9* und *Brca2/LV* genannt) wurden nach dem folgenden Schema mit einer Zellzahl von 1×10^7 intraperitoneal in jeweils sieben weibliche C57BL/6 Mäuse inokuliert (Abbildung 22).

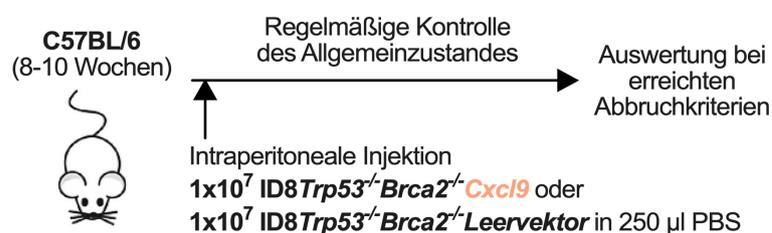


Abbildung 22: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Rolle von Cxcl9 im syngenem, *Brca2*-defizienten Ovarialkarzinommodell.

2.4.1. Überlebenszeiten

Im Vergleich zur 14 Tage verlängerten medianen Aszitesbildung in der Cxcl9-Gruppe im *Brca2*-Wildtyp Modell, verkürzte sich der Cxcl9-Effekt im *Brca2*-Knockout-Modell auf 4 Tage Unterschied und war nicht mehr signifikant (32 Tage *Brca2*/LV vs. 36 Tage *Brca2*/Cxcl9; $p=0,15$). Auch beim Gesamtüberleben wurde ein nicht signifikanter Unterschied von 4 Tagen im Median festgestellt (44 Tage *Brca2*/LV zu 48 Tage *Brca2*/Cxcl9; $p=0,2204$). Die *Brca2*/LV-Gruppe bestand aus einer Maus weniger, da hier die Tumorzellen nicht angewachsen waren.

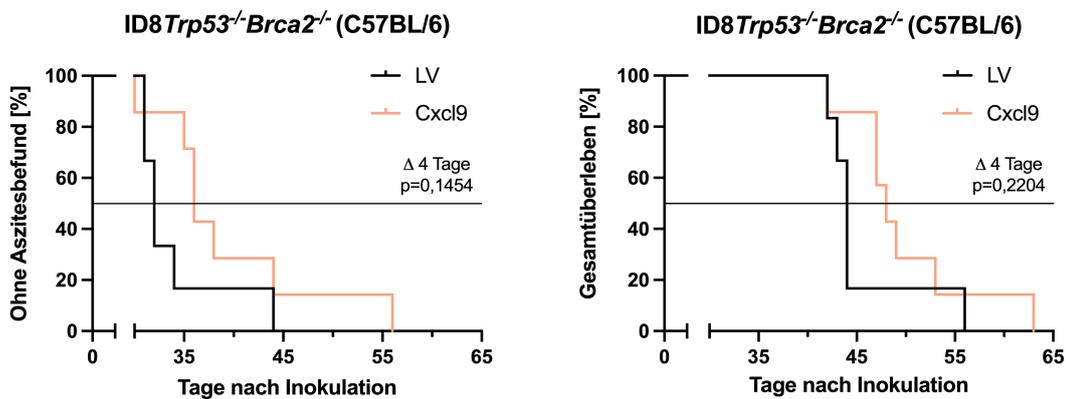


Abbildung 23: Cxcl9 verliert den signifikanten, tumor-suppressiven Effekt im *Brca2*-deizienten Ovarialkarzinommausmodell

Kaplan-Meier-Kurven zur Aszitesbildung (links) und zum Gesamtüberleben (rechts). Log-Rank-Signifikanztest.

2.4.2. Expressionsanalysen und intratumorale Immunzellpopulationen

Auch im *Brca2*-defizienten Modell konnte die intratumorale Cxcl9-Überexpression im Aszites nachgewiesen werden. Die Werte lagen vergleichbar zum *Brca2*-Wildtyp-Modell bei einer medianen Cxcl9-Konzentration von 1,6 pg/ml pro mg/ml Gesamtprotein in der *Brca2*/LV-Gruppe und bei 3,0 pg/ml pro mg/ml Gesamtprotein in der *Brca2*/Cxcl9-Gruppe ($p=0,0400$). Bei der Cxcl10-Messung wurde kein signifikanter Unterschied zwischen *Brca2*/LV und *Brca2*/Cxcl9 im Aszites festgestellt (24 vs. 39 pg/ml pro mg/ml Gesamtprotein; $p=0,29$). Anzumerken ist allerdings, dass die absoluten Werte der Cxcl10-Konzentration im *Brca2*-Knockout-Modell doppelt so hoch waren wie die im *Brca2*-Wildtyp-Modell.

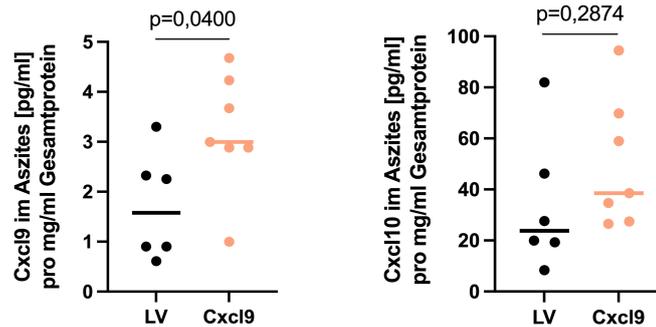


Abbildung 24: Cxcl9-Überexpression im Aszites von Mäusen mit *Brca2*-defizienten Tumoren

Cxcl9-Konzentration (links) und Cxcl10-Konzentration (rechts) im Aszites, gemessen mittels ELISA und normalisiert auf das Gesamtprotein im Aszites mittels Bradford Assay. Signifikanztestung durch T-Test.

Im Gegensatz zur verbesserten T-Zell-Infiltration durch Cxcl9 im *Brca2*-Wildtyp-Modell konnte bei den *Brca2*-Knockout-Tumoren kein positiver Effekt mehr nachgewiesen werden (Abbildung 25). Der Anteil an CD3-positiven Zellen lag bei 4,2% in der *Brca2*/LV-Gruppe und bei 2,7% in der *Brca2*/Cxcl9-Gruppe ($p=0,10$). Für CD8 waren es 0,97% in der *Brca2*/LV-Gruppe und 0,5% in der *Brca2*/Cxcl9-Gruppe ($p=0,10$). Auch bei den F4/80-positiven Makrophagen (52% vs. 54%; $p=0,96$) und beim Ki67-Proliferationsstatus (30% vs. 32%; $p=0,50$) gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Leervektor und Cxcl9-Überexpression.

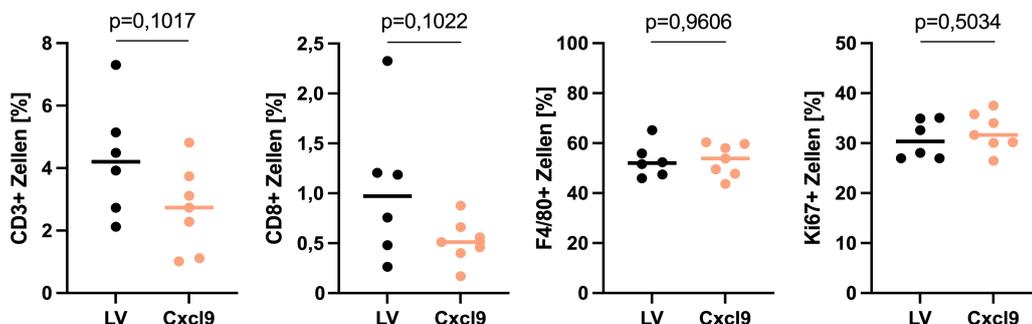


Abbildung 25: Cxcl9 verursacht keine verbesserte T-Zell-Infiltration im *Brca2*-defizienten ID8-Ovariakarzinommausmodell

Digitale Auswertung der immunhistochemischen Färbung CD3-positiver T-Lymphozyten, CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen, F4/80-positiver Makrophagen und proliferierender Zellen (Ki67). Jeder Punkt stellt den Mittelwert zur Auswertung eines Tumorgewebes dar. Innerhalb einer Gruppe ist der Median gezeigt. Statistischer Vergleich mittels T-Test.

Im Gegensatz zu den in Abbildung 18 dargestellten positiven Korrelationen im *Brca2*-Wildtyp-Modell konnten im *Brca2*-defizienten Modell keine signifikanten Korrelationen zwischen Gesamtüberleben und Cxcl9 im Aszites ($r=0,31$), CD3⁺ T-

Zellen ($r=-0,09$) oder $CD8^+$ T-Zellen ($r=-0,03$) beobachtet werden. Als eine gewisse Positivkontrolle zeigte sich eine gute Korrelation zwischen CD3- und CD8-Infiltration (Pearson Korrelationskoeffizient $0,75$; $p=0,003$; Abbildung 26).

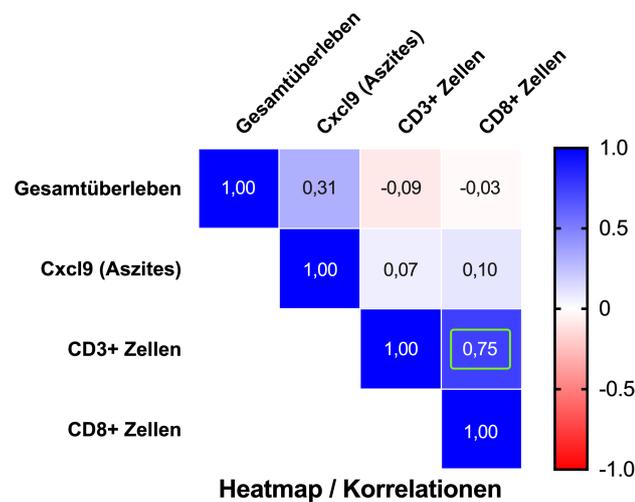


Abbildung 26: Im *Brca2*-defizienten Ovarialkarzinommodell zeigen sich keine signifikanten Korrelationen zwischen Gesamtüberleben, Cxcl9-Konzentration und TILs.

Heatmap mit Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen Gesamtüberleben, Cxcl9-Konzentration im Aszites und CD3- bzw. CD8-positiven Zellen. Signifikante Korrelationen sind mit einem grünen Rechteck gekennzeichnet ($p<0,05$).

2.5. Einfluss von Cxcl9 auf die Wirkung einer anti-PD-L1-Therapie im *Brca2*-Wildtyp-Ovarialkarzinommausmodell

Wie in der Einleitung unter Punkt III.2.4 bereits angesprochen wurde, konnte in klinischen Studien bis dato kein Überlebensvorteil durch Immuncheckpoint-Inhibition beim Ovarialkarzinom erreicht werden. Im Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom wurde hingegen gezeigt, dass Tumore mit bereits infiltrierten Lymphozyten eher auf eine Immuncheckpoint-Blockade ansprechen (Thommen et al., 2018). Die folgenden murinen Experimente sollten daher prüfen, ob eine intratumorale Cxcl9-Überexpression mit einhergehender TIL-Infiltration ausreichen könnte, um ein (additiv) verbessertes Überleben in der Kombination mit anti-PD-L1 Therapie zu erwirken. Bei folgenden vier Therapiearmen wurden je sieben weibliche C57BL/6-Mäuse intraperitoneal mit 1×10^7 Zellen inokuliert: 1) Cxcl9-Überexpression mit anti-PD-L1-Therapie; 2) Cxcl9-Überexpression mit Isotyp-Kontrolle; 3) Leervektor-Gruppe mit anti-PD-L1-Therapie und 4) Leervektor-Gruppe mit Isotyp-Kontrolle (siehe Abbildung 27). Die intraperitoneal verabreichte anti-PD-L1-Therapie wurde mit $200 \mu\text{g}$ in $100 \mu\text{l}$ zweimal die Woche ab Tag 30 nach der Tumorzellinokulation gestartet und bis zum Erreichen

der Abbruchkriterien fortgeführt.

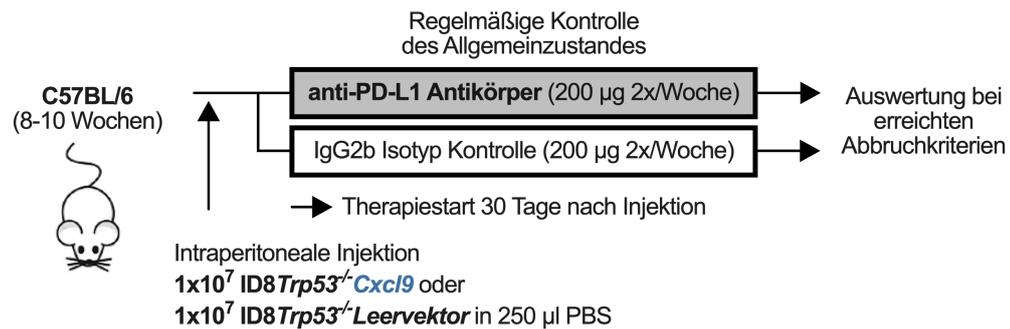


Abbildung 27: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Cxcl9-Wirkung auf den Erfolg einer anti-PD-L1-Therapie im syngenem *Brca*-Wildtyp-Ovarialkarzinommausmodell

Erläuterung des intraperitonealen Inokulationsschemas mit sieben C57BL/6 Mäusen pro Gruppe und 1×10^7 Zellen in 250 µl PBS. Ab Tag 30 nach Inokulation wurde zweimal die Woche intraperitoneal mit 200 µg anti-PD-L1 oder Isotyp Kontrolle therapiert.

2.5.1. Überlebenszeiten

Passend zu dem in Abbildung 14 gezeigten Experiment konnte der protektive Effekt von Cxcl9 auf die Zeit bis zur ersten Aszitesbildung reproduziert werden (38 vs. 45 Tage; $p=0,0011$), ebenso hinsichtlich des Gesamtüberlebens (44 vs. 52 Tage; $p=0,0072$) (siehe Abbildung 28). In den Leervektor-Tumoren hatte die anti-PD-L1-Therapie weder einen Einfluss auf die Aszitesbildung (Median beider Kurven an Tag 38; $p=0,2202$), noch auf das Gesamtüberleben Überleben (44 Tage ohne Therapie vs. 49 Tage mit Therapie; $p=0,33$). Im Gegensatz dazu konnte innerhalb der Cxcl9-Gruppe gezeigt werden, dass eine anti-PD-L1-Therapie die Aszitesbildung im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle um sechs Tage verzögert (45 vs. 51 Tage; $p=0,0031$). Ein vergleichbarer Effekt wurde auch beim Gesamtüberleben verzeichnet (52 vs. 57 Tage; $p=0,0007$). Eine Maus aus der Cxcl9-PD-L1-Gruppe überlebte das festgelegte Ende des Experiments und wurde daher zensiert dargestellt.

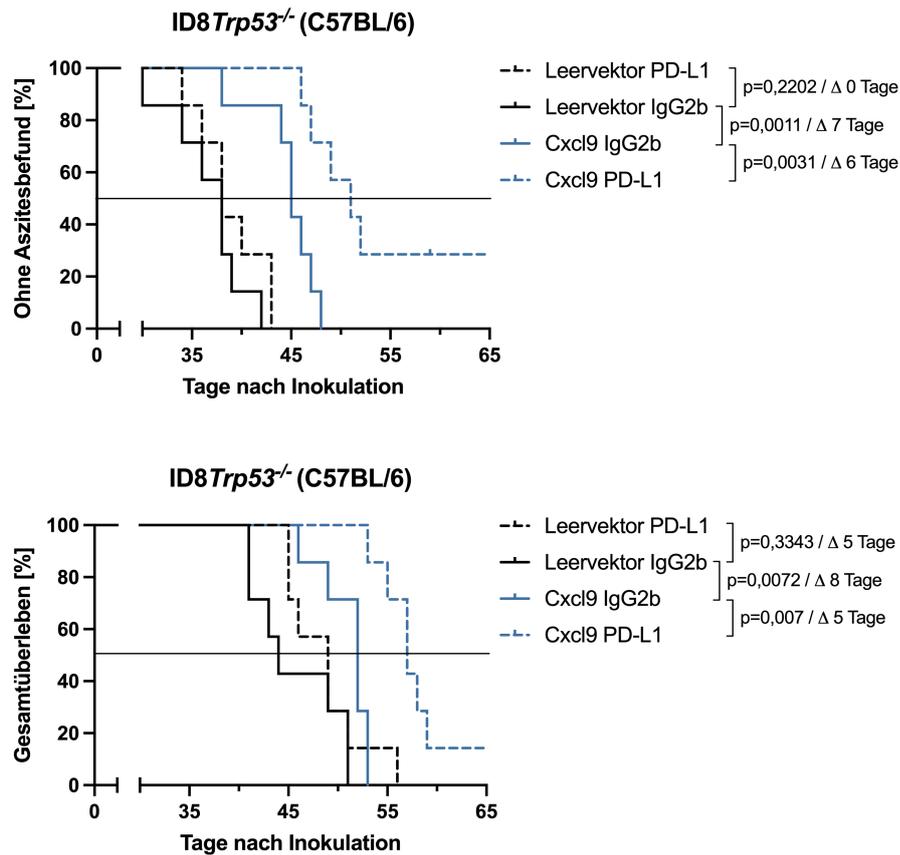


Abbildung 28: Cxcl9-Überexpression ermöglicht eine erfolgreiche Immuncheckpoint-Therapie (anti-PD-L1) im syngenem, *Brca*-Wildtyp-Ovarialkarzinommmausmodell

Kaplan-Meier-Kurven zur Aszitesbildung (oben) und zum Gesamtüberleben (unten). Log-Rank-Signifikanztest.

2.5.2. Expressionsanalysen und Immunzellpopulationen

Im Aszites der Mäuse aus der Cxcl9-Gruppe (mit und ohne anti-PD-L1-Therapie) konnte eine 3,2-fach höhere Cxcl9-Konzentration gemessen werden als in der LV-Gruppe (1,45 vs. 4,59 pg/ml pro mg/ml Gesamtprotein; $p=0,0496$). Im Gegensatz dazu gab es keinen Unterschied in der Cxcl10-Asziteskonzentration (Median 6,1 zu 6,6 pg/ml pro mg/ml Gesamtprotein; $p=0,5477$).

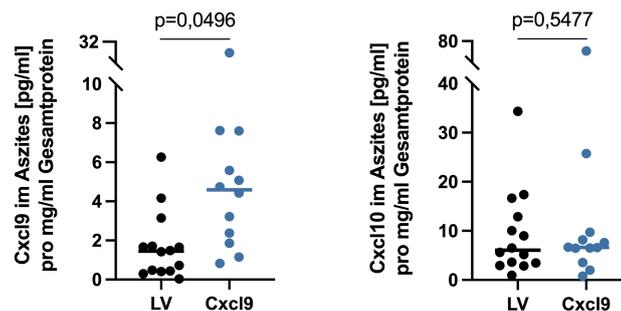


Abbildung 29: Cxcl9 und Cxcl10 im Aszites von *Brca2*-Wildtyp-tumortragenden Mäusen

Cxcl9-Konzentration (links) und Cxcl10-Konzentration (rechts) im Aszites; gemessen durch ELISA und normalisiert auf das Gesamtprotein im Aszites mittels Bradford Assay. Signifikanztestung durch T-Test.

In der immunhistochemischen Auswertung der T-Lymphozyten konnte in den Gruppen ohne anti-PD-L1-Therapie ein signifikanter Anstieg der CD3-positiven Zellen (2,1% vs. 4,0%; $p=0,0265$) und CD8-positiven Zellen (0,8% vs. 1,6%; $p<0,0001$) durch Cxcl9 im Vergleich zum Leervektor reproduziert werden (Abbildung 30). Dieser Effekt ging unter anti-PD-L1-Therapie jedoch verloren, die Mediane näherten sich mit 2,0% vs. 2,2 % CD3-positiven Zellen und 0,6% zu 0,8% CD8-positiven Zellen (LV- vs. Cxcl9-Gruppe) wieder an ($p=0,7840$ für CD3 bzw. $p=0,3693$ für CD8). Bei der Analyse der Foxp3-positiven regulatorischen T-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen festgestellt werden.

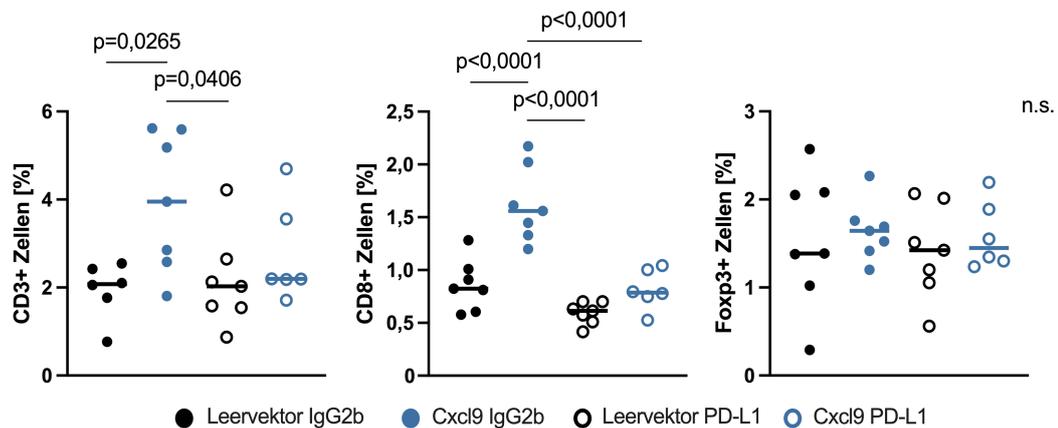


Abbildung 30: Erhöhte Infiltration zytotoxischer T-Zellen durch Cxcl9 flacht unter anti-PD-L1-Therapie ab.

Digitale Auswertung der immunhistochemischen Färbung von CD3⁺ T-Lymphozyten, CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen. Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte unter 0,05 wurden im Diagramm dargestellt.

In weiteren immunhistochemischen Analysen wurden Granzym B-positive Immunzellen (a.e. zytotoxische NK-Zellen und T-Zellen), F4/80-positive Makrophagen, sowie PD-1-positive Zellen (a.e. aktivierte B-Zellen, T-Zellen und Monozyten) untersucht. Wie in Abbildung 31 gezeigt, gab es jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen. Die Mediane reihten sich zwischen 0,6% und 0,9% Granzym B-positiven Zellen, zwischen 60% und 68% F4/80-positiven Zellen, sowie zwischen 9,4% und 11,8% PD-1-positiven Zellen ein. Bezüglich der Analyse des Proliferations-Markers Ki67 zeigte sich, dass die anti-PD-L1-Therapie die intratumorale Proliferation hemmt. Innerhalb der Cxcl9-Gruppe war dies ein signifikanter Effekt mit

30% vs. 15% Ki67-positiver Zellen (IgG2b vs. PD-L1; $p=0,0023$) und innerhalb der Leervektor-Gruppe war es ein Trend mit 27 vs. 19 % (IgG2b vs. PD-L1; $p=0,0788$).

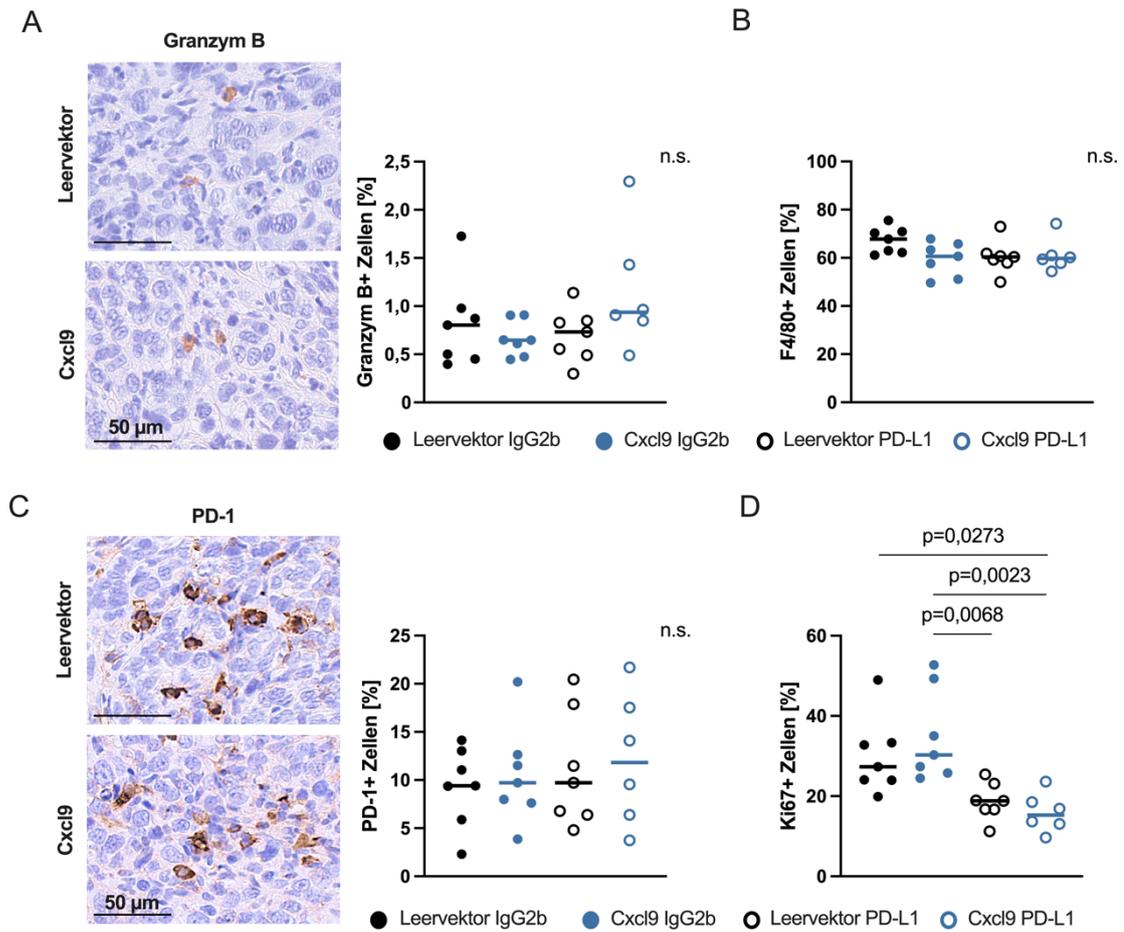


Abbildung 31: Anti-PD-L1-Therapie senkt den intratumoralen Proliferationsstatus im *Brca2*-nicht defizienten Ovarialkarzinommausmodell

Digitale Auswertung der immunhistochemischen Färbung von **A)** Granzym B⁺ Immunzellen, **B)** F4/80⁺ Makrophagen, **C)** PD-1⁺ Immunzellen, und **D)** Ki67⁺ proliferierenden Zellen. Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte unter 0,05 wurden im Diagramm dargestellt.

2.6. Einfluss von Cxcl9 im *Brca2*-defizienten Ovarialkarzinommausmodell mit anti-PD-L1-Therapie

Um zu testen, ob eine Immuncheckpoint-Inhibition mit anti-PD-L1 einen Überlebensvorteil im *Brca2*-defizienten Mausmodell erwirken kann, wurde die Therapie nach dem in Abbildung 32 gezeigten Schema mit ID8 $Trp53^{-/-}Brca2^{-/-}Cxcl9$ - oder Leervektor-Zellen durchgeführt.

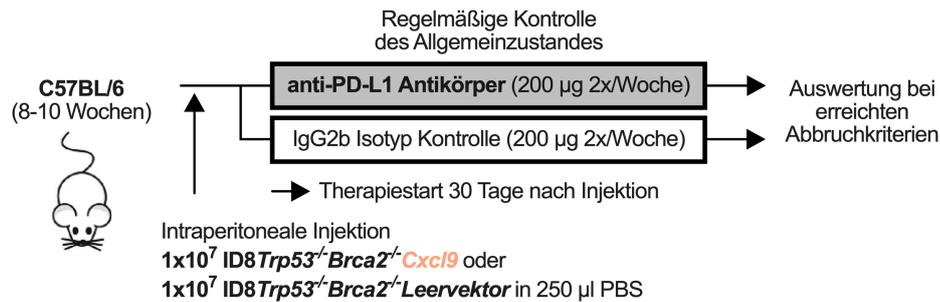


Abbildung 32: Versuchsschema zur Untersuchung des Einflusses einer Cxcl9-Überexpression auf die anti-PD-L1-Therapie im syngenem, *Brca2*-defizienten Ovarialkarzinommausmodell

Intraperitoneales Inokulationsschema mit sieben C57BL/6-Mäusen pro Gruppe und 1×10^7 Zellen in 250 µl PBS. Ab Tag 30 nach der Inokulation wurde zweimal pro Woche intraperitoneal mit 200 µg anti-PD-L1 oder Isotyp-Kontrolle therapiert.

2.6.1. Überlebenszeiten

Die Aszitesbildungs- und Überlebensdaten ohne anti-PD-L1 Therapie reproduzierten das in Abbildung 23 dargestellte Ergebnis, dass eine Cxcl9-Überexpression im *Brca2*-defizienten Modell zu keinem Überlebensvorteil führt. Der mediane Unterschied wurde zwar durch Cxcl9 in der Aszitesbildung auf sieben Tage und im Gesamtüberleben auf neun Tage angehoben, doch war dies in beiden Fällen nicht statistisch signifikant (40 vs. 47 Tage in der Aszitesbildung; $p=0,39$ und 45 vs. 54 Tage beim Gesamtüberleben; $p=0,26$). Die anti-PD-L1-Therapie konnte weder innerhalb der Leervektor-Gruppe noch innerhalb der Cxcl9-Gruppe signifikante Effekte erwirken und steht somit im Gegensatz zum additiven Überlebensvorteil der Cxcl9/anti-PD-L1-Kombination im *Brca2*-Wildtyp-Modell (s.o.). Das mediane Gesamtüberleben wurde im vorliegenden Mausexperiment durch die anti-PD-L1-Therapie in der Leervektor-Gruppe um zwei Tage ($p=0,70$) und in der Cxcl9-Gruppe um einen Tag ($p=0,52$) verlängert (Abbildung 33). Da bei einigen Tieren die Tumorzellen nicht angewachsen waren, bestehen die Überlebenskurven aus folgenden Fallzahlen: Leervektor IgG2b $n=7$; Leervektor PD-L1 $n=4$; Cxcl9 IgG2b $n=5$; Cxcl9 PD-L1 $n=6$.

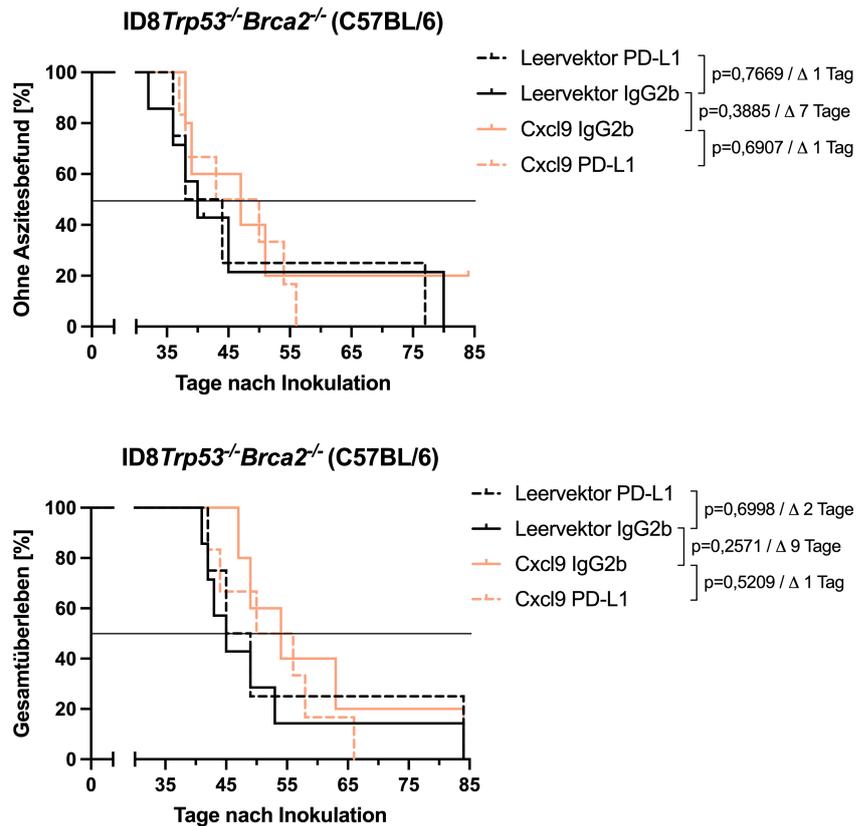


Abbildung 33: Immuncheckpoint-Therapie mit anti-PD-L1 zeigt keinen signifikanten Überlebensvorteil im *Brca2*-defizienten Ovarialkarzinommodell

Kaplan-Meier-Kurven zur Aszitesbildung (oben) und zum Gesamtüberleben (unten). Log-Rank-Signifikanztest.

2.6.2. Expressionsanalysen und Immunzellpopulationen

Im Aszites der Mäuse (mit und ohne anti-PD-L1-Therapie pro Klon zusammengefasst) konnte kein signifikanter Unterschied in der Cxcl9-Konzentration (2,8 vs. 2,0 pg/ml pro mg/ml Gesamtprotein im Vergleich von LV- zu Cxcl9-Gruppe; $p=0,83$) oder in der Cxcl10-Konzentration (63 vs. 39 pg/ml pro mg/ml Gesamtprotein im Vergleich von LV- zu Cxcl9-Gruppe; $p=0,22$) festgestellt werden (siehe Abbildung 34).

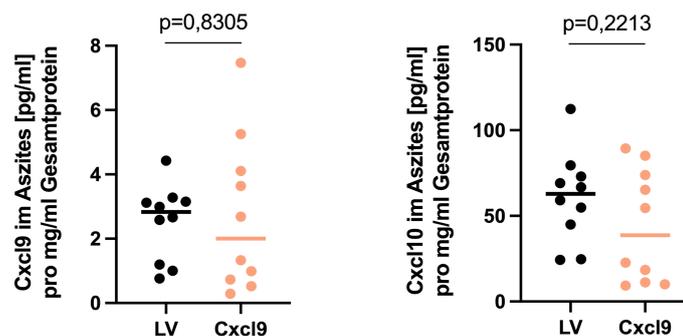


Abbildung 34: Cxcl9- und Cxcl10-Konzentrationen im Aszites von Mäusen aus anti-

PD-L1/Placebo-behandelten, *Brca2*^{-/-}-tumortragenden Mäusen

Cxcl9-Konzentration (links) und Cxcl10-Konzentration (rechts) im Aszites; gemessen durch ELISA und normalisiert auf das Gesamtprotein im Aszites mittels Bradford Assay. Signifikanztestung durch T-Test.

Bezogen auf die immunhistochemische Auswertung wurde analog zum *Brca2*-Knockout-Experiment unter Punkt VII.2.4.2 festgestellt, dass im Vergleich zur LV-Gruppe eine intratumorale Cxcl9-Überexpression ohne anti-PD-L1-Therapie zu keiner signifikant erhöhten T-Lymphozyten Infiltration führte (3,2% vs. 2,8% CD3-positiver Zellen in LV zu Cxcl9-Gruppe; $p=0,59$). Die anti-PD-L1-therapierte Cxcl9-Gruppe zeigte mit einem Median von 4,4% CD3-positiver Zellen einen nicht signifikanten Trend ($p=0,206$) zu einer höheren Infiltration als in der anti-PD-L1-therapierten Leervektor-Gruppe mit 2,7% (siehe Abbildung 35). Bei den CD8-positiven Zellen gab es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen allen vier Gruppen.

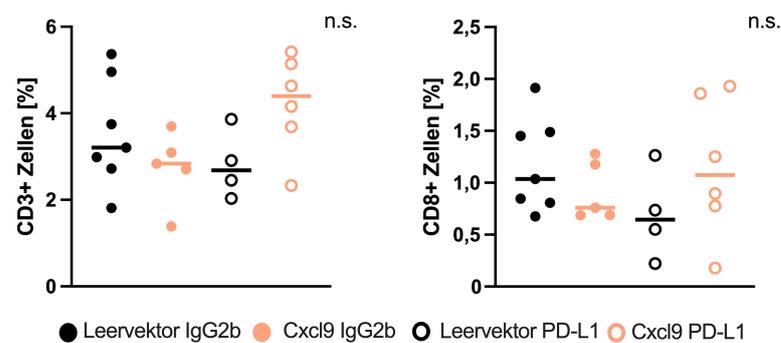


Abbildung 35: Cxcl9 führt zu keiner signifikant verbesserten T-Lymphozyten-Infiltration im *Brca2*-defizienten Ovarialkarzinommausmodell

Digitale Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf CD3⁺ T-Lymphozyten und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons Test.

In der weiteren IHC Analyse wurden PD-1-positive Immunzellen (a.e. aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten) gefärbt und es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt (Abbildung 36). Die medianen Werte lagen zwischen 3,0% und 5,1% PD-1-positiver Zellen. Die Analyse der F4/80-positiven Makrophagen ergab mit Werten knapp unter 60 % keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Gegensatz zu dem Ergebnis, dass die anti-PD-L1-Therapie im *Brca2*-Wildtyp-Modell die Ki67-Expression senkt, wurden im *Brca2*-Knockout-Modell keine signifikanten Unterschiede zu den Isotyp-Kontrollen gemessen (mediane Werte knapp unter 40%). Die Ki67-Analyse stützt somit die in Abbildung 33 dargestellten Daten, in denen kein Überlebensvorteil durch die anti-PD-L1-Therapie erreicht werden konnte.

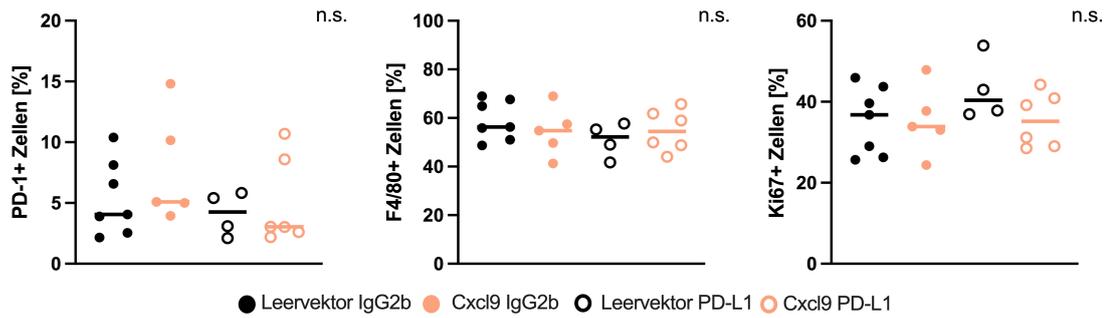


Abbildung 36: Anti-PD-L1-Therapie hat keinen Einfluss auf intratumorale PD-1-, F4/80- oder Ki67-positive Zellen im *Brca2*-Knockout-Modell

Digitale Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf PD-1, F4/80 und Ki67. Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons Test.

2.7. Experimentübergreifende Analysen

Um den Einfluss eines funktionellen *Brca2*-Verlusts auf Chemokinexpression und lymphozytäres Infiltrat zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der oben beschriebenen Experimente zusammengeführt. Da es bei beiden Modellen (*Brca2*-Wildtyp und *Brca2*-Knockout) keinen Unterschied zwischen Leervektor und Cxcl9-Gruppe hinsichtlich der Cxcl10-Asziteskonzentration und der Infiltration PD-1-positiver Zellen gab, wurden die Mäuse dieser zwei Gruppen zusammengefasst. Anti-PD-L1-therapierte Mäuse wurden in der Darstellung ausgeschlossen. Während sich die Cxcl9-Konzentrationen zwischen beiden Modellen in einem vergleichbaren Rahmen bewegten, ergab sich im Vergleich zum Modell mit ID8*Trp53*^{-/-}-Zellen für die ID8*Trp53*^{-/-}*Brca2*^{-/-}-Experimente im Median eine 6,5-fach höhere Cxcl10-Konzentration im Aszites (7,1 vs. 56,2 pg/ml pro mg/ml Gesamtprotein; $p < 0,0001$). Der prozentuale Anteil PD-1-positiver Immunzellen war mit einem Median von 5,0% im *Brca2*-Knockout-Modell signifikant niedriger als mit den *Brca2*-Wildtyp-Zellen (9,6%; $p = 0,044$).

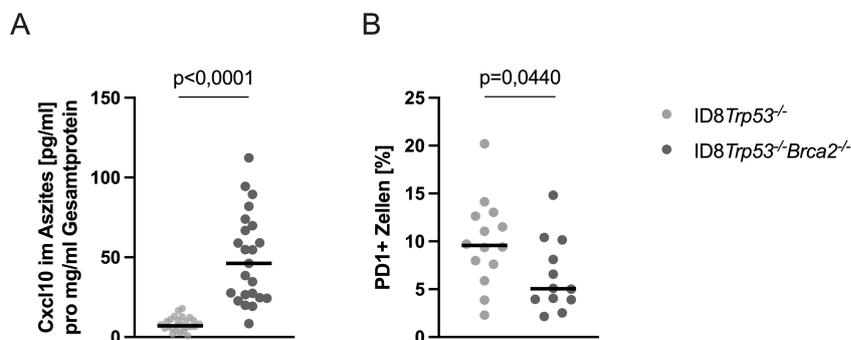


Abbildung 37: Einfluss eines *Brca2*-Verlusts auf die Cxcl10-Asziteskonzentration und den Anteil PD-1-positiver tumorinfiltrierender Immunzellen

A) Cxcl10-Konzentrationen im Aszites; gemessen mit ELISA und normalisiert auf das Gesamtprotein. B)

IHC-Analyse PD-1-positiver Zellen. LV- und Cxcl9-Gruppen aus mehreren Experimenten ohne anti-PD-L1 Therapie wurden zusammengefasst dargestellt. Signifikanztestung mittels T-Test.

Betrachtet man schließlich noch im experimentübergreifenden Vergleich die CD3- und CD8-Analysen unter Ausschluss der anti-PD-L1-therapierten Mäuse, so zeigt sich eine hochsignifikante Steigerung der CD3-Infiltration (1,8% vs. 2,8%; $p=0,0058$) und der CD8-Infiltration (0,7% vs. 1,3%; $p=0,0007$) zwischen Leervektor- und Cxcl9-Gruppe im *Brca2*-Wildtyp-Modell. Im *Brca2*-Knockout-Modell konnten diese Infiltrationen nicht durch Cxcl9 erhöht werden. In den vergleichenden Graphen in Abbildung 38 wird allerdings deutlich, dass der Anteil CD3-positiver Zellen in Tumoren mit ID8*Trp53*^{-/-}*Brca2*^{-/-}-Leervektor-Zellen mit 3,7% bereits signifikant höher war als in den ID8*Trp53*^{-/-}-Leervektor-Tumoren mit 1,8% CD3-positiver Zellen ($p=0,0002$). Bezogen auf die CD8-positiven Zellen war ein vergleichbarer Effekt zu sehen (0,7% beim *Brca2*-Wildtyp zu 1,0% beim *Brca2*-Knockout; $p=0,0462$). Cxcl9-überexprimierende Zellen lagen bei der CD3-Auswertung unabhängig vom *Brca2*-Status mit 2,8% positiven Zellen gleichauf.

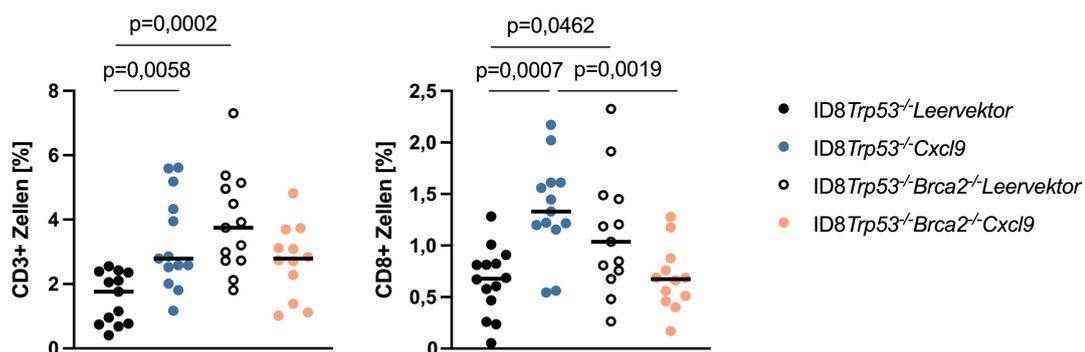


Abbildung 38: Der *Brca2*-Verlust bedingt eine signifikante Erhöhung CD3- bzw. CD8-positiver tumorinfiltrierender Lymphozyten

IHC-Analyse CD3- bzw. CD8-positiver Zellen. Es wurden experimentübergreifend Gruppen ohne anti-PD-L1-Therapie zusammengefügt. Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons Test.

2.8. Einfluss von CXCL9 auf die PD-L1-Expression

Da von Chow und Kollegen 2019 gezeigt wurde, dass das Ansprechen einer anti-PD-L1-Therapie von der intratumoralen Aktivität des CXCR3-Chemokinsystems abhängt (Chow et al., 2019), sollte im Folgenden untersucht werden, ob CXCL9 auf den Tumorzellen die Expression von PD-L1 hochreguliert. Dies war in Harnblasenkarzinomzellen bereits *in vitro* gezeigt worden (Xiu & Luo, 2021) und könnte die Beobachtung einer durch Cxcl9 verbesserten anti-PD-L1-Therapie ebenfalls erklären.

Hierfür wurde zunächst auf RNA-Ebene die PD-L1-Expression verschiedener Klone aus der Cxcl9 Virionen-Transduktion von ID8Trp53^{-/-} und ID8Trp53^{-/-}Brca2^{-/-}-Zellen untersucht. Die qPCR-Analyse ergab keinen Unterschied zwischen Leervektor- und Cxcl9-transduzierten Klonen (p=0,81, Abbildung 39A). Auch im aufgeschlossenen Tumorgewebe aus dem Mausexperiment aus Kapitel VII.2.2, konnte kein Unterschied in der PD-L1-Expression zwischen Leervektor- und Cxcl9-Überexpression im Brca2-Wildtyp-Tumor festgestellt werden (p=0,85, Abbildung 39B).

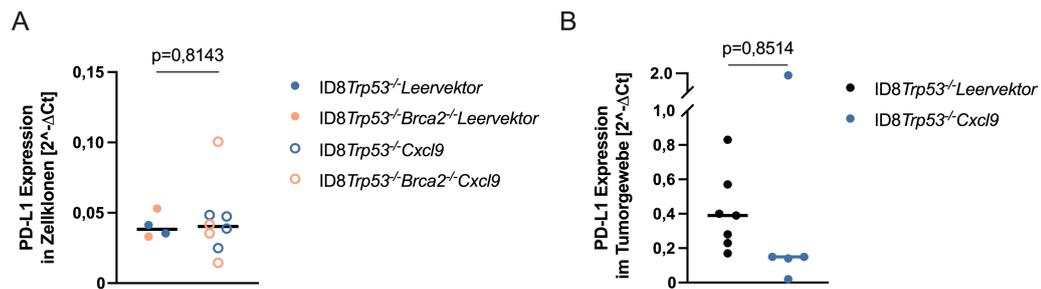


Abbildung 39: Cxcl9-überexprimierende Klone zeigen auf RNA-Ebene keine erhöhte PD-L1-Expression *in vitro* und *in vivo*

Quantitative PCR-Analyse der PD-L1 Expression von **A)** verschiedenen Zellklonen mit ohne Brca2-Knockout bzw. mit und ohne Cxcl9-Überexpression und **B)** murinem Tumorgewebe aus ID8Trp53^{-/-}-Zellen mit und ohne Cxcl9-Überexpression. Statistischer Vergleich mittels T-Test.

Auf Proteinebene wurden im Western Blot Zell-Lysate aus den unter Punkt VII.2.1 beschriebenen Klonen mit und ohne Cxcl9-Überexpression mit oder ohne Brca2-Verlust mit einem anti-PD-L1 Antikörper auf die PD-L1-Expression hin getestet. Eine Cxcl9-Überexpression hatte keinen Einfluss auf die PD-L1-Expression (Abbildung 40A). Auch in den humanen Zelllinien OVCAR-3, OV-MZ-6, CAOV-3 und SKOV-3, hatte eine 72-stündige Stimulation mit 100 ng/ml rekombinantem CXCL9 keinen Einfluss auf die PD-L1-Expression (Abbildung 40B). Wurden die Zellen als Positivkontrolle anstelle von CXCL9 mit 10 ng/ml humanem IFN γ als PD-L1-Induktor (Abiko et al., 2013) stimuliert, so wurden bei jeder Zelllinie deutlich stärkere PD-L1-Banden detektiert (Abbildung 40B).

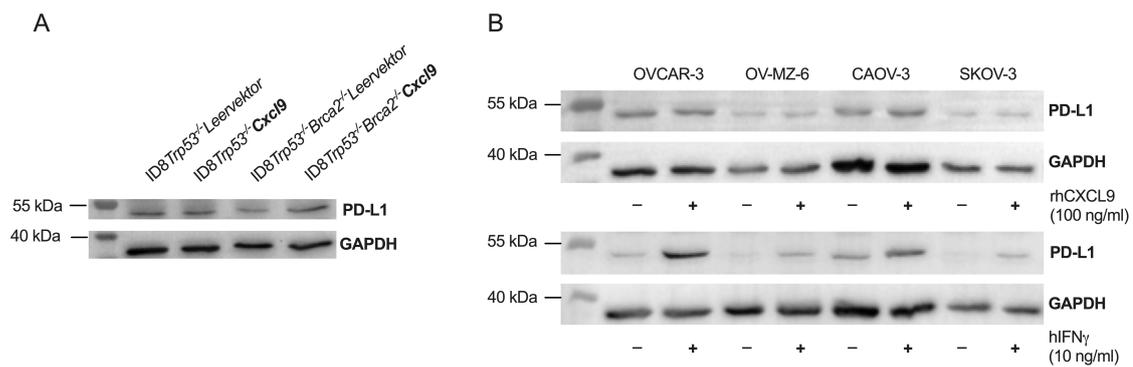


Abbildung 40: Cxcl9 verursacht keine PD-L1-Induktion in murinen oder humanen Ovarialkarzinomzelllinien

Anti-PD-L1 Western Blot-Analyse von Zellklonen mit und ohne Cxcl9-Überexpression (A) und von mit rekombinatem CXCL9 stimulierten humanen Zelllinien (B). Als Positivkontrolle diente die Induktion von PD-L1 durch rekombinantes humanes IFN γ .

3. Expression und Induktion von CX3CL1 im Ovarialkarzinom

3.1. Expression in Ovarialtumoren und peritonealen Metastasen (HGSOC Kollektiv)

Durch eine immunhistochemische Färbung des HGSOC Kollektivs der Frauenklinik der Technischen Universität München sollte erstmals festgestellt werden, ob die Expression von CX3CL1 im Ovarialkarzinom eine prognostische Rolle spielt. *Tissue Microarrays* (TMAs) mit Tumorgewebe wurden wie unter Punkt VI.1.3 beschrieben mit einem anti-CX3CL1-Antikörper gefärbt und die Intensitätsunterschiede digital ausgewertet (siehe VI.1.4). Abbildung 41A zeigt Beispielfotos für eine starke und moderate intratumorale CX3CL1-Färbung. In peritonealen Metastasen (n=126) war signifikant mehr CX3CL1 exprimiert als in omentalen Metastasen (n=122, $p < 0,0001$; Abbildung 41B). Die Analyse des progressionsfreien Überlebens mit Daten von 113 moderat und 78 stark gefärbten Primärtumorproben (Abbildung 41C) ergab ein um 4,5 Monate signifikant verschlechtertes medianes PFS in der CX3CL1-stark exprimierenden Gruppe (20 Monate vs. 15,5 Monate; $p = 0,0229$). Für das Gesamtüberleben ergab sich bei der Auswertung von 130 moderat und 92 stark CX3CL1 exprimierenden Primärtumoren ein signifikanter medianer Überlebensnachteil von 17 Monaten für die stark exprimierende Gruppe (49 Monate vs. 32 Monate; $p = 0,0186$). Die Höhe der CX3CL1 Expression im Primärtumor korrelierte dabei weder signifikant mit der zugehörigen Expression in Peritoneum-Metastasen ($r = -0,09$; $p = 0,355$; $n = 110$) noch mit der Expression in Omentum-Metastasen ($r = 0,17$; $p = 0,082$; $n = 108$).

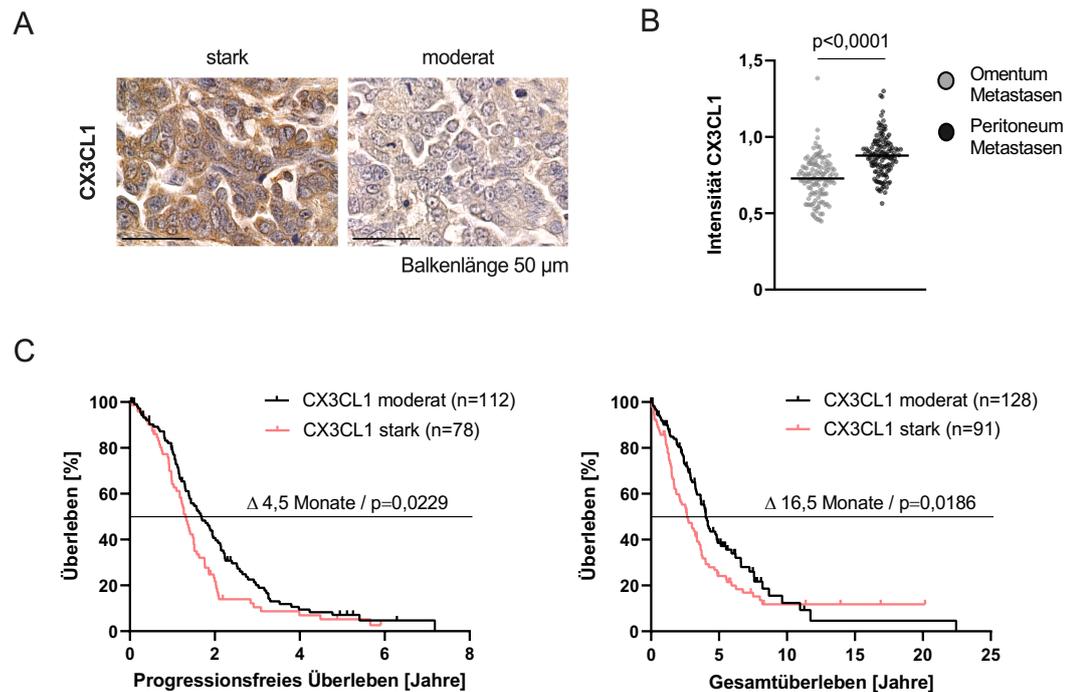


Abbildung 41: CX3CL1 ist im HGSOC-Kollektiv mit einem signifikant schlechteren PFS und OS vergesellschaftet

A) Beispielfotos der immunhistochemischen CX3CL1-Färbung des HGSOC-Kollektivs (stark/moderat). Balkenlänge 50 μm . **B)** Digitale Auswertung der CX3CL1-Intensität in omentalen (n=122) und peritonealen (n=126) Metastasen. Es erfolgte eine Normalisierung auf das jeweilige TMA-Nieren-Kontrollgewebe (T-Test Signifikanz). **C)** Digitale Auswertung der CX3CL1-Intensität in Primärtumoren. Darstellung von PFS (links) und OS (rechts) mit Aufteilung der Gruppen in eine moderate bzw. starke CX3CL1-Expression. Signifikanztestung mittels Log-Rank-Test.

Eine univariate Cox-Regressionsanalyse bestätigte, dass die klinischen Parameter FIGO-Stadium, Resttumormasse und Aszitesvolumen in dem getesteten Kollektiv signifikante, prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben ($p=0,004$; $p < 0,001$; $p < 0,001$) und das progressionsfreie Überleben ($p=0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$) sind (Tabelle 3). So errechnete sich beispielsweise für die *Hazard Ratio* (HR) bezogen auf das Gesamtüberleben bei FIGO IV im Vergleich zu FIGO III ein Wert von 1,76; bei einem vorhandenen Resttumor ein Wert von 2,04 und bei einem Aszitesvolumen über 500 mL ein Wert von 2,49. In Übereinstimmung mit den in Abbildung 41 gezeigten Kaplan-Meier-Diagrammen war eine hohe CX3CL1-Expression im Primärtumor dabei signifikant mit einem verkürzten Gesamtüberleben (HR=1,44; 95% CI=1,04-2,00; $p=0,026$) und progressionsfreien Überleben (HR=1,47; 95% CI=1,07-2,03; $p=0,018$) verbunden.

Tabelle 3: Univariate Cox-Regressionsanalyse der klinischen Überlebensdaten bei Patientinnen mit high-grade serösem Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) im Hinblick auf klinische Parameter und CX3CL1-Expression im Primärtumor.

Klinische Parameter	OS			PFS		
	N	HR (95% CI)	p	N	HR (95% CI)	p
Alter (Jahre)			n.s.			n.s.
≤ 60	71	1		79	1	
> 60	119	1,193 (0,853-1,668)		140	1,033 (0,740-1,441)	
FIGO Stadium			0,004			0,001
III	146	1		163	1	
IV	44	1,759 (1,203-2,572)		56	1,768 (1,246-2,509)	
Resttumor			<0,001			<0,001
0 cm	81	1		89	1	
> 0 cm	106	2,040 (1,466-2,841)		126	3,055 (2,130-4,381)	
Aszitesvolumen			<0,001			<0,001
≤ 500 ml	54	1		60	1	
> 500 ml	50	2,490 (1,591-3,898)		57	2,158 (1,438-3,239)	
Lymphknotenbefall			n.s.			0,010
negativ	53	1		57	1	
positiv	110	1,266 (0,871-1,840)		128	1,695 (1,132-2,538)	
CX3CL1-Expression			0,026			0,018
gering	112	1		128	1	
hoch	78	1,444 (1,044-1,997)		91	1,474 (1,069-2,032)	

Abkürzungen: **N**, Anzahl der Patientinnen; **HR**, Hazard Ratio; **CI**, Konfidenzintervall; **p**, Signifikanzlevel; **OS**, Gesamtüberleben; **PFS**, progressionsfreies Überleben; **FIGO**, International Federation of Gynecology and Obstetrics.

Eine zusätzliche multivariate Analyse wurde mit verfügbaren OS-Daten für 85 Patientinnen und PFS-Daten für 95 Patientinnen durchgeführt (Tabelle 4). Hierbei wurde erstmals der unabhängige, negative Einfluss einer hohen CX3CL1-Expression im Primärtumor auf die Prognose von Gesamtüberleben (HR=2,07; 95% CI=1,23-3,50; p=0,006) und progressionsfreiem Überleben (HR=1,83; 95% CI=1,14-2,93; p=0,012) dargestellt.

Tabelle 4: Multivariate Cox-Regressionsanalyse der klinischen Überlebensdaten bei Patientinnen mit high-grade serösem Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) im Hinblick auf klinische Parameter und CX3CL1-Expression im Primärtumor.

Klinische Parameter	OS			PFS		
	N	HR (95% CI)	p	N	HR (95% CI)	p
Alter (Jahre)			n.s.			n.s.
≤ 60	45	1		47	1	
> 60	40	0,956 (0,567-1,612)		48	1,060 (0,663-1,697)	
FIGO-Stadium			0,052			0,001
III	58	1		63	1	
IV	27	1,768 (0,995-3,144)		32	2,295 (1,404-3,750)	
Resttumor			0,072			<0,001
0 cm	36	1		39	1	
> 0 cm	49	1,659 (0,955-2,881)		56	2,805 (1,606-4,899)	
Aszitesvolumen			0,003			0,083
≤ 500 ml	46	1		51	1	
> 500 ml	39	2,342 (1,340-4,095)		44	1,581 (0,942-2,653)	
Lymphknotenbefall			n.s.			n.s.
negativ	26	1		27	1	
positiv	59	0,822 (0,473-1,429)		68	0,885 (0,508-1,543)	
CX3CL1-Expression			0,006			0,012
gering	36	1		38	1	
hoch	49	2,073 (1,227-3,499)		57	1,830 (1,144-2,925)	

Abkürzungen: N, Anzahl der Patientinnen; HR, Hazard Ratio; CI, Konfidenzintervall; p, Signifikanzlevel; OS, Gesamtüberleben; PFS, progressionsfreies Überleben; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics.

3.2. Regulation von Cx3cl1 in murinen ID8-Ovarialkarzinomzellen

Um im murinen Modell *in vitro* zu testen, ob Cx3cl1 wie auch beim Menschen als lösliche und membranständige Form exprimiert und von Proteasen wie ADAM-17 von der Membran abgespalten wird, wurden ID8Trp53^{-/-}-Zellen für 24 Stunden mit 50 ng/ml TNF α oder 50 ng/ml TNF α plus 50 μ M TAPI-2 (ADAM17-Inhibitor) inkubiert. Für die Analyse der membranständigen Form wurden die Zellen anschließend abgelöst, mit anti-Cx3cl1-Alexa-Fluor-488 gefärbt und im FACS ausgewertet. Die Stimulation mit TNF α führte durch die allgemeine Aktivierung der Chemokinexpression zu einer sichtbaren Rechtsverschiebung im Peak der relativen Cx3cl1-Fluoreszenz (Abbildung 42A). Wurde zusätzlich zur Aktivierung mit TNF α noch die Cx3cl1-Abspaltung von der Zellmembran durch TAPI-2 gehemmt, so wurde der Anteil an membranständigem Cx3cl1 verstärkt, was in einer additiven Rechtsverschiebung sichtbar wurde. Für den

Test auf die lösliche Cx3cl1-Form wurden Zellüberstände der verschiedenen Stimulationen im Chemokin-ELISA eingesetzt und die Konzentration von löslichem Cx3cl1 gemessen. Die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ führte verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle zu einer 4,2fachen Cx3cl1-Konzentration (0,37 vs. 1,55 ng/ml; $p < 0,0001$). Wurde zusätzlich mit TAPI-2 stimuliert, konnte dieses *shedding* und damit die sezernierte Menge praktisch auf das Niveau unstimulierter Zellen gesenkt werden (0,53 ng/ml, $p < 0,0001$). Die Beobachtung, dass sich dieser Wert von 0,53 ng/ml dennoch nicht gänzlich an die Lösungsmittelkontrolle mit 0,37 ng/ml angenähert hat, stützt die in der Einleitung unter Punkt III.3.3 erläuterte Erklärung, dass ADAM17 nicht die einzige Protease ist, die Cx3cl1 von der Membran abspalten kann.

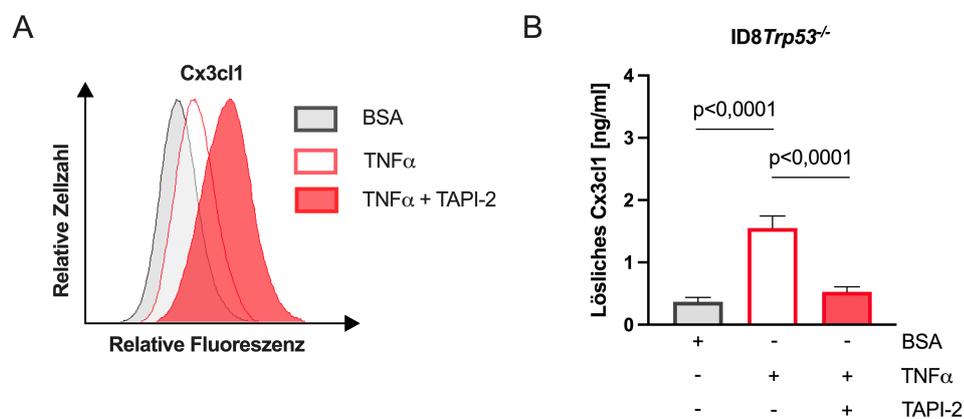


Abbildung 42: CX3CL1 wird von murinen $\text{ID8Trp53}^{-/-}$ -Zellen membranständig exprimiert und durch ADAM17 in eine lösliche Form abgespalten

A) FACS-Messung mit stimulierten $\text{ID8Trp53}^{-/-}$ -Zellen zur Bestimmung der membranständigen Form von Cx3cl1. B) ELISA-Messung aus dem Überstand stimulierter $\text{ID8Trp53}^{-/-}$ -Zellen zur Analyse der löslichen Form von Cx3cl1. Die Stimulationen erfolgten für 24 Stunden mit 50 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ oder 50 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ plus 50 μM TAPI-2 (ADAM17-Inhibitor). Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons Test.

3.3. Induktion von CX3CL1 durch PARP-Inhibitoren in humanen Ovarialkarzinomzelllinien

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, haben PARP-Inhibitoren wie Olaparib oder Niraparib in der Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms einen festen Stellenwert als Erhaltungstherapie eingenommen. Da zudem beschrieben ist, dass durch PARP-Inhibition die Chemokine CXCL10 und CCL5 hochreguliert werden (Shen J. et al., 2018), wurde im nachfolgenden Experiment getestet, ob auch das Chemokin CX3CL1 durch PARP-Inhibition induziert werden kann. Hierfür wurden drei verschiedene Ovarialkarzinom-Zelllinien für 48 Stunden mit Niraparib oder Olaparib stimuliert und die Zellüberstände anschließend im ELISA auf die CX3CL1-

Konzentration untersucht. Um die basale Chemokin-Konzentration zu erhöhen, wurde ein zweiter Versuchsansatz mit dem Zusatz von 10 ng/ml TNF α aufgestellt (Abbildung 43). Am wenigsten CX3CL1 wurde von CAOV-3 Zellen exprimiert (0,03 ng/ml basal), wobei verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle sowohl in Ruhe als auch unter TNF α -Stimulation keine CX3CL1-Induktion durch Niraparib erfolgte. Unter dem Einfluss von Olaparib wurde die CX3CL1-Konzentration allerdings in Ruhe zweifach ($p=0,0305$) und mit TNF α 2,3-fach ($p=0,0123$) erhöht. Bei OV-MZ-6 Zellen (0,07 ng/ml basales CX3CL1) wurden durch beide PARP-Inhibitoren signifikant höhere CX3CL1-Konzentrationen induziert. Niraparib verstärkte in Ruhe 2,2-fach ($p=0,0103$) sowie mit TNF α 2,1-fach ($p=0,0256$) und Olaparib induzierte in Ruhe 2,1-fach ($p=0,0364$) sowie mit TNF α 4,2-fach ($p=0,0031$). OVCAR-3 Zellen exprimierten mit 1,2 ng/ml am meisten CX3CL1 in Ruhe. Weder Niraparib ($p=0,4957$) noch Olaparib ($p=0,8812$) löste in dieser Zelllinie jedoch eine CX3CL1-Induktion aus. Unter TNF α -Stimulation stieg die Konzentration in der Lösungsmittelkontrolle auf 2,3 ng/ml, doch auch in diesem Ansatz wurde kein Unterschied durch PARP-Inhibition erreicht. Verschiedene PARP-Inhibitoren zeigen somit in verschiedenen Ovarialkarzinom-Zelllinien unterschiedliche Effekte auf die CX3CL1-Sekretion.

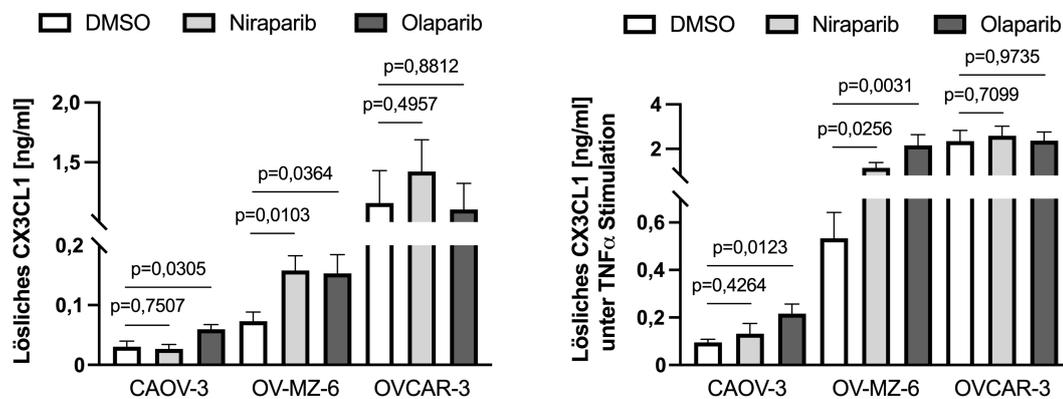


Abbildung 43: Einfluss der PARP-Inhibitoren Niraparib und Olaparib auf die CX3CL1-Expression in verschiedenen humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien

Die humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien OV-MZ-6, CAOV-3 und OVCAR-3 wurden für 48 Stunden ohne (links) oder mit (rechts) Zusatz von 10 ng/ml TNF α durch 10 μ M Niraparib oder Olaparib stimuliert. CX3CL1-Konzentrationen wurden im ELISA gemessen und als Mittelwerte mit Standardfehlern aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Auswertung mittels T-Test.

4. Funktionelle Rolle von Cx3cl1 im syngenem Ovarialkarzinommodell

4.1. Lentivirale Überexpression von Cx3cl1 in ID8Trp53^{-/-}-Zellen

Um die Rolle von Cx3cl1 *in vivo* untersuchen zu können, wurde Cx3cl1 stabil mittels lentiviraler Transduktion in ID8Trp53^{-/-}-Zellen überexprimiert. Je ein Leervektor- und ein Überexpressionsklon wurde auf eine vergleichbare Proliferationsrate getestet und die Cx3cl1-Expression auf RNA- und Proteinebene miteinander verglichen (Abbildung 44). Die qPCR-Analyse ergab eine 2,1-fache Cx3cl1-Expression im Cx3cl1-transduzierten Klon im Vergleich zum Leervektor-Klon ($p=0,0028$). Auf Proteinebene wurde im ELISA beim Überexpressionsklon mit 0,84 ng/ml eine 2,3-fache Cx3cl1-Konzentration verglichen zum Leervektor-Klon im Zellüberstand gemessen ($p=0,0017$). Wurden die Zellen für 24 Stunden mit 25 ng/ml TNF α stimuliert, so stieg die Cx3cl1-Konzentration im Leervektor-Klon von 0,37 auf 1,14 ng/ml an. Der Überexpressionsklon lag weiterhin mit 1,90 ng/ml Cx3cl1 1,7-mal höher ($p=0,011$).

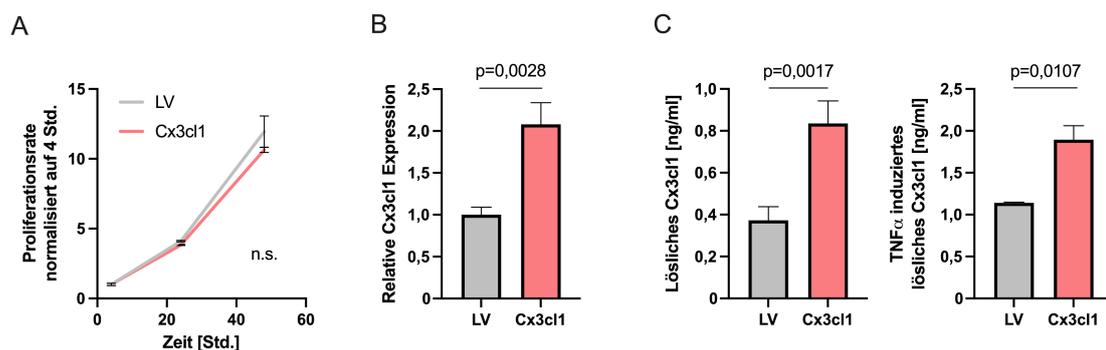


Abbildung 44: Erfolgreiche Cx3cl1-Überexpression in ID8Trp53^{-/-}-Zellen

A) Proliferationsmessung mittels MTT-Reagenz über 4, 24 und 48 Stunden (two-way ANOVA Test); repräsentative Mittelwerte mit technischen Triplikaten aus drei Wiederholungen. **B)** qPCR-Analyse der Überexpression mit angegebenen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werten; Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Wiederholungen (Student's T-Test). **C)** ELISA-Messung von löslichem Cx3cl1 im Überstand mit und ohne TNF α -Stimulation (25 ng/ml); Mittelwerte und Standardfehler aus drei Wiederholungen (Student's T-Test).

4.2. Funktion von Cx3cl1 im syngenem Ovarialkarzinommodell (intraperitoneal)

Zur Untersuchung der Rolle von Cx3cl1 im metastasierten Ovarialkarzinom wurden je sieben Mäusen entweder ID8Trp53^{-/-}Cx3cl1- oder ID8Trp53^{-/-}-Leervektor-Zellen mit einer Zellzahl von 1×10^7 in 250 μ l PBS intraperitoneal inokuliert. Die Mäuse wurden regelmäßig bezüglich des Allgemeinzustands und der Bildung von Aszites kontrolliert.

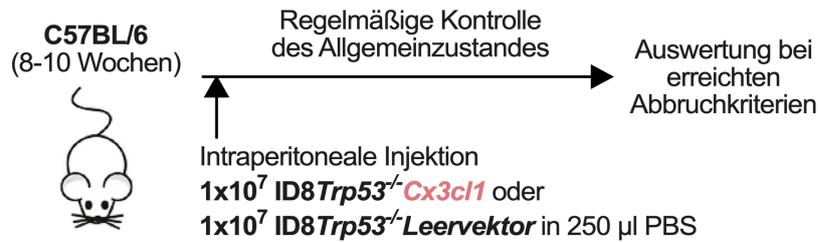


Abbildung 45: Sygenes Mausmodell mit Cx3cl1-Überexpression im intraperitonealen Versuchsansatz

Erläuterung des intraperitonealen Inokulationsschemas mit sieben C57BL/6 Mäusen pro Gruppe und 1×10^7 Zellen in 250 µl PBS.

4.2.1. Überlebenszeiten

Die Cx3cl1-Überexpression verkürzte die Zeit bis zum Auftreten von Aszites signifikant um 12 Tage (50 vs. 62 Tage; $p=0,0176$). In guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung von CX3CL1 im humanen Ovarialkarzinom verkürzte die Cx3cl1-Überexpression auch funktionell das mediane Überleben im Tiermodell (57 vs. 64 Tage; $p=0,0156$). Abbildung 46 zeigt die zugehörigen Kaplan-Meier-Kurven.

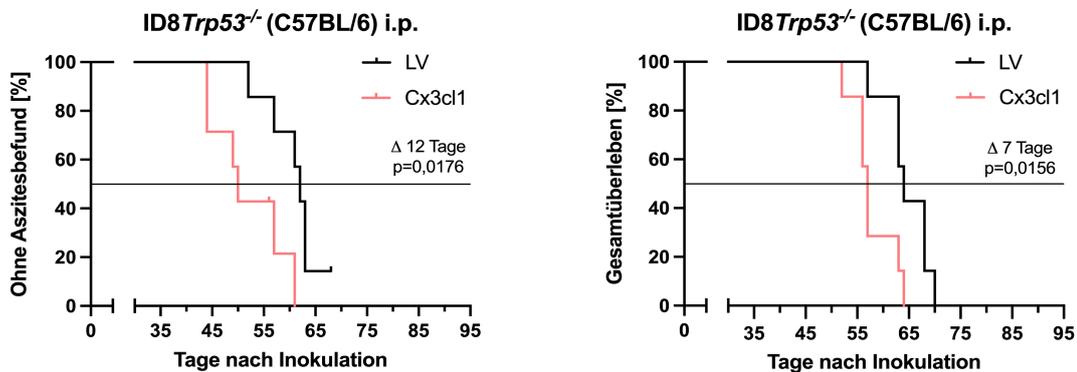


Abbildung 46: Intratumorale Cx3cl1-Überexpression verschlechtert das Überleben in immunkompetenten C57BL/6-Mäusen nach intraperitonealer Tumorumplantation

Kaplan-Meier-Kurven zur Aszitesbildung (links) und zum Gesamtüberleben (rechts). Log-Rank-Signifikanztest.

4.2.2. Expressionsanalysen und Immuninfiltration

Nach dem Erreichen der Abbruchkriterien und der Finalisierung der Mäuse wurde getestet, ob die Cx3cl1-Überexpression im Aszites oder im Tumorgewebe auch am Versuchsende noch nachzuweisen ist. Mittels Cx3cl1-ELISA konnte im Aszites kein Unterschied zwischen der Leervektor-Gruppe (0,07 pg/ml Cx3cl1 pro mg/ml Gesamtprotein) und der Cx3cl1-Gruppe (0,05 pg/ml Cx3cl1 pro mg/ml Gesamtprotein) festgestellt werden ($p=0,72$; Abbildung 47A). Nach dem Aufschluss von

kryokonserviertem Tumorgewebe aus dem Mesenterium wurde in der qPCR-Analyse mit Normalisierung auf das Housekeeping-Gen Hprt (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) festgestellt, dass die relative Cx3cl1-Expression verglichen zur Leervektor-Gruppe in der Cx3cl1 Gruppe im Median signifikant um einen Faktor von 1,4 erhöht war ($p=0,0384$).

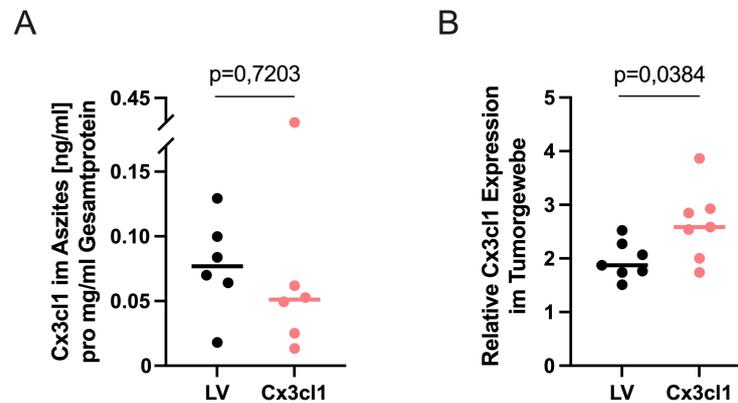


Abbildung 47: Cx3cl1 Überexpression kann im mesenterialen Tumorgewebe nachgewiesen werden

A) Cx3cl1 Konzentration im Aszites; gemessen durch ELISA und normalisiert auf das Gesamtprotein im Aszites mittels Bradford Assay. **B)** qPCR Analyse der Überexpression mit angegebenen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werten. Signifikanztestung durch T-Test.

Die manuelle immunhistochemische Analyse des mesenterialen Tumorgewebes (Abbildung 48) zeigte in der Cx3cl1-überexprimierenden Gruppe signifikant erhöhte Zahlen an tumorinfiltrierten CD3-positiven Zellen pro Bildausschnitt (Median 20 Zellen pro Bildausschnitt in der LV-Gruppe vs. 25 Zellen in der Cx3cl1-Gruppe; $p=0,0497$). Dieser Effekt wurde auch bei den CD8-positiven Zellen gesehen (Median 8 Zellen vs. 9 Zellen; $p=0,404$). Mit einem Antikörper gegen die Serinprotease Granzym B, welche beispielsweise in den intrazellulären Granula von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen vorhanden ist, wurde kein Unterschied in der immunhistochemischen Färbung beider Gruppen festgestellt ($p=0,5891$).

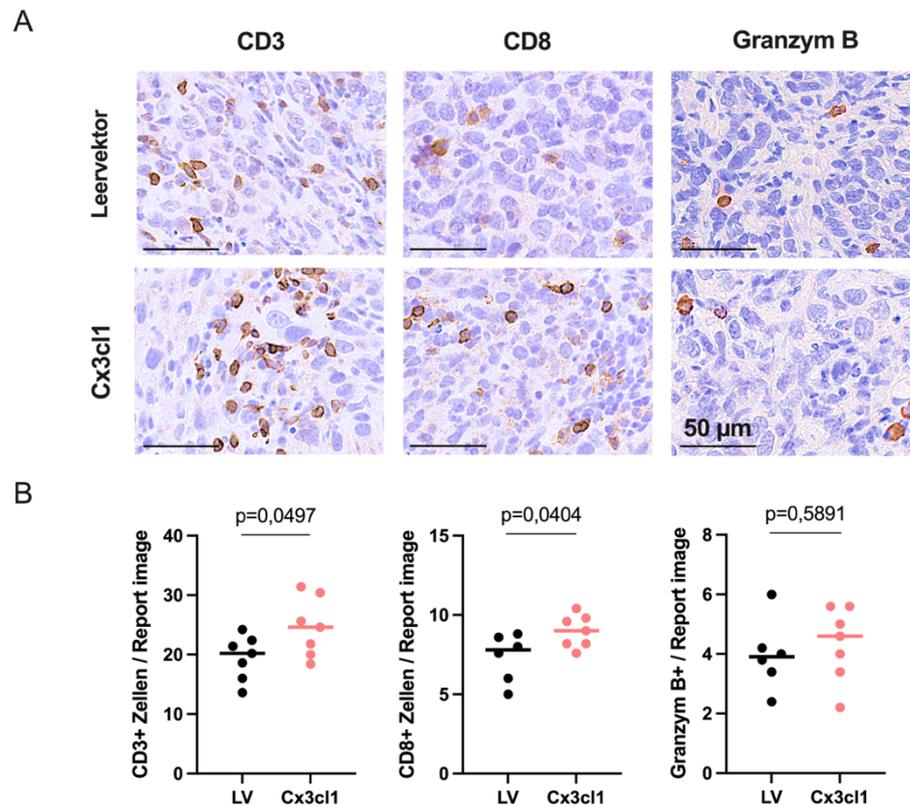


Abbildung 48: Cx3cl1 erhöht die Infiltration zytotoxischer T-Zellen im intraperitoneal implantierten Ovarialkarzinommausmodell

A) Beispielfotos zur immunhistochemischen Färbung von CD3, CD8 und Granzym B (Balkenlänge 50 µm). **B)** Zugehörige manuelle Auswertung der positiven Zellen mit Angabe als Anzahl pro Bildausschnitt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert eines Tumorgewebes mit fünf ausgewerteten Regionen dar. Innerhalb einer Gruppe ist der Median gezeigt. Statistischer Vergleich mittels T-Test.

In weiteren immunhistochemischen Analysen (Abbildung 49) wurde kein signifikanter Unterschied in der Intensität der Cx3cr1-Expression (0,32 vs. 0,31 DAB-Intensitätsquotient; $p=0,6221$) oder dem Anteil proliferierender Zellen (35% vs. 39% Ki67⁺; $p=0,7629$) zwischen Leervektor- und Cx3cl1-Gruppe festgestellt. Durch die Cx3cl1-Überexpression erhöhte sich der Anteil F4/80-positiver Makrophagen von 52% auf 68% ($p=0,0170$). Um den Aktivierungszustand der infiltrierten Makrophagen auf den immunsuppressiven M2-Subtyp zu testen, wurde mit einem CD206 Antikörper gefärbt. Mit dem niedrig ausfallenden Wert von 2% CD206⁺ Zellen in beiden Gruppen wurde hier allerdings kein Unterschied festgestellt ($p=0,6919$). Mit der Anfärbung des Proteins Ly6G, welches auch als das myeloide Differenzierungsantigen Gr1 bekannt ist, wurde neben den Makrophagen noch eine weitere Gruppe möglicher Suppressorzellen des Immunsystems analysiert. Auch hier war der mediane Wert von 0,95% Ly6G-positiver Zellen in der LV-Gruppe und 1,09% in der Cx3cl1-Gruppe sehr gering und nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,91$).

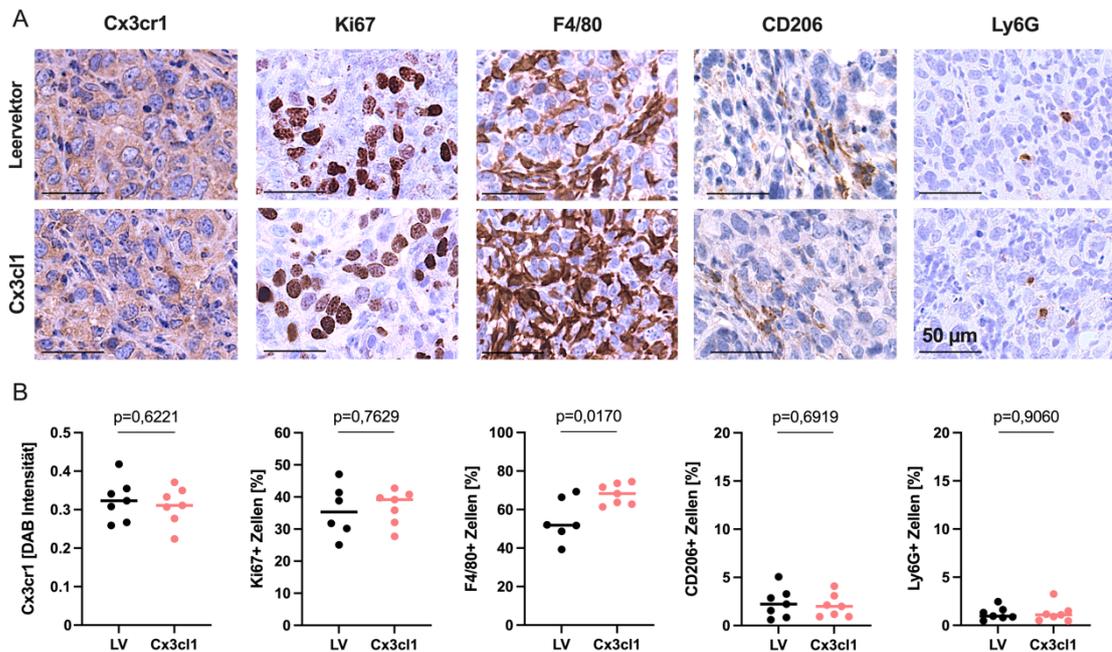


Abbildung 49: Cx3cl1 erhöht die Makrophagen-Infiltration im intraperitoneal metastasierten Ovarialkarzinommausmodell

A) Repräsentative Fotos zur immunohistochemischen Färbung des Cx3cr1-Rezeptors, von Ki67, F4/80⁺ Makrophagen, CD206⁺ M2-Makrophagen und Ly6G⁺ myeloiden Suppressorzellen (Balkenlänge 50 μ m). **B)** Zugehörige digitale Auswertung der positiven Zellen mit Angabe als DAB-Intensitätsquotient oder als Prozent aller Zellen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert eines Tumorgewebes mit fünf ausgewerteten Regionen dar. Innerhalb einer Gruppe ist der Median gezeigt. Statistischer Vergleich mittels T-Test.

4.3. Einfluss des adaptiven Immunsystems auf den intraperitonealen Effekt von Cx3cl1

Aufgrund der Tatsache, dass im vorangegangenen Effekt letztendlich zwei funktionell gegensätzliche Effekte einer Cx3cl1-Überexpression gefunden wurden (erhöhte CD8⁺ T-Zell-Infiltration und erhöhte Makrophagen-Infiltration) sollte im nächsten Schritt untersucht werden, welchen Effekt eine Cx3cl1-Überexpression ohne ein funktionierendes adaptives Immunsystem hat. Dazu wurden 1×10^7 ID8Trp53^{-/-}Cx3cl1- oder ID8Trp53^{-/-}Leervektor-Zellen intraperitoneal in je sieben athymische Nacktmäuse pro Gruppe inokuliert.

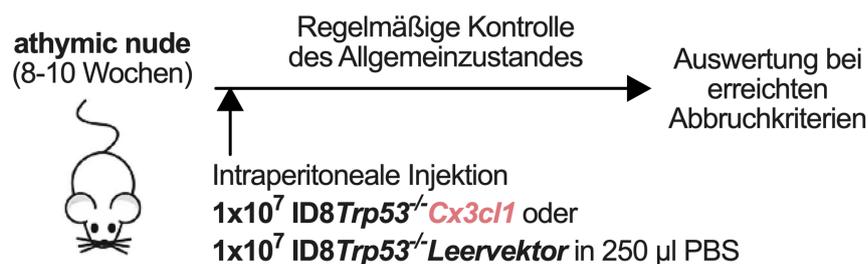


Abbildung 50: Immunkompromittiertes Mausmodell zur Untersuchung einer Cx3cl1-

Überexpression nach intraperitonealer Tumorimplantation

Erläuterung des intraperitonealen Inokulationsschemas mit sieben C57BL/6 Mäusen pro Gruppe und 1×10^7 Zellen in 250 μ l PBS.

4.3.1. Überlebenszeiten

Auch im immunkompromittierten Tiermodell bildeten sich durch die inokulierten Tumorzellen Metastasen an Peritoneum, Mesenterium und Zwerchfell. Aszites wurde im Gegensatz zum immunkompetenten Modell (Tag 42), bereits an Tag 28 erstmals dokumentiert (Abbildung 51). Eine Maus pro Gruppe erreichte die Abbruchkriterien ohne Aszitesbefund. Der mediane Unterschied lag bei 26 Tagen zwischen beiden Gruppen (56 Tage LV-Gruppe vs. 30 Tage Cx3cl1-Gruppe; $p=0,1771$), also deutlich mehr als im vollständig immunkompetenten Tier. Bei den Überlebenskurven erhöhte sich dieser mediane Unterschied auf 29 Tage (73 Tage in der LV-Gruppe vs. 44 Tage in der Cx3cl1-Gruppe; $p=0,008$). Somit stieg im Vergleich zum immunkompetenten Modell der mediane Überlebensnachteil der Cx3cl1 Gruppe im immunkompromittierten Setting von 7 auf 29 Tage. Die erhöhte Lymphozyten-Infiltration bei Beteiligung des adaptiven Immunsystems scheint somit dem ansonsten negativen Überlebenseffekt in der Cx3cl1-Gruppe entgegenzuwirken.

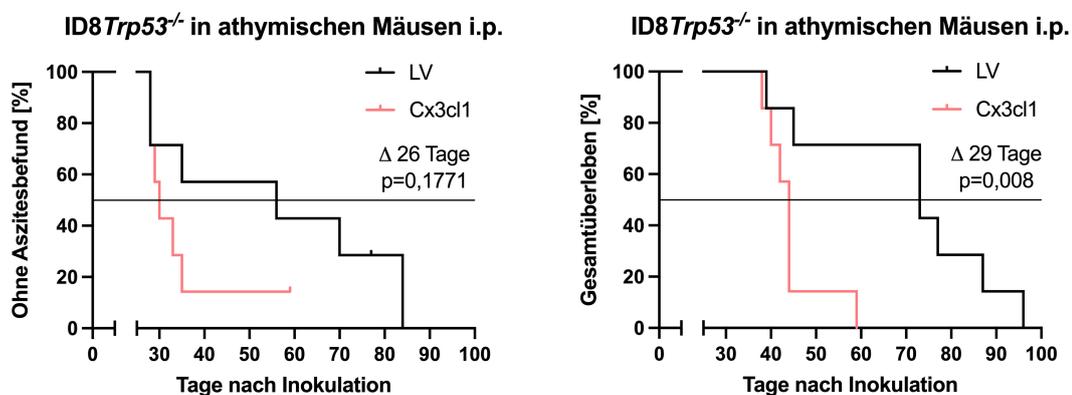


Abbildung 51: Eine intratumorale Cx3cl1-Überexpression verschlechtert das Überleben im immunkompromittierten Tiermodell

Kaplan-Meier-Kurven zur Aszitesbildung (links) und zum Gesamtüberleben (rechts). Log-Rank-Signifikanztest.

4.3.2. Expressionsanalysen und tumor-infiltrierende Makrophagen

Nach Erreichen der Abbruchkriterien wurden die Aszitesproben im ELISA auf deren Cx3cl1-Konzentration untersucht. Es konnte kein Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (0,15 ng/ml pro mg/ml Gesamtprotein in der LV-Gruppe

zu 0,13 ng/ml pro mg/ml Gesamtprotein in der Cx3cl1-Gruppe; $p=0,3870$). Im Vergleich zum immunkompetenten Tiermodell wurde jedoch auch keine erhöhte Makrophagen Infiltration mehr in der Cx3cl1-Gruppe gemessen (50% F4/80⁺ Zellen in der LV-Gruppe vs. 48% in der Cx3cl1-Gruppe; $p=0,80$).

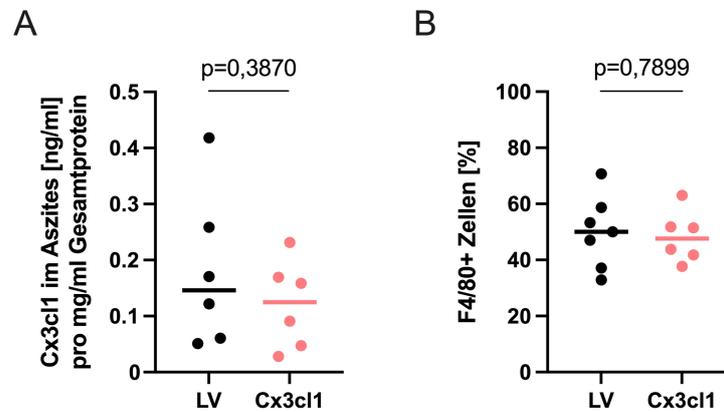


Abbildung 52: Eine Cx3cl1-Überexpression kann im immunkompromittierten Mausmodell nicht im Aszites nachgewiesen werden und zeigt keinen Effekt auf die Makrophagen-Infiltration

A) Cx3cl1-Konzentration im Aszites, gemessen durch ELISA und normalisiert auf das Gesamtprotein im Aszites. B) Digitale Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf F4/80-positive Makrophagen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert zur Auswertung eines Tumorgewebes dar. Innerhalb einer Gruppe ist der Median gezeigt. Signifikanztestung durch T-Test.

4.4. Lentivirale Cx3cl1-Überexpression in ID8Trp53^{-/-}SFeGFPluc-Zellen

Durch eine stabile Transduktion von Cx3cl1 in murinen ID8Trp53^{-/-}SFeGFPluc-Zellen wurde mittels Luciferase-Expression eine *in vivo* Biolumineszenz-Messung mit der Möglichkeit einer bildgebenden Verlaufskontrolle des Tumorwachstums ermöglicht. Um Proliferationsunterschiede zwischen den zwei ausgewählten Klonen auszuschließen, wurden die Zellen jeweils nach 4, 24 und 48 Stunden in einer Neubauer-Kammer ausgezählt und auf den Startwert normalisiert. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden (siehe Abbildung 53A). Auf RNA-Ebene ergab sich für den Überexpressionsklon eine 2,6-fache Cx3cl1-Expression verglichen mit dem Leervektor-Klon ($p<0,0001$, Abbildung 53B). Auf Proteinebene wurden im ELISA in den Zellüberständen 0,39 ng/ml Cx3cl1 für den Leervektor gemessen und 1,4 ng/ml für den Überexpressionsklon ($p=0,0007$, Abbildung 53C). Unter dem Stimulationszusatz von 50 ng/ml TNF α ergab sich mit 1,9 ng/ml (Leervektor) zu 3,9 ng/ml eine zweifache Überexpression für den Cx3cl1-transduzierten Klon ($p=0,0003$, Abbildung 53C).

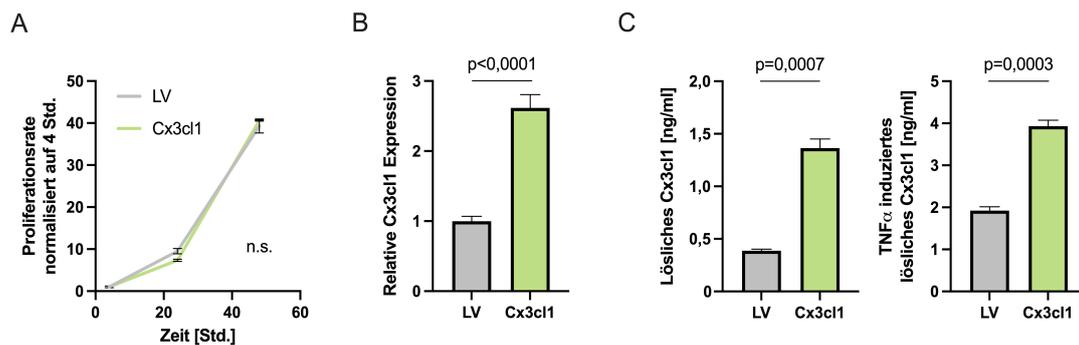


Abbildung 53: Erfolgreiche Cx3cl1 Überexpression in ID8Trp53^{-/-}SFeGFPluc Zellen

A) Auszählung der Zellzahl mittels Neubauer-Kammer über 4, 24 und 48 Stunden (two-way ANOVA Test); repräsentative Mittelwerte mit technischen Duplikaten. **B)** qPCR Analyse der Überexpression mit angegebenen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werten; Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Wiederholungen (Student's T-Test). **C)** ELISA Messung von löslichem Cx3cl1 im Überstand mit und ohne 50 ng/ml TNF α -Stimulation; Mittelwerte und Standardfehler aus drei Wiederholungen (Student's T-Test).

4.5. Funktionelle Bedeutung von Cx3cl1 im subkutanen Ovarialkarzinommausmodell

Um die funktionelle Rolle von Cx3cl1 außerhalb des peritonealen Milieus zu untersuchen, wurden in je sechs Mäuse pro Gruppe subkutan 1×10^7 Luciferase-exprimierende ID8Trp53^{-/-}SFeGFPluc-Cx3cl1- oder ID8Trp53^{-/-}SFeGFPluc-Leervektor-Zellen inokuliert. Neben der Verschlechterung des Allgemeinzustandes wurden die Abbruchkriterien in diesem Modell durch einen Aufbruch des subkutanen Tumors oder einen maximalen Tumordurchmesser von 15 mm bestimmt.

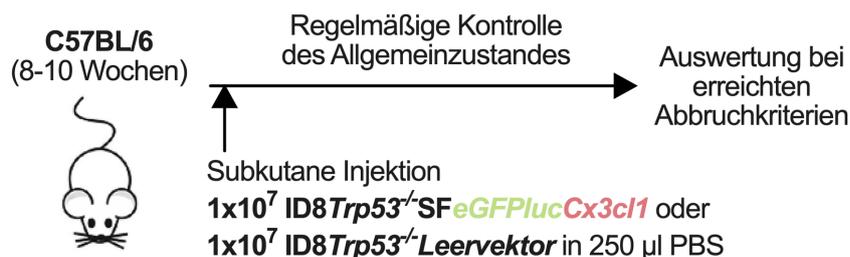


Abbildung 54: Syngenes, subkutanes Mausmodell mit Cx3cl1-Überexpression Erläuterung des subkutanen Inokulationsschemas mit sechs C57BL/6-Mäusen pro Gruppe und 1×10^7 Zellen in 250 μ l PBS.

4.5.1. Non-invasive Messungen des Tumorwachstums

Die maximalen Durchmesser der subkutanen Tumore wurden zweimal wöchentlich mittels Messschieber bestimmt. Abbildung 55A zeigt eine Übersicht über die zeitliche Entwicklung mit Beginn der Zeitachse beim ersten auffälligen Palpationsbefund und mit Ende der Zeitachse beim ersten Erreichen eines Abbruchkriteriums. Die Tumoren in

der Leervektor-Gruppe zeigten über die Zeit ein signifikant erhöhtes Wachstum ($p < 0,0001$, two-way ANOVA). Bestätigt wurde diese Beobachtung durch die wiederkehrenden *in vivo* Biolumineszenzmessungen mittels Injektion des Luciferase-Substrats Luciferin. Abbildung 55B stellt die zeitabhängigen Kurven beider Gruppen mit Mittelwerten und Standardfehlern aus den jeweiligen Flux-Messungen in Photonen pro Sekunde dar. Das Tumorwachstum in der Leervektor-Gruppe war im zeitlichen Verlauf signifikant höher als in der Cx3cl1-Gruppe ($p = 0,0080$). Abbildung 55C veranschaulicht beispielhaft mit Aufnahmen von je drei Mäusen pro Gruppe an Tag 93 nach Tumorinokulation die stärkeren Biolumineszenz-Signale in der Leervektor Gruppe und die Lage der subkutan gesetzten Tumoren.

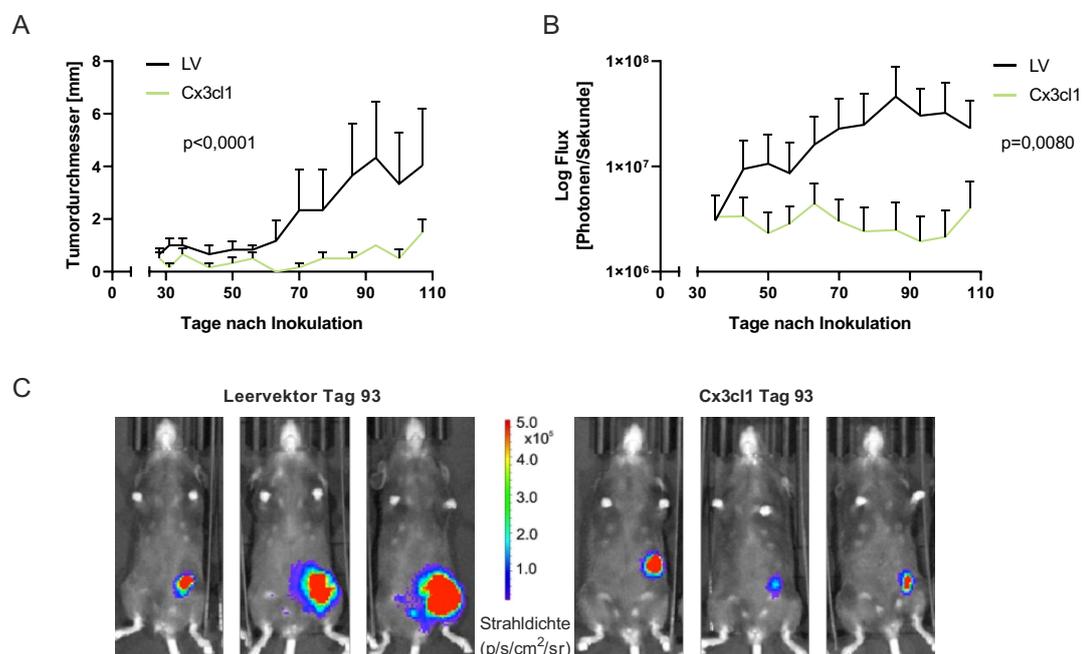


Abbildung 55: Nicht-invasive Kontrolle des subkutanen Tumorwachstums

A) Proliferationsmessung der Tumurlänge in Millimetern (Mittelwerte mit Standardfehlern pro Gruppe und Messtag, two-way ANOVA Test). **B)** Zeitlicher Verlauf des Tumorwachstums gemessen in Photonen/Sekunde (Log Flux; two-way ANOVA Test). **C)** Repräsentative Fotos der Biolumineszenz-Strahldichte von je drei Mäusen pro Gruppe gemessen an Tag 93 nach Tumorinokulation.

4.5.2. Überlebenszeiten

Die erste Maus erreichte das Abbruchkriterium zur Finalisierung an Tag 108 nach Tumorinokulation, somit zeigt das subkutane Modell eine insgesamt deutlich langsamere Wachstumskinetik verglichen zum intraperitonealen Versuchsdesign (siehe auch Abbildung 51). Eine Maus in der Cx3cl1-Gruppe hatte am Ende des Experiments (Tag 210 nach Inokulation) immer noch kein Abbruchkriterium erreicht und erscheint

daher in der Kaplan-Meier Überlebenskurve in Abbildung 56 als zensiert. Der zweite Teil der Abbildung zeigt beispielhaft eine Maus mit einem subkutan gewachsenen Tumor, der den festgesetzten Maximaldurchmesser von 15 mm als Abbruchkriterium erreicht hatte.

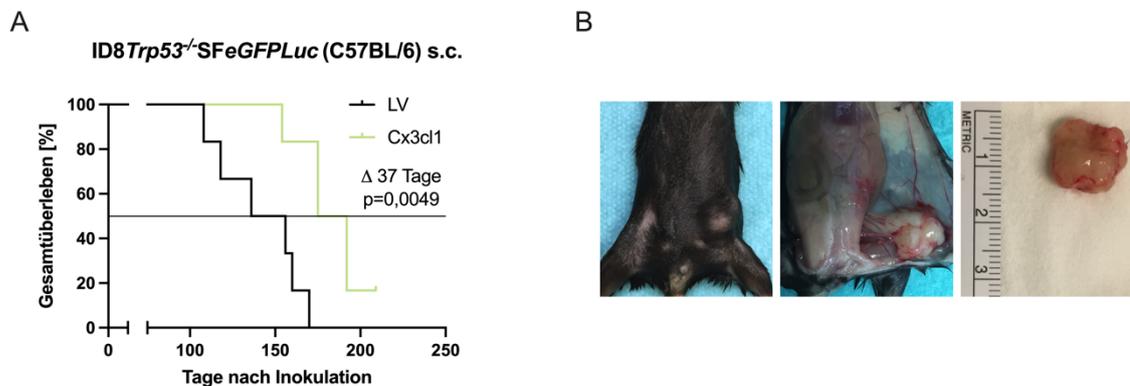


Abbildung 56: Eine intratumorale Cx3cl1-Überexpression verbessert das Überleben im ID8-Subkutanmodell

A) Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben (Log-Rank-Signifikanztest). **B)** Beispielfotos zur Finalisierung einer Maus mit subkutanem Tumor nach Erreichen des Abbruchkriteriums eines maximalen Tumordurchmessers von 15 mm.

4.5.3. Expressionsanalysen und intratumorale Immunzellpopulationen

Die immunhistochemischen Färbungen des subkutanen Tumorgewebes (Abbildung 57) ergaben im Vergleich zur Leervektor-Gruppe signifikant erhöhte Zahlen an infiltrierten CD3-positiven T-Zellen in der Cx3cl1-Gruppe (im Median 13 Zellen verglichen mit 21 Zellen pro Bildausschnitt; $p=0,0444$). Ebenso wurde ein signifikanter, positiver Cx3cl1-Effekt bei der Untergruppe der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen verzeichnet (im Median 5 Zellen in der LV-Gruppe vs. 7 Zellen in der Cx3cl1-Gruppe; $p=0,0289$). Bei den regulatorischen T-Zellen ergab sich mit 16 Zellen pro Bildausschnitt in der Leervektor-Gruppe und 19 Zellen in der Cx3cl1-Gruppe kein signifikanter medianer Unterschied ($p=0,9056$). Ebenso bei den F4/80-positiven Makrophagen mit 47% F4/80⁺ Zellen in der LV-Gruppe und 45% in der Cx3cl1-Gruppe ($p=0,91$). Der Anteil der Cx3cl1-Gruppe lag somit 23% unter dem gemessenen Wert im intraperitonealen Modell ($p=0,0051$), während die Kontrollgruppen mit 52% im intraperitonealen und 47% im subkutanen Modell vergleichbar hoch waren. Passend zum verlangsamten *in vivo* Wachstum des subkutanen Modells wurden in der Ki67-Analyse mit 22% positiven Zellen in der LV-Gruppe und 27% in der Cx3cl1-Gruppe ($p=0,72$) insgesamt geringere intratumorale Proliferationsraten als im intraperitonealen Setting gemessen (35% Ki67-positiv Zellen in der LV-Gruppe vs. 39% in der Cx3cl1-Gruppe; $p=0,76$). Fasst man

die jeweiligen LV- bzw. Cx3cl1-Gruppen zusammen, so sind die Proliferationsraten in den intraperitonealen Tumorgeweben signifikant höher als in den subkutanen ($p=0,0072$).

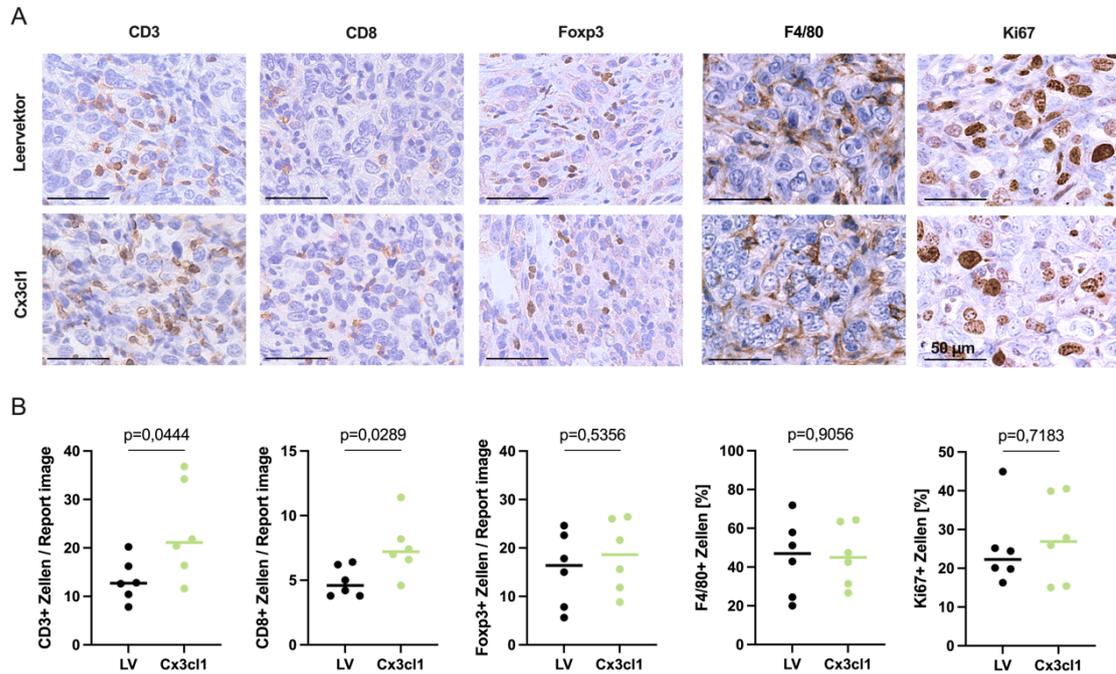


Abbildung 57: Cx3cl1 erhöht im subkutanen ID8-Modell die Infiltration von TILs und zeigt keinen Effekt auf die Makrophagen Infiltration

A) Repräsentative Fotos zur immunhistochemischen Färbung von CD3, CD8, Foxp3, F4/80 und Ki67 (Balkenlänge 50 µm). **B)** Zugehörige manuelle oder digitale Auswertung der positiven Zellen mit Angabe als Anzahl pro Bildausschnitt oder als Prozent von allen Zellen im Tumor. Jeder Punkt stellt den Mittelwert eines Tumorgewebes mit fünf ausgewerteten Regionen dar. Innerhalb einer Gruppe ist der Median gezeigt. Statistischer Vergleich mittels T-Test.

VIII. DISKUSSION

1. Intratumorales Cxcl9 verbessert abhängig vom adaptiven Immunsystem die Gesamtüberlebensrate

Neben der Entstehung sogenannter „Neo-Antigene“ durch die erhöhte Mutationslast in der Tumorprogression kann die Immunogenität eines Tumors durch die Aktivierung und Infiltration zytotoxischer T-Lymphozyten wesentlich erhöht werden (Budczies et al., 2015; Chen & Mellman, 2013). Im humanen Ovarialkarzinom wurde gezeigt, dass diese Merkmale, besonders stark ausgeprägt im sogenannten „immunreaktiven Subtyp“, mit einem verbesserten Überleben einhergehen (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011; Konecny et al., 2014; Wang C. et al., 2017). Im murinen ID8-Wildtyp-Tumormodell führte die Überexpression des CXCR3-Chemokins Cxcl10 zu einer verringerten Tumorlast und zu einer verlangsamten Aszitesbildung (Au et al., 2017). Zudem wurden Gene, welche an der Apoptoseinduktion und T-Zell-Funktion beteiligt sind, hochreguliert. In der vorliegenden Studie wurde nun die Rolle von CXCL9 im Ovarialkarzinom weiter untersucht.

Die starke prognostische Bedeutung der CXCR3-Chemokine CXCL9 und CXCL10 im *high-grade* serösen Ovarialkarzinom sowie deren Assoziation mit einer verstärkten Lymphozyteninfiltration beim Menschen war im Vorfeld dieser Arbeit bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt worden (Bronger et al., 2016). Nun galt es, diese Assoziationen auch funktionell im Tiermodell zu bestätigen. Das hier verwendete Ovarialkarzinommausmodell wurde durch intraperitoneale Inokulation von murinen ID8-Zellen initiiert, welche ursprünglich aus dem Ovarialepithel einer C57BL/6-Maus isoliert worden waren (Roby et al., 2000). Im Gegensatz zu den meisten bisher mit diesem Modell veröffentlichten Publikationen, welche mit der ursprünglichen ID8-Zelllinie arbeiten, wurde in der vorliegenden Studie eine CRISPR-Cas9 generierte ID8-Zelllinie mit *Trp53*-Knockout (Walton et al., 2016) verwendet. Dies simuliert die Situation im Menschen tatsächlich besser, da das HGSOE in fast allen Tumoren (96%) TP53-Mutationen aufweist (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011). Weil intratumorale Immunzellen eine stärkere prognostische Aussagekraft als Immunzellen im Tumorstroma haben (Hamanishi et al., 2007), wurden stromale Bereiche bei den immunhistochemischen Auswertungen nicht berücksichtigt.

Eine stabile Cxcl9-Überexpression im murinen Modell mit ID8Trp53^{-/-} Zellen reichte bereits aus, um sowohl eine signifikant höhere Infiltration zytotoxischer T-Zellen als auch ein damit korrelierendes, signifikant verbessertes Gesamtüberleben zu erwirken. Auch der Zeitpunkt der Aszitesbildung konnte in der Cxcl9-Gruppe signifikant hinausgezögert werden. Gleichzeitig wurde trotz des Vorhandenseins des CXCR3-Rezeptors auf immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (Redjimi et al., 2012) diese Population nicht vermehrt durch Cxcl9 in den Tumor geführt. Weiterhin fanden sich signifikant weniger intratumorale F4/80-positive Makrophagen in den Cxcl9-überexprimierenden Tumoren, womit der Anteil tumor-assoziiertes Makrophagen womöglich verringert wurde, was sich möglicherweise zusätzlich günstig auf den protektiven Cxcl9-Effekt auswirken könnte. Um dies weiter abzuklären, wäre ein entsprechendes Experiment in SCID-Beige-Mäusen denkbar. Der Mechanismus der verringerten Makrophagen-infiltration konnte letztlich nicht geklärt werden, möglicherweise handelt es sich lediglich um einen Verdrängungseffekt durch die erhöhte Zahl anderer Immunzellen. Bei gleichbleibender Cxcl9-Überexpression (Aszites) verschwand der tumor-suppressive Effekt von Cxcl9 in athymischen Mäusen, was darauf hinweist, dass die Cxcl9-Wirkung gut durch die Aktivierung des adaptiven Immunsystems erklärbar ist. Auch die aus unserer Arbeitsgruppe heraus gestellte Hypothese, CXCL9 könnte durch Retention CXCR3-positiver Ovarialkarzinomzellen die intraperitoneale Metastasierung hemmen, erscheint weniger wahrscheinlich (Windmüller et al., 2017).

Da BRCA1/2-mutierte Tumore eine klinisch relevante Subgruppe im Ovarialkarzinom darstellen, wurde eine lentivirale Cxcl9-Überexpression in der von Josephine Walton generierten Zelllinie ID8Trp53^{-/-}Brca2^{-/-} durchgeführt (Walton et al., 2016). Trotz vergleichbaren *in vitro* Überexpressionswerten zwischen den Cxcl9-Klonen mit und ohne Brca2-Knockout, konnte *in vivo* im Brca2-Knockout Modell kein signifikant positiver Cxcl9-Effekt mehr auf die Aszitesbildung und das Gesamtüberleben festgestellt werden. Im Vergleich zum Brca2-Wildtyp Modell konnten zudem keine erhöhten T-Zell-Infiltrationsraten mehr durch Cxcl9 erreicht werden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Brca2-mutierte Tumore *per se* schon ein signifikant stärkeres Immuninfiltrat aufwiesen, als es in den Brca-Wildtyp Tumoren zu finden war. Ausgelöst wurde dies vermutlich durch die Tatsache, dass im Aszites der Mäuse aus dem Brca2-mutierte Experiment 6,5-mal mehr lösliches Cxcl10 nachgewiesen wurde. Dies lässt sich zufriedenstellend durch eine durch den Brca2-Verlust induzierte

Aktivierung des STING-Signalwegs erklären, bei dem in Folge der homologen Rekombinationsdefizienz die IFN γ -Typ I-Antwort und die Expression von Cxcl10 hochreguliert wird (Bruand et al., 2021). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Induktion von Cxcl10 und damit verbunden auch der T-Zell-Infiltration begründet ebenfalls sehr gut die auch bei Patientinnen beobachtete verstärkte T-Zell-Infiltration in *BRC*A-mutierten Ovarialkarzinomen (Strickland et al., 2016).

2. CXCL9 als prädiktiver Biomarker für die Effektivität einer Immuncheckpoint-Blockade

Trotz der effektiven Wirksamkeit und des günstigen Nebenwirkungsprofils einer Immuncheckpoint-Blockade (ICB) im malignen Melanom und im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Brahmer et al., 2012; Kwok et al., 2016) konnten beim Eierstockkrebs hiermit noch keine durchschlagigen Erfolge verzeichnet werden (Bronger, 2021). Beispielsweise in der 2020 erstmalig ausgewerteten „IMagyn50“ Phase III-Studie wurde Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom in der Erstlinientherapie der anti-PD-L1-Antikörper Atezolizumab bzw. Placebo zusätzlich zur Erstlinienchemotherapie und dann auch in der Erhaltungstherapie gegeben (Moore K.N. et al., 2021). In der *Intention to treat*-Population ergab sich in der ICB-Gruppe kein signifikant verbessertes medianes progressionsfreies Überleben (19,5 Monate im Vergleich zur Placebo-Gruppe mit 18,4 Monaten; HR 0,92; 95% CI 0,79-1,07; p=0,28). Ebenso zeigte sich bislang keine Verbesserung beim Gesamtüberleben. Lediglich eine nach PD-L1-Expression stratifizierte Subgruppe profitierte im PFS signifikant von der ICB-Therapie, letztlich blieb aber auch die prädiktive Aussagekraft der PD-L1-Expression enttäuschend. Es sind also weitere Subgruppenanalysen mit anderen möglichen Biomarkern nötig, um den kleinen Teil der Patientinnen finden zu können, der wirklich von der ICB profitieren könnte.

Aktuell geht man davon aus, dass die Therapie für einen wirksamen Effekt mit einer maximalen Infiltrationsrate von Lymphozyten im Tumormikromilieu zusammenfallen sollte (Doo et al., 2019). Es soll also bereits vor der Applikation eine systemische Immunantwort vorhanden sein, die dann durch die ICB „enthemmt“ werden kann (Spitzer et al., 2017). Entsprechend scheint das CXCR3-System eine wichtige Rolle bei der Therapieeffizienz einzunehmen, da es in zahlreichen Studien für die Immuninfiltration im Tumor verantwortlich gemacht wurde (Dufour et al., 2002; Harris et al., 2012; Wendel et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass der intrinsische CXCR3-

Signalweg im Tumormilieu erforderlich ist für die Expansion CD8-positiver T-Zellen und somit auch für eine erfolgreiche tumorsuppressive Antwort unter anti-PD-1-Therapie (Chow et al., 2019). Begünstigt wurde die ICB-Effizienz hierbei durch die Produktion des Chemokins Cxcl9 von intratumoralen CD103-positiven dendritischen Zellen. Die vorliegende Studie konzentrierte sich auf den Einfluss von Cxcl9, welches primär von den Tumorzellen selbst sezerniert wird, wie es unsere Untersuchungen zuvor beim Menschen gezeigt hatten (Bronger et al., 2016).

Es sollte zunächst in *Brca2*-Wildtyp Tumoren eruiert werden, ob eine Cxcl9-Überexpression und die damit verbundene erhöhte Immuninfiltrationsrate ausreicht, um eine effektive Immuncheckpoint-Blockade mittels monoklonaler PD-L1-Antikörpertherapie zu ermöglichen. Der Start der Therapie wurde mit Tag 30 nach Tumorinokulation dabei gezielt relativ spät gewählt, damit die Tumorausbreitung nicht bereits durch das aktivierte Immunsystem gehemmt werden könnte, bevor in Anlehnung an die klinische Relevanz ein ausreichend metastasiertes Stadium erreicht wird. Im Kombinationsexperiment aus Cxcl9-Überexpression und anti-PD-L1-Therapie konnte in der Cxcl9/IgG2b-Gruppe der positive Cxcl9-Effekt auf das Überleben genauso wie die signifikant erhöhte CD3⁺-bzw. CD8⁺-Infiltration erfolgreich repliziert werden. Obwohl allgemein unter ICB die intratumorale Ki67-Proliferationsrate erfolgreich gesenkt wurde, hatte die Therapie in der Leervektor/PD-L1-Gruppe keinen Effekt auf die Aszitesbildung oder das Gesamtüberleben, also genau so, wie es sich in der überwiegenden Mehrzahl der Ovarialkarzinompatientinnen ebenfalls zeigt (siehe oben). Im Gegensatz dazu erreichte die Cxcl9/PD-L1-Gruppe ein signifikant besseres Überleben als die Cxcl9/IgG2b-Gruppe. Unterstützt wurde der Therapieerfolg möglicherweise durch die Tatsache, dass im Gegensatz zur Leervektor/IgG2b-Gruppe in den anderen Gruppen ein Trend zu einem gesenkten intratumoralen Makrophagenanteil verzeichnet wurde. M2-aktivierte Makrophagen können CD8/PD-1-positive T-Zellen in ihrer Aktivität hemmen, indem sie PD-L1 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Fang et al., 2021). Zudem sind M2-Makrophagen an der Rekrutierung immunsuppressiver regulatorischer T-Zellen (*Tregs*) beteiligt (Lin et al., 2005). Eine Depletion oder Umpolung in M1-Makrophagen wird demnach als mögliche Strategie zur verbesserten Effektivität von Immun-Checkpoint-Inhibitoren vorgeschlagen (Cassetta & Kitamura, 2018). Die immunhistochemische Analyse der vorliegenden Studie ergab bezogen auf die Immuninfiltration das Ergebnis, dass innerhalb der Cxcl9/PD-L1-Gruppe signifikant weniger intratumorale CD8-Zellen vorhanden waren

als in der Cxcl9/IgG2b-Gruppe. Da die Mäuse aus der ICB-Gruppe später die Abbruchkriterien erreichten und somit auch die Immunzellfärbung zu einem späteren Zeitpunkt als in der anderen Gruppe vorgenommen wurde, ist denkbar, dass die zytotoxischen T-Zellen durch die ständige Aktivierung unter Immuncheckpoint Blockade bereits „ausgebrannt“ waren und daher apoptotisch und nicht mehr in der Immunhistochemie nachweisbar wurden. Ein vergleichbarer Effekt war bereits zuvor gezeigt worden: in präklinischen Studien anderer Entitäten zeigte sich unter fortlaufender anti-PD-1-Therapie ein abnehmender Prozentsatz CXCR3-exprimierender, CD8-positiver T-Zellen (Chow et al., 2019).

Passend zur Verbesserung des ICB-Ansprechens durch eine CXCL9-Überexpression konnten wir in der vorliegenden Arbeit eine im Vergleich zu anderen Ovarialkarzinom-Subtypen verstärkte CXCL9-Expression im klarzelligen Typ feststellen. Klarzellige Ovarialkarzinome zeigten, womöglich durch stärkere Infiltrate von CD3⁺, CD8⁺ und PD-1⁺ Immunzellen (Howitt et al., 2017) in klinischen Studien der letzten Jahre zumeist bessere ICB-Ansprechraten als die übrigen Entitäten, wobei die Fallzahlen hier leider sehr klein waren (Hamanishi et al., 2015; Liu et al., 2019; Matulonis et al., 2019).

In HR-defizienten ID8*Trp53*^{-/-}*Brca2*^{-/-}-Tumoren ergab sich vergleichbar zum HR-profizienten Modell in der Leervektor/IgG2b-Gruppe ein lediglich um einen Tag verschobener Median im Überleben. Weder die alleinige Cxcl9-Überexpression, noch die Kombination mit einer anti-PD-L1-Therapie ergaben signifikant verbesserte Überlebenszeiten. Anzumerken ist dennoch, dass sich die Cxcl9-Gruppen im Median der Kaplan-Meier Grafik optisch nach rechts verschoben darstellten. Obwohl *Brca*-mutierte Tumore durch nachgewiesene höhere CD8-Infiltrate theoretisch sensitiver auf Immuncheckpoint-Blockaden ansprechen sollten (Strickland et al., 2016), verzeichneten übereinstimmend mit unseren Experimenten auch andere präklinische und klinische Arbeiten keinen Erfolg bei der Immuncheckpoint Blockade im HR-defizienten Modell (Bruand et al., 2021; Disis et al., 2019; Konstantinopoulos et al., 2019). Da in der vorliegenden Studie die Cxcl9/PD-L1-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen einen Trend für eine erhöhte Anzahl intratumoraler CD3⁺-Lymphozyten aufwies, ist anzunehmen, dass ein geringer, aber nicht effektiv wirksamer Effekt durch Cxcl9 bzw. durch die ICB hinsichtlich der Erhöhung der Infiltrationsrate erreicht werden konnte. Bezüglich der Ki67-Proliferationsrate konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen allen vier Gruppen festgestellt werden. Die absoluten Werte lagen allerdings mit etwa 40% Ki67-positiver Tumorzellen im Median höher als die Werte bei den

ID8*Trp53*^{-/-}-Tumoren mit 30% in den Placebo-Gruppen und mit unter 20 % in den ICB-Gruppen. In der Literatur wurde passend dazu gezeigt, dass HR-defiziente Tumoren zudem eine höhere Angiogeneserate aufweisen als HR-profiziente ID8*Trp53*^{-/-} Tumoren (Bruand et al., 2021). Neben der Beobachtung, dass im *Brca2*-defizienten Modell allgemein mehr intratumorale T-Lymphozyten vorhanden sind, als im *Brca2*-Wildtyp Modell, wurden im direkten Vergleich der Experimente allerdings in *Brca2*-Knockout-Tumoren nur halb so viele PD-1-positive Zellen gefunden. Da PD-1 bei Lymphozyten als Aktivierungsmarker gilt, deutet dies möglicherweise darauf hin, dass die infiltrierten T-Zellen keinen ausreichenden Aktivierungsstatus für einen verbesserten Überlebens-effekt besaßen.

Zusammenfassend war eine Cxcl9-Überexpression im *Brca*-WT-Tiermodell ausreichend, um eine erfolgreiche ICB zu ermöglichen. CXCL9 könnte daher ein geeigneter prädiktiver Marker sein, um Patientinnen zu identifizieren, die von einer ICB profitieren könnten. Bisher wurde in klinischen Therapiestudien beim Ovarialkarzinom als Biomarker die PD-L1 Expression im Tumormilieu verwendet, doch dieser lieferte lediglich eine unzureichende Korrelation mit dem Therapieansprechen. Auch bei der vorliegenden Studie, bei welcher die PD-L1-Expression von *Brca2*-Wildtyp und *Brca2*-Knockout Tumorzellen vergleichbar hoch war, ergaben sich dennoch unterschiedliche Ansprechraten. Erklärt werden könnte dies durch die Limitation, dass die PD-L1-Expression genau wie die T-Zell-Infiltration dynamische Prozesse darstellen, die möglicherweise zum Zeitpunkt des Therapiestarts schon wieder verändert vorliegen könnten. Da allerdings bei einer Blutplasmauntersuchung von Melanompatienten die CXCL9-Konzentration innerhalb der ersten Monate nach einer Immuncheckpoint-Blockade positiv mit der Ansprechrate der Therapie korrelierte (Chow et al., 2019), könnte das Chemokin CXCL9 künftig zur Stratifizierung einer Subgruppe mit einer potenziell effektiven Ansprechrate eingesetzt werden. CXCL9 wurde auch bereits zuvor in anderen Entitäten als prädiktiver Marker vorgeschlagen (Higgs et al., 2018; Iwai et al., 2021; Qu et al., 2020). In einer kürzlich publizierten Untersuchung an mehr als 1000 ICB-behandelten Patienten über sieben Krebsentitäten war CXCL9 neben der Tumormutationslast (TMB) der stärkste prädiktive Marker für ein Therapieansprechen (Litchfield et al., 2021).

Neben der möglichen prädiktiven Aussagekraft von CXCL9, könnten Therapien, die CXCL9 im Tumormilieu anreichern, vielversprechende Kombinationspartner für ICB beim Ovarialkarzinom sein. Die Chance, CXCL9 medikamentös zu erhöhen, liefert die

präklinische Studie von Peng und Kollegen (Michigan, USA). Hier wurde gezeigt, dass ein epigenetisches *Silencing* mittels DNA-Methylierung als neuer Immunevasions-Mechanismus die intratumorale Sekretion von Chemokinen wie CXCL9 und CXCL10, sowie die Infiltration von Effektor T-Zellen unterdrücken kann. Durch eine Behandlung mit epigenetischen Modulatoren konnten die unterdrückten Vorgänge wiederhergestellt werden, was sowohl zu einer verlangsamten Tumorprogression, als auch zu einem verbesserten Ansprechen einer Checkpoint-Blockade mit anti-PD-L1 führte (Peng D. et al., 2015a). Die Effizienz der Kombination aus epigenetischen Modulatoren und Immuncheckpoint-Blockade befindet sich daher aktuell in der klinischen Testung (Guadecitabin und Atezolizumab in Phase I/IIb, NCT03206047). Eine weitere Möglichkeit, um eventuell auch bei *Brca*-mutierten Ovarialkarzinomen ein Ansprechen auf die ICB zu ermöglichen, wäre eine dreifache Kombinationstherapie aus VEGF-Inhibition, PARP-Inhibition und Immuncheckpoint-Blockade. Diese würde zum einen die Immunaktivierung im Ovarialkarzinom erhöhen und zum anderen den immunsuppressiven Resistenzmechanismen entgegenwirken. In der MEDIOLA-Studie, die diese Dreifachkombination getestet hatte, zeigten sich in einem durchaus stark vorbehandelten, BRCA-nicht mutierten Patientinnenkollektiv eine im Vergleich zu anderen Therapien sehr vielversprechende Ansprechrate von 87%. Die Tatsache, dass ein bedeutender Anteil der T-Zellen mindestens zwei Immuncheckpoints exprimiert und somit unter Inhibition eines Checkpoints den anderen hochregulieren kann, betont zudem die Notwendigkeit weiterer Studien mit dualer ICB (Duraiswamy et al., 2013; Huang et al., 2017). Präklinische Daten aus dem Coukus Labor (Lausanne, Schweiz) lieferten hierzu vielversprechende Ergebnisse in ID8*Trp53*^{-/-}*Brca1*^{-/-} Tumoren: Im Vergleich zu den Monotherapiearmen wurde die beste Tumorwachstums-Suppression durch PARP-Inhibition, dualer ICB und anti-VEGF Therapie zusammen erreicht (Bruand et al., 2021).

Einer der wichtigsten Punkte bleibt dennoch die Frage nach dem richtigen *Timing* der Immuncheckpoint-Blockade. Die Beobachtung, dass unter Chemotherapie die Immuninfiltration des Tumors angehoben wird (Yaniz et al., 2020), legt hierbei einen zeitnahen Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren nahe. Das Chemokin CXCL9 würde als Biomarker den entscheidenden Vorteil bringen, dass zum Zeitpunkt einer positiven Analyse sehr wahrscheinlich bereits der limitierende Faktor einer ausreichenden Immuninfiltration für ein verbessertes Überleben und Ansprechen auf eine Immuncheckpoint-Blockade erreicht wurde.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Studie *in vitro* sowohl mit murinen als auch mit humanen Zellen gezeigt, dass durch eine Cxcl9-Überexpression bzw. durch die Zugabe von rekombinantem humanen CXCL9 keine Hochregulation von PD-L1 auf den Tumorzellen erkennbar ist. Andere Gruppen (Chow et al., 2019; Peng D. et al., 2015b) hatten gezeigt, dass in der umgekehrten Reihenfolge eine Blockade des PD-1/PD-L1-Checkpoints die Cxcl9-Expression erhöht. Diesen vermuteten Effekt konnten wir im Aszites der PD-L1 therapierten Leervektor-Gruppe allerdings weder im *Brca2*-Wildtyp, noch im *Brca2*-Knockout Modell nachweisen. Lediglich die Cxcl9-überexprimierende PD-L1-Gruppe im *Brca2*-Wildtyp-Modell zeigte im Aszites einen Trend hin zu mehr löslichem Cxcl9. Hier sind demnach weitere Untersuchungen, auch beim Menschen, notwendig.

3. Duale Rolle von CX3CL1 bei der Immuninfiltration und Metastasierung

Im vorliegenden Projekt wurde durch eine immunhistochemische Färbung des HGSO-Collektivs der Technischen Universität München beobachtet, dass Patientinnen mit einer starken intratumoralen Expression von CX3CL1 einen signifikanten medianen Überlebensnachteil von 17 Monaten hatten. Auch bereits veröffentlichte Studien unterstützen die tumorfördernde Wirkung des CX3CL1/CX3CR1 Systems: Im Ovarialkarzinom wurde die Expression des Chemokinrezeptors CX3CR1 mit einem verschlechterten Überleben in Verbindung gebracht (Main et al., 2017). In weiteren Entitäten wie beispielsweise beim Prostatakarzinom oder beim Brustkrebs ist das CX3CL1/CX3CR1-System zudem mit einer erhöhten Metastasierung vergesellschaftet (Jamieson-Gladney et al., 2011; Jamieson et al., 2008).

Im hier verwendeten syngenesischen Mausmodell wurde weiterhin untersucht, ob Cx3cl1 tatsächlich funktionell tumorfördernd wirkt oder ob es auch gegenläufige Effekte durch Rekrutierung tumorsuppressiver Lymphozyten gibt. In Übereinstimmung mit den Überlebensdaten beim Menschen konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass eine Cx3cl1-Überexpression im metastasierten Modell zu einem signifikanten Überlebensnachteil führt. Obwohl weitere Analysen ähnlich hohe Cx3cl1-Konzentrationen in den Aszitesproben beider Gruppen ergaben, konnte in der Cx3cl1-Gruppe dennoch eine signifikant höhere Anzahl an infiltrierten T-Lymphozyten festgestellt werden. Entgegen der Annahme, dass Cx3cl1 die Tumorpherifation *per se* fördern kann (Gaudin et al., 2011), wurden in der vorliegenden Studie keine

Unterschiede im Ki67-Proliferationsstatus zwischen beiden Gruppen gemessen. Da sich der Überlebensnachteil der Cx3cl1-Gruppe nach intraperitonealer Inokulation der Tumorzellen in athymische Nacktmäuse sogar noch weiter erhöhte, ist davon auszugehen, dass das adaptive Immunsystem im immunkompetenten Modell tatsächlich gegenläufig zur tumor-progressiven Komponente des Chemokins agiert.

Des Weiteren spielt die membranständige Form des CX3CL1-Chemokins als Andockstelle für CX3CR1-positive Tumorzellen womöglich eine entscheidende Rolle für den insgesamt negativen Einfluss auf das Überleben. Es war bereits zuvor gezeigt worden, dass der CX3CR1-Rezeptor in epithelialen Ovarialkarzinom-Zelllinien exprimiert wird und für die Adhäsion an peritoneale Mesothelzellen erforderlich ist. In humanem Gewebe wurde zudem gemessen, dass 64% der getesteten Läsionen eine CX3CR1-Expression aufwiesen (Kim M. et al., 2012). Auch wenn es bei unseren murinen immunhistochemischen Auswertungen keinen Unterschied in der intratumoralen Cx3cr1-Expression zwischen der Cx3cl1-überexprimierenden Gruppe und der Kontrollgruppe gab, war die Expression des Rezeptors bei jedem analysierten mesenterialen Tumorgewebe vorhanden und könnte somit eine Rolle bei der Metastasierung gespielt haben. Die Barbolina-Gruppe griff diesen Gedanken bereits weiter auf und konnte durch Herunterregulation von Cx3cr1 die Metastasenlast in Peritoneum und Zwerchfell reduzieren (Main et al., 2017). Da sie in Übereinstimmung zu den IHC-Daten in unserem humanen Kollektiv im präklinischen Modell ebenfalls mehr Cx3cl1 im Peritoneum und im Zwerchfell gefunden hatten als im Omentum, erscheint es plausibel, dass die Metastasierung Cx3cr1-positiver Tumorzellen an diesen Stellen von der vorhandenen Cx3cl1-Expression abhängig ist.

Ein weiterer Faktor, der in der hier vorliegenden Studie zur tumorfördernden Eigenschaft von Cx3cl1 im Ovarialkarzinom beitragen könnte, ist die beobachtete signifikant höhere Makrophagenrekrutierung in der Cx3cl1-Gruppe im immunkompetenten Mausmodell. Bereits zuvor wurde CX3CL1 eine Rolle bei der Makrophagenchemotaxis in Tumoren zugeschrieben (Balkwill, 2004; Dreyer et al., 2021; Medina-Contreras et al., 2011). Interessant war allerdings bei unserem Experiment, dass der signifikante Unterschied zwischen der Cx3cl1-überexprimierenden Gruppe und der Kontrollgruppe hinsichtlich des intratumoralen Makrophagenanteils im immunkompromittierten System verloren gegangen ist, während die Cx3cl1-Gruppe weiterhin ein signifikant schlechteres Überleben aufwies. Dies spricht dafür, dass zur Cx3cl1-vermittelten Makrophagen-Infiltration auch eine

Beteiligung des adaptiven Immunsystems nötig ist, und dass die Makrophagen ebenfalls nicht der ausschlaggebende Effekt für das verschlechterte Überleben zu sein scheinen. Die dennoch naheliegende Idee einer Makrophagen-Depletion führte im ID8-fLuc Ovarialkarzinom-Modell einer anderen Arbeitsgruppe sowohl durch die Therapie mit Clodronat-Liposomen, als auch durch einen CSF-1-Antikörper allerdings sogar zu einem verschlechterten Überleben (Baert et al., 2019). Als mögliche Erklärung wurde hier ein zu starker Eingriff in die Homöostase des Tumormikromilieus durch eine radikale Makrophagen-Depletion angesetzt. Unsere eigenen weiterführenden Analysen zur Rolle des angeborenen Immunsystems im immunkompetenten Ovarialkarzinom-Modell ergaben überraschend niedrige Anteile an immun-suppressiven M2-Makrophagen und myeloiden Suppressorzellen (MDSCs) im Tumormilieu. Beide Zelltypen waren zudem in ihrer Anzahl nicht signifikant unterschiedlich zwischen Leervektor- und Cx3cl1-Gruppe.

Um die Rolle des Cx3cl1-Chemokins außerhalb des spezifischen Peritonealmilieus untersuchen zu können, wurden Luciferase-exprimierende ID8*Trp53*^{-/-}*SFeGFPluc* Zellen mit Cx3cl1-Überexpression subkutan injiziert. Da im Kolorektalkarzinom beschrieben wurde, dass eine Ko-Expression von CX3CR1 und CX3CL1 die Tumorzellen im Primärtumor zurückhielt und weitergehend zu einer verringerten Metastasierung und einem verlängerten Überleben führte (Erreni et al., 2016), wurde im vorliegenden subkutanen Modell womöglich ein protektiver Faktor bedeutsam. Tatsächlich drehten sich verglichen zum intraperitonealen Modell die Überlebenskurven im subkutanen Experiment um und die Cx3cl1-Gruppe zeigte eine signifikant langsamere Tumorprogression, sowie ein signifikant verbessertes medianes Überleben. Zudem konnte die Anzahl an tumorinfiltrierenden zytotoxischen T-Zellen in der Cx3cl1-Gruppe signifikant erhöht werden. Die absoluten Werte lagen dabei nahe an den gemessenen Medianen im metastasierten, intraperitonealen Modell. Es erscheint plausibel, dass dieser Effekt in beiden Modellen vergleichbar ist und sich positiv auf das Überleben auswirkt, während die gegenläufige tumorförderliche Komponente der Cx3cl1-Expression im subkutanen Modell seinen Effekt verliert. Der Anteil der Makrophagen lag dabei im subkutanen Modell immer noch knapp unter den gemessenen Medianen im intraperitonealen Experiment, wobei sich allerdings keine Unterschiede zwischen der Leervektor- und Cx3cl1-Gruppe ergaben. Übereinstimmend mit der Tatsache, dass die Tumore subkutan viel langsamer gewachsen sind als im intraperitonealen Modell, war der Anteil an Ki67-positiven Zellen im subkutanen

Modell geringer. Auch hier gab es zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Natürlich limitiert sich die Aussagekraft des subkutanen Experiments durch die Tatsache, dass hier prinzipiell eine andere Zusammensetzung des Tumorstromas vorliegt als dies normalerweise im intraperitonealen (orthotopen) Modell der Fall ist (Doo et al., 2019). Dennoch könnten genau die im subkutanen Modell fehlenden Komponenten die umgekehrten Nettoeffekte auf das Überleben im intraperitonealen Modell erklären.

Es sind also weitere Untersuchungen nötig, wie man den tumor-fördernden Anteil der CX3CL1/CX3CR1-Achse im Ovarialkarzinom durchbrechen könnte. Da in unserem *in vitro* Experiment unter PARP-Inhibition von OV-MZ-6 Zellen mehr lösliches CX3CL1 sezerniert wurde, könnte dieser bisher unbekannte Nebeneffekt einer Erhaltungstherapie mit Olaparib oder Niraparib durch den Einfluss des löslichen Chemokins auf die Immuninfiltration die positive Komponente des CX3CL1-Systems verstärken. Vielversprechend erscheint zudem eine Blockade des CX3CR1-Rezeptors, der von mindestens einem Viertel der Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom stark exprimiert wird und mit einem verschlechterten Überleben korreliert (Main et al., 2017). Beim therapeutischen Einsatz eines CX3CR1-Antagonisten in einer präklinischen Brustkrebsstudie wurde die Metastasierung von CX3CR1-positiven Tumorzellen bereits erfolgreich eingedämmt (Shen F. et al., 2016). Eine andere Gruppe erreichte durch ein humanes CX3CL1-Analogon eine effizient reduzierte Zelladhäsion der CX3CR1/L1-Achse, sowie auch eine Inhibition der Makrophagen-Ansammlung in einem murinen Modell von Peritonitis (Dorgham et al., 2009). Vor allem durch die zwei zuletzt genannten Faktoren klingt eine Blockade des CX3CR1-Rezeptors auch für den Einsatz im Ovarialkarzinom sinnvoll, doch es ist zu beachten, dass dann auch der protektive Mechanismus der CX3CL1-vermittelten Chemotaxis auf CX3CR1-positiv Immunzellen ungewollt gehemmt werden würde. Um diesen Teil dennoch aufrecht zu erhalten, müsste man einen Weg finden, wie man ausschließlich die membranständige Komponente des CX3CL1-Chemokins blockieren könnte, während die lösliche Form weiterhin, wie in der vorliegenden Studie gezeigt, zu einem verbesserten Immuninfiltrat und somit zu einem verbesserten Überleben führen kann.

Dem Chemokin CX3CL1 ist im Ovarialkarzinom also durchaus eine protektive Rolle durch eine verbesserte T-Zellinfiltration mittels Chemotaxis zuzusprechen, während sich der Nettoeffekt im metastasierten Modell allerdings auf die negative Seite verlagert und möglicherweise durch die vermehrt vorhandenen membranständigen „CX3CL1-

Andockstellen“ für CX3CR1-positive Tumorzellen an peritonealen Mesothelzellen die Tumorprogression verstärken könnte.

IX. AUSBLICK

Trotz zahlreicher Schritt-für-Schritt-Erfolge im letzten Jahrzehnt bleibt eine wichtige Rationale für eine erfolgreiche Eindämmung der Tumorprogression des Ovarialkarzinoms zum einen das Verständnis des vorherrschenden Immunmilieus und zum anderen die Identifikation von Subgruppen mit einem verbesserten Ansprechen auf bereits vorhandene und künftig verfügbare Therapieoptionen.

Die vorliegenden Daten schlagen CXCL9 als positive und klinisch relevante Komponente der anti-tumoralen Immunantwort sowie des Progressionsverlaufs im *high-grade* serösen Ovarialkarzinom vor. Unsere *in vivo* Experimente bestärken zudem durch den signifikanten Cxcl9-Effekt auf das Überleben im *Brca2*-Wildtyp-Modell im Vergleich zum *Brca2*-mutierten Modell die Bedeutung der Stratifizierung von HR-profizienten und HR-defizienten Subgruppen bei klinischen Studien. Insbesondere im Hinblick auf die Prädiktion einer erfolgreichen Immuncheckpoint-Blockade beim Ovarialkarzinom könnte CXCL9 ein geeigneter Kandidat sein. Im Gegensatz dazu wurde für das Chemokin CX3CL1 trotz einer möglichen Verbesserung der intratumoralen Immuninfiltration eine negativ-prognostische Rolle im humanen Ovarialkarzinom gefunden. Die Bedeutung der membranständigen CX3CL1-Form bei der Tumorprogression und Rezidivbildung bleibt dabei Gegenstand der laufenden Forschung.

Um unsere Hypothesen künftig zu stärken, sollte CXCL9 als prädiktiver Biomarker in verschiedenen Kollektiven unter Immuncheckpoint-Blockade validiert werden. Dabei sollte besonders darauf geachtet werden, ob der im Mausmodell gezeigte Einfluss des *Brca*-Mutationsstatus auf den Therapieerfolg der ICB klinisch bestätigt werden kann. Weiterhin muss final aufgeklärt werden, welcher adverse Effekt im Cx3cl1-Überexpressionsmodell der Cx3cl1-vermittelten anti-tumoralen Immunantwort entgegenwirkt. Hierbei sollte neben weiteren Tumorzell-Analysen ein besonderes Augenmerk auf immun-suppressive Komponenten wie tumor-assoziierte Makrophagen und auf die membranständige Cx3cl1-Expression im Peritonealmilieu gelegt werden.

X. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADAM10/17	A disintegrin and metalloprotease 10/17
Akt	Proteinkinase B
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BRAF	B-Raf Proto-Oncogen, Serin/Threonin Kinase
BRCA1/2	Breast cancer 1/2
BSA	Bovines Serumalbumin
CA125	Cancer-Antigen 125; Serummarker; steht für das Protein Mucin-16
Ca ²⁺	Calciumionen
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CI	Konfidenzintervall
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF-1	Colony stimulating factor 1
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CX3CL1	CX3C chemokine ligand 1 / Fraktalkine
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
CXCL9/MIG	CXC chemokine ligand 9 / Monokine induced by interferon-gamma
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial-zu-mesenchymal Transformation
F4/80	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
FACS	Fluorescence activated cell signaling
FCS	Fötales Kälberserum
FFPE	Formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue

FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GAGs	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GPCRs	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosintriphosphat
HGSOC	High-grade seröses Ovarialkarzinom
HPF	High power field
Hprt	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HR	Homologe Rekombination
HRP	Horseradish-Peroxidase
IFN γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
IL-6/10	Interleukin 6/10
IP ₃	Inositoltriphosphat
JAK	Janus-Kinase
K-RAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
Kan	Kanamycin
LB-Agar	Lysogeny broth Agar
Ly6	Lymphocyte antigen 6 complex
LV	Leervektor
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MAP	Mitogen-activated protein
MDSC	Myeloide Suppressorzelle
MET	Mesenchymal-zu-epithelial Transformation
MHCI/II	Histokompatibilitäts-Komplex-Moleküle
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NAD ⁺	Oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
Neo	Neomycin
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OS	Overall Survival
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1

PD-L1/2	Programmed cell death protein ligand 1/2
PFS	Progressionsfreies Überleben
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol-Triphosphat
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RAD51C	RAD51 Paralog C
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationsassaypuffer
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SR-A	Scavenger Receptor A
STAT	Signal transducers and activators of transcription
STIC	Serous tubal intraepithelial carcinoma
STING	Stimulator of interferon genes
TAM	Tumor-assoziiertes Makrophage
TAPI-2	TNF protease inhibitor 2
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF β	Transforming growth factor beta
TIF	Tagged image files
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TMA	Tissue Microarray
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TNM	Tumor, lymph node, metastasis
TP53/Trp53	Tumor protein P53
Tregs	Regulatorische T-Zellen
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1

XI. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Demografische und klinisch-pathologische Parameter der Patientinnen mit <i>high-grade</i> serösem Ovarialkarzinom (n=219).....	29
Tabelle 2: Demografische und klinisch-pathologische Parameter von Patientinnen mit unterschiedlichen histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms (n=95).	30
Tabelle 3: Univariate Cox-Regressionsanalyse der klinischen Überlebensdaten bei Patientinnen mit high-grade serösem Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) im Hinblick auf klinische Parameter und CX3CL1-Expression im Primärtumor.....	87
Tabelle 4: Multivariate Cox-Regressionsanalyse der klinischen Überlebensdaten bei Patientinnen mit high-grade serösem Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) im Hinblick auf klinische Parameter und CX3CL1-Expression im Primärtumor.....	88

XII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Prozentualer Anteil verschiedener Ovarialkarzinom-Subtypen	4
Abbildung 2: Potenzielle zelluläre Ursprünge verschiedener Ovarialkarzinome	7
Abbildung 3: Die Veränderung des kolloidosmotischen Drucks durch Läsionen im Mesothel und die Permeabilisierung des Endothels führt zur Bildung von Bauchwasser (Aszites).	9
Abbildung 4: Prinzip der synthetischen Letalität durch PARP-Inhibition bei <i>BRCA</i> -mutierten Zellen.	12
Abbildung 5: Checkpoint Inhibition der T-Zell-vermittelten Immunantwort.....	19
Abbildung 6: <i>Downstream</i> -Signalisierung eines G-Protein gekoppelten Chemokinrezeptors.....	21
Abbildung 7: Hypothese der verbesserten Immunzellinfiltration durch Chemokingradienten zwischen intratumoralem CXCL9 / CX3CL1 und den CXCR3 / CX3CR1 Rezeptoren auf zytotoxischen T-Lymphozyten.....	28
Abbildung 8: pSMPUW-Neo Lentiviral Expression Vector (Kanamycin-resistent), Cell Biolabs	50
Abbildung 9: CXCL9 stark gefärbte Fälle gibt es am häufigsten im klarzelligen Ovarialkarzinom	61
Abbildung 10: ID8-Zellen mit <i>Trp53</i> - (und) <i>Brca2</i> -Knockout zeigen eine vergleichbare Proliferation	62
Abbildung 11: Erfolgreiche <i>Cxcl9</i> Überexpression in <i>ID8Trp53^{-/-}</i> Zellen	63
Abbildung 12: Erfolgreiche <i>Cxcl9</i> Überexpression in <i>ID8Trp53^{-/-}Brca2^{-/-}</i> Zellen	64
Abbildung 13: Syngenes Mausmodell mit <i>Cxcl9</i> Überexpression im <i>Brca2</i> - Wildtyp Modell	65
Abbildung 14: <i>Cxcl9</i> verlängert das Überleben im <i>Brca2</i> Wildtyp Modell.....	65
Abbildung 15: <i>Cxcl9</i> -Überexpression ist im <i>Brca2</i> -Wildtyp- Ovarialkarzinommausmodell auch im Aszites der Versuchstiere nachweisbar	66
Abbildung 16: <i>Cxcl9</i> erhöht die Infiltration zytotoxischer T-Zellen im <i>Brca2</i> -nicht mutierten ID8-Ovarialkarzinommodell	67
Abbildung 17: <i>Cxcl9</i> senkt die Infiltration F4/80-positiver Makrophagen im <i>Brca2</i> -nicht mutierten ID8-Ovarialkarzinommodell A) Beispielfotos zur immunhistochemischen Färbung CD49b-positiver natürlicher Killerzellen,	

F4/80-positiver Makrophagen und Ki67-positiver, proliferierender Tumorzellen (Balkenlänge 50 µm). B) Zugehörige digitale Auswertung der positiven Zellen mit Angabe als Prozent aller Zellen im Tumor. Jeder Punkt stellt den Mittelwert eines Tumorgewebes mit fünf ausgewerteten Regionen dar. Innerhalb einer Gruppe ist der Median gezeigt. Statistischer Vergleich mittels T-Test.	68
Abbildung 18: <i>Heatmap</i> , die die Korrelation von Überlebenszeit, Cxcl9-Konzentration im Aszites und T-zellulärem Infiltrat zeigt.	69
Abbildung 19: Immunkompromittiertes Mausmodell zur Untersuchung der Abhängigkeit Cxcl9-vermittelter Effekte vom adaptiven Immunsystem A) Versuchsaufbau mit sieben <i>athymic nude</i> Mäusen pro Gruppe. B) Beispielfotos nach Erreichen der Abbruchkriterien mit hämorrhagischem Aszites und Tumorknoten in Peritoneum, Mesenterium und Zwerchfell.	70
Abbildung 20: Cxcl9 hat keinen Effekt auf das Überleben im immunkompromittierten Tiermodell.	70
Abbildung 21: Cxcl9-Überexpression im Aszites athymischer, tumortragender Versuchstiere.	71
Abbildung 22: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Rolle von Cxcl9 im syngenem, <i>Brca2</i> -defizienten Ovarialkarzinommodell.	71
Abbildung 23: Cxcl9 verliert den signifikanten, tumor-suppressiven Effekt im <i>Brca2</i> -defizienten Ovarialkarzinommausmodell.	72
Abbildung 24: Cxcl9-Überexpression im Aszites von Mäusen mit <i>Brca2</i> -defizienten Tumoren.	73
Abbildung 25: Cxcl9 verursacht keine verbesserte T-Zell-Infiltration im <i>Brca2</i> -defizienten ID8-Ovarialkarzinommausmodell.	73
Abbildung 26: Im <i>Brca2</i> -defizienten Ovarialkarzinommodell zeigen sich keine signifikanten Korrelationen zwischen Gesamtüberleben, Cxcl9-Konzentration und TILs.	74
Abbildung 27: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Cxcl9-Wirkung auf den Erfolg einer anti-PD-L1-Therapie im syngenem <i>Brca</i> -Wildtyp-Ovarialkarzinommausmodell.	75
Abbildung 28: Cxcl9-Überexpression ermöglicht eine erfolgreiche Immuncheckpoint-Therapie (anti-PD-L1) im syngenem, <i>Brca</i> -Wildtyp-Ovarialkarzinommausmodell.	76
Abbildung 29: Cxcl9 und Cxcl10 im Aszites von <i>Brca2</i> -Wildtyp-tumortragenden	

Mäusen	77
Abbildung 30: Erhöhte Infiltration zytotoxischer T-Zellen durch Cxcl9 flacht unter anti-PD-L1-Therapie ab.	77
Abbildung 31: Anti-PD-L1-Therapie senkt den intratumoralen Proliferationsstatus im <i>Brca2</i> -nicht defizienten Ovarialkarzinommausmodell	78
Abbildung 32: Versuchsschema zur Untersuchung des Einflusses einer Cxcl9-Überexpression auf die anti-PD-L1-Therapie im syngenem, <i>Brca2</i> -defizienten Ovarialkarzinommausmodell	79
Abbildung 33: Immuncheckpoint-Therapie mit anti-PD-L1 zeigt keinen signifikanten Überlebensvorteil im <i>Brca2</i> -defizienten Ovarialkarzinommodell.....	80
Abbildung 34: Cxcl9- und Cxcl10-Konzentrationen im Aszites von Mäusen aus anti-PD-L1/Placebo-behandelten, <i>Brca2</i> ^{-/-} -tumortragenden Mäusen.....	80
Abbildung 35: Cxcl9 führt zu keiner signifikant verbesserten T-Lymphozyten-Infiltration im <i>Brca2</i> -defizienten Ovarialkarzinommausmodell	81
Abbildung 36: Anti-PD-L1-Therapie hat keinen Einfluss auf intratumorale PD-1-, F4/80- oder Ki67-positive Zellen im <i>Brca2</i> -Knockout-Modell	82
Abbildung 37: Einfluss eines <i>Brca2</i> -Verlusts auf die Cxcl10-Asziteskonzentration und den Anteil PD-1-positiver tumorinfiltrierender Immunzellen.....	82
Abbildung 38: Der <i>Brca2</i> -Verlust bedingt eine signifikante Erhöhung CD3- bzw. CD8-positiver tumorinfiltrierender Lymphozyten	83
Abbildung 39: Cxcl9-überexprimierende Klonen zeigen auf RNA-Ebene keine erhöhte PD-L1-Expression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	84
Abbildung 40: Cxcl9 verursacht keine PD-L1-Induktion in murinen oder humanen Ovarialkarzinomzelllinien	85
Abbildung 41: CX3CL1 ist im HGSOE-Kollektiv mit einem signifikant schlechteren PFS und OS vergesellschaftet	86
Abbildung 42: CX3CL1 wird von murinen ID8 <i>Trp53</i> ^{-/-} -Zellen membranständig exprimiert und durch ADAM17 in eine lösliche Form abgespalten	89
Abbildung 43: Einfluss der PARP-Inhibitoren Niraparib und Olaparib auf die CX3CL1-Expression in verschiedenen humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien.....	90
Abbildung 44: Erfolgreiche Cx3cl1-Überexpression in ID8 <i>Trp53</i> ^{-/-} -Zellen.....	91
Abbildung 45: Syngenes Mausmodell mit Cx3cl1-Überexpression im intraperitonealen Versuchsansatz	92
Abbildung 46: Intratumorale Cx3cl1-Überexpression verschlechtert das	

Überleben in immunkompetenten C57BL/6-Mäusen nach intraperitonealer Tumorimplantation.....	92
Abbildung 47: Cx3cl1 Überexpression kann im mesenterialen Tumorgewebe nachgewiesen werden.....	93
Abbildung 48: Cx3cl1 erhöht die Infiltration zytotoxischer T-Zellen im intraperitoneal implantierten Ovarialkarzinommausmodell.....	94
Abbildung 49: Cx3cl1 erhöht die Makrophagen-Infiltration im intraperitoneal metastasierten Ovarialkarzinommausmodell	95
Abbildung 50: Immunkompromittiertes Mausmodell zur Untersuchung einer Cx3cl1-Überexpression nach intraperitonealer Tumorimplantation	95
Abbildung 51: Eine intratumorale Cx3cl1-Überexpression verschlechtert das Überleben im immunkompromittierten Tiermodell	96
Abbildung 52: Eine Cx3cl1-Überexpression kann im immunkompromittierten Mausmodell nicht im Aszites nachgewiesen werden und zeigt keinen Effekt auf die Makrophagen-Infiltration	97
Abbildung 53: Erfolgreiche Cx3cl1 Überexpression in ID8 <i>Trp53</i> ^{-/-} <i>SFeGFPluc</i> Zellen.....	98
Abbildung 54: Syngenes, subkutanen Mausmodell mit Cx3cl1-Überexpression Erläuterung des subkutanen Inokulationsschemas mit sechs C57BL/6-Mäusen pro Gruppe und 1x10 ⁷ Zellen in 250 µl PBS.....	98
Abbildung 55: Nicht-invasive Kontrolle des subkutanen Tumorwachstums.....	99
Abbildung 56: Eine intratumorale Cx3cl1-Überexpression verbessert das Überleben im ID8-Subkutanmodell	100
Abbildung 57: Cx3cl1 erhöht im subkutanen ID8-Modell die Infiltration von TILs und zeigt keinen Effekt auf die Makrophagen Infiltration	101

XIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Abastado (2012) The next challenge in cancer immunotherapy: controlling T-cell traffic to the tumor. *Cancer Research*, 72(9), 2159–2161.
- Abiko, Mandai, Hamanishi et al. (2013) PD-L1 on tumor cells is induced in ascites and promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through CTL dysfunction *Clinical Cancer Research*, 19(6), 1363–1374.
- Abiko, Matsumura, Hamanishi et al. (2015) IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer *British Journal of Cancer*, 112(9), 1501–1509.
- Ahmed, Etemadmoghadam, Temple et al. (2010) Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *The Journal of Pathology*, 221(1), 49–56.
- Alexandrov, Nik-Zainal, Wedge et al. (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463), 415–421.
- Alsop, Fereday, Meldrum et al. (2012) BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(21), 2654–2663.
- Amé, Spenlehauer & de Murcia (2004) The PARP superfamily. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 26(8), 882–893.
- Ashworth (2008) A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(22), 3785–3790.
- Atefi, Avramis, Lassen et al. (2014) Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(13), 3446–3457.
- Au, Peterson, Truesdell et al. (2017) CXCL10 alters the tumour immune microenvironment and disease progression in a syngeneic murine model of high-

- grade serous ovarian cancer *Gynecologic Oncology*, 145(3), 436–445.
- Auersperg, Wong, Choi et al. (2001) Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews*, 22(2), 255–288.
- Baert, Vankerckhoven, Riva et al. (2019) Myeloid derived suppressor cells: Key drivers of immunosuppression in ovarian cancer *Frontiers in Immunology*, 10(JUN).
- Balkwill (2004) Cancer and the chemokine network *Nature Reviews Cancer*, 4(7), 540–550.
- Bankhead, Loughrey, Fernández et al. (2017) QuPath: Open source software for digital pathology image analysis *Scientific Reports*, 7(1), 1–7.
- Bazan, Bacon, Hardiman et al. (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385(6617), 640–644.
- Beral, Bull, Green et al. (2007) Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet (London, England)*, 369(9574), 1703–1710.
- Billottet, Quemener & Bikfalvi (2013) CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1836(2), 287–295.
- Bindea, Mlecnik, Tosolini et al. (2013) Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*, 39(4), 782–795.
- Bolton, Chenevix-Trench, Goh et al. (2012) Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA*, 307(4), 382–390.
- Bowtell, Böhm, Ahmed et al. (2015) Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 15(11), 668–679.
- Boyd & Muggia (2018) Carboplatin/Paclitaxel Induction in Ovarian Cancer: The Finer Points. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 32(8), 418-420,422-424.
- Brahmer, Tykodi, Chow et al. (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England Journal of Medicine*, 366(26), 2455–2465.
- Brinton, Sakoda, Sherman et al. (2005) Relationship of benign gynecologic diseases to subsequent risk of ovarian and uterine tumors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers*

- & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(12), 2929–2935.
- Bristow, Chang, Ziogas et al. (2014) High-volume ovarian cancer care: survival impact and disparities in access for advanced-stage disease. *Gynecologic Oncology*, 132(2), 403–410.
- Bronger (2021) Immunology and Immune Checkpoint Inhibition in Ovarian Cancer – Current Aspects *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*.
- Bronger, Singer, Windmüller et al. (2016) CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer *British Journal of Cancer*, 115(5), 553–563.
- Bronger, Karge, Dreyer et al. (2017) Induction of cathepsin B by the CXCR3 chemokines CXCL9 and CXCL10 in human breast cancer cells *Oncology Letters*, 13(6), 4224–4230.
- Bronger, Magdolen, Goettig et al. (2019) Proteolytic chemokine cleavage as a regulator of lymphocytic infiltration in solid tumors *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(3), 417–430.
- Bruand, Barras, Mina et al. (2021) Cell-autonomous inflammation of BRCA1-deficient ovarian cancers drives both tumor-intrinsic immunoreactivity and immune resistance via STING *Cell Reports*, 36(3).
- Budczies, von Winterfeld, Klauschen et al. (2015) The landscape of metastatic progression patterns across major human cancers. *Oncotarget*, 6(1), 570–583.
- Burger, Sill, Monk et al. (2007) Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(33), 5165–5171.
- Burnett, Kershen, Zhang et al. (2004) Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene *Journal of Leukocyte Biology*, 75(4), 612–623.
- Buys, Partridge, Black et al. (2011) Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 305(22), 2295–2303.

- Cancer Genome Atlas Research Network (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474(7353), 609–615.
- Cassetta & Kitamura (2018) Targeting tumor-associated macrophages as a potential strategy to enhance the response to immune checkpoint inhibitors *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(APR), 1–6.
- Chang, Bristow, Chi et al. (2015) Role of aggressive surgical cytoreduction in advanced ovarian cancer. *Journal of Gynecologic Oncology*, 26(4), 336–342.
- Chen & Mellman (2013) Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle *Immunity*, 39(1), 1–10.
- Chen & Mellman (2017) Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637), 321–330.
- Chi, Musa, Dao et al. (2012) An analysis of patients with bulky advanced stage ovarian, tubal, and peritoneal carcinoma treated with primary debulking surgery (PDS) during an identical time period as the randomized EORTC-NCIC trial of PDS vs neoadjuvant chemotherapy (NACT). *Gynecologic Oncology*, 124(1), 10–14.
- Chin, Fares, Campos et al. (2020) Association of PD-L1 expression by immunohistochemistry and gene microarray with molecular subtypes of ovarian tumors. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 33(10), 2001–2010.
- Chow, Ozga, Servis et al. (2019) Intratumoral Activity of the CXCR3 Chemokine System Is Required for the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy *Immunity*, 50(6), 1498-1512.e5.
- Clark & Malcangio (2012) Microglial signalling mechanisms: Cathepsin S and Fractalkine. *Experimental Neurology*, 234(2), 283–292.
- Colombo, Fabbro, Theillet et al. (2014) Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 89(2), 207–216.
- Colvin, Campanella, Sun et al. (2004) Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30219–30227.

- Combadiere, Salzwedel, Smith et al. (1998) Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 23799–23804.
- Cook & Hagemann (2013) Tumour-associated macrophages and cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(4), 595–601.
- Cortez-Retamozo, Etzrodt, Newton et al. (2012) Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2491–2496.
- Crayford, Campbell, Bourne et al. (2000) Benign ovarian cysts and ovarian cancer: a cohort study with implications for screening. *Lancet (London, England)*, 355(9209), 1060–1063.
- Curtin & Szabo (2013) Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(6), 1217–1256.
- Dagan-Berger, Feniger-Barish, Avniel et al. (2006) Role of CXCR3 carboxyl terminus and third intracellular loop in receptor-mediated migration, adhesion and internalization in response to CXCL11. *Blood*, 107(10), 3821–3831.
- Dantzer, de La Rubia, Ménissier-De Murcia et al. (2000) Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*, 39(25), 7559–7569.
- Darash-Yahana, Pikarsky, Abramovitch et al. (2004) Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(11), 1240–1242.
- Datta, Flaxenburg, Laxmanan et al. (2006) Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Research*, 66(19), 9509–9518.
- Davis, Tinker & Friedlander (2014) “Platinum resistant” ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit? *Gynecologic Oncology*, 133(3), 624–631.
- Denkert, von Minckwitz, Brase et al. (2015) Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human

- epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(9), 983–991.
- Ding, Kim, Wang et al. (2018) PARP Inhibition Elicits STING-Dependent Antitumor Immunity in Brca1-Deficient Ovarian Cancer *Cell Reports*.
- Disis, Taylor, Kelly et al. (2019) Efficacy and Safety of Avelumab for Patients With Recurrent or Refractory Ovarian Cancer: Phase 1b Results From the JAVELIN Solid Tumor Trial. *JAMA Oncology*, 5(3), 393–401.
- Doo, Norian & Arend (2019) Checkpoint inhibitors in ovarian cancer: A review of preclinical data *Gynecologic Oncology Reports*, 29, 48–54.
- Dorgham, Ghadiri, Hermand et al. (2009) An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(4), 903–911.
- Dreyer, Kuhn, Stange et al. (2021) The Chemokine CX3CL1 Improves Trastuzumab Efficacy in HER2 Low-Expressing Cancer In Vitro and In Vivo. *Cancer Immunology Research*.
- Dufour, Dziejman, Liu et al. (2002) IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(7), 3195–3204.
- Duluc, Delneste, Tan et al. (2007) Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood*, 110(13), 4319–4330.
- Durai & Murphy (2016) Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity*, 45(4), 719–736.
- Duraiswamy, Kaluza, Freeman et al. (2013) Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors *Cancer Research*, 73(12), 3591–3603.
- Dutta & Li (2013) Role of the JAK-STAT Signalling Pathway in Cancer *ELS*, 6, 1–9.
- Ehlert, Addison, Burdick et al. (2004) Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(10), 6234–6240.

- Erreni, Siddiqui, Marelli et al. (2016) The Fractalkine-Receptor Axis Improves Human Colorectal Cancer Prognosis by Limiting Tumor Metastatic Dissemination *The Journal of Immunology*, 196(2), 902–914.
- Evrard, Chong, Devi et al. (2015) Visualization of bone marrow monocyte mobilization using Cx3cr1 gfp/+ Flt3L ^{-/-} reporter mouse by multiphoton intravital microscopy *Journal of Leukocyte Biology*, 97(3), 611–619.
- Fang, Zhou, Shi et al. (2021) Progranulin induces immune escape in breast cancer via up-regulating PD-L1 expression on tumor-associated macrophages (TAMs) and promoting CD8(+) T cell exclusion. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 40(1), 4.
- Fathalla (1972) Factors in the Causation and Incidence of Ovarian Cancer.pdf *Obstet. Gynecol. Surv.*, 27, 751–768.
- Ferlay, Soerjomataram, Dikshit et al. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-86.
- Fernandez & Lolis (2002) Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42, 469–499.
- Fleming, Beaugié, Haviv et al. (2006) Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses *Molecular and Cellular Endocrinology*, 247(1–2), 4–21.
- Fotopoulou & Herzog (2018) *Fast Facts: Ovariakarzinom*. Karger.
- Freedman, Deavers, Liu et al. (2004) Peritoneal inflammation - A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC). *Journal of Translational Medicine*, 2(1), 23.
- Fujita, Takada & Takada (2014) The chemokine fractalkine can activate integrins without CX3CR1 through direct binding to a ligand-binding site distinct from the classical RGD-binding site. *PloS One*, 9(5), e96372.
- Furuya, Yoneyama, Miyagi et al. (2011) Differential expression patterns of CXCR3 variants and corresponding CXC chemokines in clear cell ovarian cancers and endometriosis. *Gynecologic Oncology*, 122(3), 648–655.
- Gaillard, Secord & Monk (2016) The role of immune checkpoint inhibition in the

- treatment of ovarian cancer *Gynecologic Oncology Research and Practice*, 3(1), 1–14.
- Galon & Bruni (2019) Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(3), 197–218.
- Gardner, Catterall, Jones et al. (1996) Human ovarian tumour cells can bind hyaluronic acid via membrane CD44: a possible step in peritoneal metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 14(4), 325–334.
- Garton, Gough, Blobel et al. (2001) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *The Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 37993–38001.
- Gaudin, Nasreddine, Donnadieu et al. (2011) Identification of the Chemokine CX3CL1 as a new regulator of Malignant cell proliferation in Epithelial Ovarian cancer *PLoS ONE*, 6(7).
- Genecards (2021) CXCL9 Gene. Retrieved from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL9&keywords=CXCL9>
- George, Alsop, Etemadmoghadam et al. (2013) Nonequivalent gene expression and copy number alterations in high-grade serous ovarian cancers with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(13), 3474–3484.
- Gevrey, Isaac & Cox (2005) Syk is required for monocyte/macrophage chemotaxis to CX3CL1 (Fractalkine). *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(6), 3737–3745.
- Gilks, Ionescu, Kalloger et al. (2008) Tumor cell type can be reproducibly diagnosed and is of independent prognostic significance in patients with maximally debulked ovarian carcinoma. *Human Pathology*, 39(8), 1239–1251.
- Goff, Mandel, Melancon et al. (2004) Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *JAMA*, 291(22), 2705–2712.
- González-Martín, Pothuri, Vergote et al. (2019) Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 381(25), 2391–2402.

- Goode, Block, Kalli et al. (2017) Dose-Response Association of CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Survival Time in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *JAMA Oncology*, 3(12), e173290.
- Gorbachev, Kobayashi, Kudo et al. (2007) CXC chemokine ligand 9/monokine induced by IFN-gamma production by tumor cells is critical for T cell-mediated suppression of cutaneous tumors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(4), 2278–2286.
- Gordon (2003) Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews. Immunology*, 3(1), 23–35.
- Gordon, Maute, Dulken et al. (2017) PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*, 545(7655), 495–499.
- Gottlieb, Mills, Cross et al. (2017) Tumor-associated macrophage expression of PD-L1 in implants of high grade serous ovarian carcinoma: A comparison of matched primary and metastatic tumors. *Gynecologic Oncology*, 144(3), 607–612.
- Green, Monti, Rodig et al. (2010) Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*, 116(17), 3268–3277.
- Griffith, Sokol & Luster (2014) Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity *Annual Review of Immunology*, 32(1), 659–702.
- Groom & Luster (2011a) CXCR3 in T cell function *Experimental Cell Research*, 317(5), 620–631.
- Groom & Luster (2011b) CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunology and Cell Biology*, 89(2), 207–215.
- Groom, Richmond, Murooka et al. (2012) CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. *Immunity*, 37(6), 1091–1103.
- Gudmundsdottir & Ashworth (2006) The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*, 25(43), 5864–5874.

- Guo, Chen, Wang et al. (2003) Chemoattraction, adhesion and activation of natural killer cells are involved in the antitumor immune response induced by fractalkine/CX3CL1. *Immunology Letters*, 89(1), 1–7.
- Gurung, Hung, Morin et al. (2013) Molecular abnormalities in ovarian carcinoma: clinical, morphological and therapeutic correlates. *Histopathology*, 62(1), 59–70.
- Hacker (2013) State of the art of surgery in advanced epithelial ovarian cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 24 Suppl 1, x27-32.
- Hagemann, Wilson, Burke et al. (2006) Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(8), 5023–5032.
- Hamanishi, Mandai, Iwasaki et al. (2007) Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), 3360–3365.
- Hamanishi, Mandai, Ikeda et al. (2015) Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(34), 4015–4022.
- Hanahan & Weinberg (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Harris, Banigan, Christian et al. (2012) Generalized Lévy walks and the role of chemokines in migration of effector CD8⁺ T cells. *Nature*, 486(7404), 545–548.
- Harrison, Jiang, Chen et al. (1998) Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10896–10901.
- Hashimoto, Kamphorst, Im et al. (2018) CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions. *Annual Review of Medicine*, 69, 301–318.
- Haskell, Cleary & Charo (2000) Unique role of the chemokine domain of fractalkine in

- cell capture. Kinetics of receptor dissociation correlate with cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34183–34189.
- Haskill, Becker, Fowler et al. (1982) Mononuclear-cell infiltration in ovarian cancer. I. Inflammatory-cell infiltrates from tumour and ascites material. *British Journal of Cancer*, 45(5), 728–736.
- Hassel, Heinzerling, Aberle et al. (2017) Combined immune checkpoint blockade (anti-PD-1/anti-CTLA-4): Evaluation and management of adverse drug reactions. *Cancer Treatment Reviews*, 57, 36–49.
- Havrilesky, Moorman, Lowery et al. (2013) Oral contraceptive pills as primary prevention for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology*, 122(1), 139–147.
- Hicklin & Ellis (2005) Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(5), 1011–1027.
- Higgs, Morehouse, Streicher et al. (2018) Interferon Gamma Messenger RNA Signature in Tumor Biopsies Predicts Outcomes in Patients with Non-Small Cell Lung Carcinoma or Urothelial Cancer Treated with Durvalumab. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(16), 3857–3866.
- Hoeffel, Chen, Lavin et al. (2015) C-Myb⁺ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages *Immunity*, 42(4), 665–678.
- Holschneider & Berek (2000) Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Seminars in Surgical Oncology*, 19(1), 3–10.
- Howitt, Hanamornroongruang, Lin et al. (2015) Evidence for a dualistic model of high-grade serous carcinoma: BRCA mutation status, histology, and tubal intraepithelial carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 39(3), 287–293.
- Howitt, Strickland, Sholl et al. (2017) Clear cell ovarian cancers with microsatellite instability: A unique subset of ovarian cancers with increased tumor-infiltrating lymphocytes and PD-1/PD-L1 expression. *Oncoimmunology*, 6(2), e1277308.

- Howlader, Noone, Krapcho et al. (2015) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012. Retrieved from https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2012/,
- Huang, Francois, McGray et al. (2017) Compensatory upregulation of PD-1, LAG-3, and CTLA-4 limits the efficacy of single-agent checkpoint blockade in metastatic ovarian cancer. *Oncoimmunology*, 6(1), e1249561.
- Hundhausen, Misztela, Berkhout et al. (2003) The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, 102(4), 1186–1195.
- Hwang, Adams, Tahirovic et al. (2012) Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecologic Oncology*, 124(2), 192–198.
- Iwai, Sugimoto, Patil et al. (2021) Both T cell priming in lymph node and CXCR3-dependent migration are the key events for predicting the response of atezolizumab. *Scientific Reports*, 11(1), 13912.
- Jamieson-Gladney, Zhang, Fong et al. (2011) The chemokine receptor CX₃CR1 is directly involved in the arrest of breast cancer cells to the skeleton. *Breast Cancer Research : BCR*, 13(5), R91.
- Jamieson, Shimizu, D'Ambrosio et al. (2008) CX3CR1 is expressed by prostate epithelial cells and androgens regulate the levels of CX3CL1/fractalkine in the bone marrow: potential role in prostate cancer bone tropism. *Cancer Research*, 68(6), 1715–1722.
- Jiménez-Sánchez, Memon, Pourpe et al. (2017) Heterogeneous Tumor-Immune Microenvironments among Differentially Growing Metastases in an Ovarian Cancer Patient *Cell*, 170(5), 927–938.
- Jin & Hereld (2006) Moving toward understanding eukaryotic chemotaxis. *European Journal of Cell Biology*, 85(9–10), 905–913.
- Jordan, Green, Whiteman et al. (2007) Risk factors for benign, borderline and invasive mucinous ovarian tumors: epidemiological evidence of a neoplastic continuum? *Gynecologic Oncology*, 107(2), 223–230.
- Kalloger, Köbel, Leung et al. (2011) Calculator for ovarian carcinoma subtype prediction. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24(4), 512–521.

- Kalluri & Weinberg (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428.
- Karin & Wildbaum (2015) The Role of Chemokines in Shaping the Balance Between CD4(+) T Cell Subsets and Its Therapeutic Implications in Autoimmune and Cancer Diseases. *Frontiers in Immunology*, 6, 609.
- Kawada & Taketo (2011) Significance and mechanism of lymph node metastasis in cancer progression. *Cancer Research*, 71(4), 1214–1218.
- Kawamura, Komohara, Takaishi et al. (2009) Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathology International*, 59(5), 300–305.
- Kennedy, Pierce & Lake (1992) Extrathymic T cell maturation. Phenotypic analysis of T cell subsets in nude mice as a function of age. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(6), 1620–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1347303>
- Kiechle, Meindl & Anthuber (2014) *Manual Maligne Ovarialtumoren* (Schmalfeldt, Ed.) (10th ed.). München: W. Zuckschwerdt Verlag.
- Kim K.-W., Vallon-Eberhard, Zigmond et al. (2011) In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood*, 118(22), e156-67.
- Kim M., Rooper², Xie et al. (2012) Fractalkine Receptor CX3CR1 Is Expressed in Epithelial Ovarian Carcinoma Cells and Required for Motility and Adhesion to Peritoneal Mesothelial Cells *Molecular Cancer Research*, 10(1), 11–24.
- King, Hilliard, Wu et al. (2011) The impact of ovulation on fallopian tube epithelial cells: evaluating three hypotheses connecting ovulation and serous ovarian cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 18(5), 627–642.
- Kipps, Tan & Kaye (2013, April) Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nature Reviews. Cancer*.
- Konecny, Wang, Hamidi et al. (2014) Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer *Journal of the National Cancer Institute*, 106(10).
- Konstantinopoulos, Waggoner, Vidal et al. (2019) Single-Arm Phases 1 and 2 Trial of

- Niraparib in Combination With Pembrolizumab in Patients With Recurrent Platinum-Resistant Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncology*, 5(8), 1141–1149.
- Kryczek, Lange, Mottram et al. (2005) CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Research*, 65(2), 465–472.
- Kurman & Shih (2010) The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *The American Journal of Surgical Pathology*, 34(3), 433–443.
- Kwok, Yau, Chiu et al. (2016) Pembrolizumab (Keytruda). *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(11), 2777–2789.
- Lancaster, Powell, Chen et al. (2015) Society of Gynecologic Oncology statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. *Gynecologic Oncology*, 136(1), 3–7.
- Latek, Modzelewska, Trzaskowski et al. (2012) G protein-coupled receptors--recent advances. *Acta Biochimica Polonica*, 59(4), 515–529.
- Lee, Miron, Drapkin et al. (2007) A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *The Journal of Pathology*, 211(1), 26–35.
- Lee, Lee, Kim et al. (2012) Janex-1, a JAK3 inhibitor, ameliorates tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules and improves myocardial vascular permeability in endotoxemic mice. *International Journal of Molecular Medicine*, 29(5), 864–870.
- Leitlinienprogramm AWMF (2020) S3-Leitlinie Früherkennung, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Version 4., 1–400.
- Leitzmann, Koebnick, Danforth et al. (2009) Body mass index and risk of ovarian cancer. *Cancer*, 115(4), 812–822.
- Lengyel (2010) Ovarian cancer development and metastasis. *The American Journal of Pathology*, 177(3), 1053–1064.
- Levanon, Crum & Drapkin (2008) New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(32), 5284–5293.

- Lin, Faunce, Stacey et al. (2005) The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance *Journal of Experimental Medicine*, 201(10), 1615–1625.
- Lindahl, Satoh, Poirier et al. (1995) Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(10), 405–411.
- Lipp & Bokemeyer (2005) Therapy of solid tumors: Efficacy and toxicity of taxanes *Pharmazie in Unserer Zeit*, 34(2), 128–137.
- Litchfield, Reading, Puttick et al. (2021) Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition. *Cell*, 184(3), 596-614.e14.
- Liu, Gordon, Veneris et al. (2019) Safety, clinical activity and biomarker assessments of atezolizumab from a Phase I study in advanced/recurrent ovarian and uterine cancers. *Gynecologic Oncology*, 154(2), 314–322.
- Ma, Norsworthy, Kundu et al. (2009) CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(3), 490–498.
- Main, Xie, Muralidhar et al. (2017) Emergent Role of the Fractalkine Axis in Dissemination of Peritoneal Metastasis from Epithelial Ovarian Carcinoma *Oncogene*, 36(21), 3025–3036.
- Mantovani, Schioppa, Biswas et al. (2003) Tumor-associated macrophages and dendritic cells as prototypic type II polarized myeloid populations. *Tumori*, 89(5), 459–468.
- Mantovani, Sica, Sozzani et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677–686.
- Marchesi, Piemonti, Fedele et al. (2008) The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Research*, 68(21), 9060–9069.
- Mariya, Hirohashi, Torigoe et al. (2014) Prognostic impact of human leukocyte antigen class I expression and association of platinum resistance with immunologic profiles in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunology Research*, 2(12), 1220–1229.

- Martínez-Lostao, Anel & Pardo (2015) How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(22), 5047–5056.
- Matte, Lane, Laplante et al. (2012) Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *American Journal of Cancer Research*, 2(5), 566–580.
- Matulonis, Shapira-Frommer, Santin et al. (2019) Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer: results from the phase II KEYNOTE-100 study. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(7), 1080–1087.
- Mayr, Dettmar, Dorn et al. (2014) *Histologische Klassifikation maligner und potenziell maligner Ovarialtumoren, Stadieneinteilung und Prognosefaktoren* (Schmalfeldt, Ed.). München: W. Zuckschwerdt Verlag.
- McCaw, Randall & Arend (2019) Overcoming immune suppression with epigenetic modification in ovarian cancer. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 204, 31–38.
- Medina-Contreras, Geem, Laur et al. (2011) CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(12), 4787–4795.
- Messina, Fenstermacher, Eschrich et al. (2012) 12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? *Scientific Reports*, 2, 765.
- Millstein, Budden, Goode et al. (2020) Prognostic gene expression signature for high-grade serous ovarian cancer *Annals of Oncology*, xxx(xxx).
- Mizoue, Bazan, Johnson et al. (1999) Solution structure and dynamics of the CX3C chemokine domain of fractalkine and its interaction with an N-terminal fragment of CX3CR1. *Biochemistry*, 38(5), 1402–1414.
- Möbus, Gerharz, Press et al. (1992) Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines *International Journal of Cancer*, 52(1), 76–84.
- Moore K., Colombo, Scambia et al. (2018) Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *The New England Journal of*

- Medicine*, 379(26), 2495–2505.
- Moore K.N., Bookman, Sehouli et al. (2021) Atezolizumab, Bevacizumab, and Chemotherapy for Newly Diagnosed Stage III or IV Ovarian Cancer: Placebo-Controlled Randomized Phase III Trial (IMagyn050/GOG 3015/ENGOT-OV39). *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(17), 1842–1855.
- Morrison, Haldar, Kehoe et al. (2012) Chemotherapy versus surgery for initial treatment in advanced ovarian epithelial cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012(8), CD005343.
- Moughon, He, Schokrpur et al. (2015) Macrophage blockade using CSF1R inhibitors reverses the vascular leakage underlying malignant ascites in late-stage epithelial ovarian cancer *Cancer Research*, 75(22), 4742–4752.
- Murai, Huang, Das et al. (2012) Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Research*, 72(21), 5588–5599.
- Muralidhar & Barbolina (2013) Chemokine receptors in epithelial ovarian cancer *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 361–376.
- Murphy, Baggiolini, Charo et al. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological Reviews*, 52(1), 145–176.
- Nagarsheth, Peng, Kryczek et al. (2016) PRC2 Epigenetically Silences Th1-Type Chemokines to Suppress Effector T-Cell Trafficking in Colon Cancer. *Cancer Research*, 76(2), 275–282.
- Nagarsheth, Wicha & Zou (2017) Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy *Nature Reviews Immunology*, 17(9), 559–572.
- Nagy, Herzberg, Dvorak et al. (1993) Pathogenesis of malignant ascites formation: initiating events that lead to fluid accumulation. *Cancer Research*, 53(11), 2631–2643.
- National Academies of Sciences (2016) *Ovarian cancers: Evolving paradigms in research and care* *Ovarian Cancers: Evolving Paradigms in Research and Care*. National Academies Press.

- Neptune & Bourne (1997) Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14489–14494.
- Neufeld, Cohen, Gengrinovitch et al. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(1), 9–22.
- Niloff, Knapp, Schaetzel et al. (1984) CA125 antigen levels in obstetric and gynecologic patients. *Obstetrics and Gynecology*, 64(5), 703–707.
- Nishimura, Umehara, Nakayama et al. (2002) Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(12), 6173–6180.
- Noy & Pollard (2014) Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy *Immunity*, 41(1), 49–61.
- Ostuni, Guellec, Hermand et al. (2014) CX3CL1, a chemokine finely tuned to adhesion: critical roles of the stalk glycosylation and the membrane domain. *Biology Open*, 3(12), 1173–1182.
- De Palma & Lewis (2013) Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell*, 23(3), 277–286.
- Pan, Lloyd, Zhou et al. (1997) Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature*, 387(6633), 611–617.
- Park, Amichay, Love et al. (2002) The CXC chemokine murine monokine induced by IFN-gamma (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(3), 1433–1443.
- Patel, Channon & McNeill (2013) The downstream regulation of chemokine receptor signalling: implications for atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, 2013, 459520.
- Pavone & Lyttle (2015) Endometriosis and ovarian cancer: links, risks, and challenges faced. *International Journal of Women's Health*, 7, 663–672.

- Peng D., Kryczek, Nagarsheth et al. (2015a) Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy *Nature*, 527(7577), 249–253.
- Peng D., Kryczek, Nagarsheth et al. (2015b) Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy *Nature*, 527(7577), 249–253.
- Peng J., Hamanishi, Matsumura et al. (2015) Chemotherapy induces programmed cell death-ligand 1 overexpression via the nuclear factor- κ B to foster an immunosuppressive tumor microenvironment in Ovarian Cancer *Cancer Research*, 75(23), 5034–5045.
- Penson, Kronish, Duan et al. (2000) Cytokines IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNF α in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, 10(1), 33–41.
- Perdiguero, Klapproth, Schulz et al. (2015) Tissue-resident macrophages originate from yolk sac-derived erythro-myeloid progenitors *Experimental Hematology*, 43(9), S64.
- Pfeffer (2003) Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14(3–4), 185–191.
- Piek, van Diest, Zweemer et al. (2001) Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *The Journal of Pathology*, 195(4), 451–456.
- Pölcher, Zivanovic & Chi (2014) Cytoreductive surgery for advanced ovarian cancer. *Women's Health (London, England)*, 10(2), 179–190.
- Pollard (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 71–78.
- Pollard (2009) Trophic macrophages in development and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(4), 259–270.
- Pomel, Jeyarajah, Oram et al. (2007) Cytoreductive surgery in ovarian cancer. *Cancer Imaging: The Official Publication of the International Cancer Imaging Society*, 7(1), 210–215.

- Poniatowski, Wojdasiewicz, Krawczyk et al. (2017) Analysis of the Role of CX3CL1 (Fractalkine) and Its Receptor CX3CR1 in Traumatic Brain and Spinal Cord Injury: Insight into Recent Advances in Actions of Neurochemokine Agents. *Molecular Neurobiology*, 54(3), 2167–2188.
- Pradelli, Karimjee-Soilihi, Michiels et al. (2009) Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs. *International Journal of Cancer*, 125(11), 2586–2594.
- Purnell & Whish (1980) Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *The Biochemical Journal*, 185(3), 775–777.
- Qian & Pollard (2010) Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis *Cell*, 141(1), 39–51.
- Qu, Wen, Thomas et al. (2020) Baseline Frequency of Inflammatory Cxcl9-Expressing Tumor-Associated Macrophages Predicts Response to Avelumab Treatment. *Cell Reports*, 32(1), 107873.
- Quail & Joyce (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), 1423–1437.
- Rajagopalan & Rajarathnam (2006) Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity. *Bioscience Reports*, 26(5), 325–339.
- Raman, Sobolik-Delmaire & Richmond (2011) Chemokines in health and disease. *Experimental Cell Research*, 317(5), 575–589.
- Redjimi, Raffin, Raimbaud et al. (2012) CXCR3+ T regulatory cells selectively accumulate in human ovarian carcinomas to limit type I immunity. *Cancer Research*, 72(17), 4351–4360.
- Richard-Fiardo, Cambien, Pradelli et al. (2011) Effect of fractalkine-Fc delivery in experimental lung metastasis using DNA/704 nanospheres. *Cancer Gene Therapy*, 18(11), 761–772.
- Ritter & Hall (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(12), 819–830.
- Roby, Taylor, Sweetwood et al. (2000) Development of a syngeneic mouse model for

- events related to ovarian cancer *Carcinogenesis*, 21(4), 585–591.
- Rouleau, Patel, Hendzel et al. (2010) PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature Reviews. Cancer*, 10(4), 293–301.
- Ruffell, Affara & Coussens (2012) Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends in Immunology*, 33(3), 119–126.
- Rump, Morikawa, Tanaka et al. (2004) Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9190–9198.
- Sakuishi, Apetoh, Sullivan et al. (2010) Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(10), 2187–2194.
- Sato, Olson, Ahn et al. (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.
- Schoppmann, Fenzl, Nagy et al. (2006) VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery*, 139(6), 839–846.
- Schumacher & Schreiber (2015) Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230), 69–74.
- Seidman, Horkayne-Szakaly, Haiba et al. (2004) The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *International Journal of Gynecological Pathology : Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 23(1), 41–44.
- Servant, Weiner, Herzmark et al. (2000) Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5455), 1037–1040.
- Shahabuddin, Ji, Wang et al. (2006) CXCR3 chemokine receptor-induced chemotaxis in human airway epithelial cells: role of p38 MAPK and PI3K signaling pathways. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 291(1), C34-9.

- Shand, Ueha, Otsuji et al. (2014) Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(21), 7771–7776.
- Shankaran, Ikeda, Bruce et al. (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107–1111.
- Sharpe & Pauken (2018) The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews. Immunology*, 18(3), 153–167.
- Sheid (1992) Angiogenic effects of macrophages isolated from ascitic fluid aspirated from women with advanced ovarian cancer. *Cancer Letters*, 62(2), 153–158.
- Shen, Aoyagi-scharber & Wang (2015) Minireview Trapping Poly (ADP-Ribose) Polymerase *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, (June), 446–457.
- Shen F., Zhang, Jernigan et al. (2016) Novel Small-Molecule CX3CR1 Antagonist Impairs Metastatic Seeding and Colonization of Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Research : MCR*, 14(6), 518–527.
- Shen J., Zhao, Ju et al. (2018) PARPi triggers the STING-dependent immune response and enhances the therapeutic efficacy of immune checkpoint blockade independent of BRCAness.
- Shih & Kurman (2004) Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American Journal of Pathology*, 164(5), 1511–1518.
- Shulby, Dolloff, Stearns et al. (2004) CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 64(14), 4693–4698.
- Sica & Mantovani (2012) Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas *Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 787–795.
- Siegel, Miller & Jemal (2020) Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7–30.
- Sistigu, Yamazaki, Vacchelli et al. (2014) Cancer cell-autonomous contribution of type

- I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature Medicine*, 20(11), 1301–1309.
- Spitzer, Carmi, Reticker-Flynn et al. (2017) Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168(3), 487-502.e15.
- Strickland, Howitt, Shukla et al. (2016) Association and prognostic significance of BRCA1/2-mutation status with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes and expression of PD-1/PD-L1 in high grade serous ovarian cancer *Oncotarget*, 7(12), 13587–13598.
- Sung, Zhang, Moseman et al. (2012) Chemokine guidance of central memory T cells is critical for antiviral recall responses in lymph nodes. *Cell*, 150(6), 1249–1263.
- Takaishi, Komohara, Tashiro et al. (2010) Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation *Cancer Science*, 101(10), 2128–2136.
- Tan, Agarwal & Kaye (2006) Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *The Lancet. Oncology*, 7(11), 925–934.
- Tang, Hu, Hu et al. (2007) Gene therapy with CX3CL1/Fractalkine induces antitumor immunity to regress effectively mouse hepatocellular carcinoma. *Gene Therapy*, 14(16), 1226–1234.
- Thommen, Koelzer, Herzig et al. (2018) A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nature Medicine*, 24(7), 994–1004.
- Thompson, Martínez-Burgo, Sepuru et al. (2017) Regulation of Chemokine Function: The Roles of GAG-Binding and Post-Translational Nitration. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8).
- Tinelli, Malvasi, Leo et al. (2010) Hereditary ovarian cancers: from BRCA mutations to clinical management. A modern appraisal. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(2), 339–350.
- Tone, Virtanen, Shaw et al. (2012) Prolonged postovulatory proinflammatory signaling in the fallopian tube epithelium may be mediated through a BRCA1/DAB2 axis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(16), 4334–4344.

- Ugel, De Sanctis, Mandruzzato et al. (2015, September 1) Tumor-induced myeloid deviation: When myeloid-derived suppressor cells meet tumor-Associated macrophages *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation.
- Uniprot (2021a) CX3CR1.
- Uniprot (2021b) Fractalkine CX3CL1. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprot/P78423>
- Uniprot (2021c) UniProtKB - Q07325 (CXCL9_HUMAN). Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprot/Q07325>
- Vandercappellen, Van Damme & Struyf (2008) The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Letters*, 267(2), 226–244.
- Vang, Shih & Kurman (2009) Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Advances in Anatomic Pathology*, 16(5), 267–282.
- Vitale, Cambien, Karimjee et al. (2007) Tissue-specific differential antitumour effect of molecular forms of fractalkine in a mouse model of metastatic colon cancer. *Gut*, 56(3), 365–372.
- Wagner & Dudley (2013) A three-party alliance in solid tumors: Adipocytes, macrophages and vascular endothelial cells. *Adipocyte*, 2(2), 67–73.
- Wagner, Löb, Lindau et al. (2011) Simvastatin reduces tumor cell adhesion to human peritoneal mesothelial cells by decreased expression of VCAM-1 and β 1 integrin. *International Journal of Oncology*, 39(6), 1593–1600.
- Walton, Blagih, Ennis et al. (2016) CRISPR/Cas9-mediated Trp53 and Brca2 knockout to generate improved murine models of ovarian high-grade serous carcinoma *Cancer Research*, 76(20), 6118–6129.
- Wang, Deavers, Patenia et al. (2006) Monocyte/macrophage and T-cell infiltrates in peritoneum of patients with ovarian cancer or benign pelvic disease. *Journal of Translational Medicine*, 4, 30.
- Wang C., Armasu, Kalli et al. (2017) Pooled Clustering of High-Grade Serous Ovarian Cancer Gene Expression Leads to Novel Consensus Subtypes Associated with

- Survival and Surgical Outcomes. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(15), 4077–4085.
- Wang E., Ngalame, Panelli et al. (2005) Peritoneal and subperitoneal stroma may facilitate regional spread of ovarian cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(1), 113–122.
- Wendel, Galani, Suri-Payer et al. (2008) Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. *Cancer Research*, 68(20), 8437–8445.
- Wildenberg, van Helden-Meeuwsen, Drexhage et al. (2008) Altered fractalkine cleavage potentially promotes local inflammation in NOD salivary gland. *Arthritis Research & Therapy*, 10(3), R69.
- Windmüller, Zech, Avril et al. (2017) CXCR3 mediates ascites-directed tumor cell migration and predicts poor outcome in ovarian cancer patients. *Oncogenesis*, 6(5), e331.
- Wojdasiewicz, Poniatowski, Kotela et al. (2014) The Chemokine CX3CL1 (Fractalkine) and its Receptor CX3CR1: Occurrence and Potential Role in Osteoarthritis *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(5), 395–403.
- Wolf, Albrecht & Märki (2008) Proteolytic processing of chemokines: implications in physiological and pathological conditions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(6–7), 1185–1198.
- Wu, Huang, Han et al. (2016) The chemokine CXCL9 expression is associated with better prognosis for colorectal carcinoma patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 78, 8–13.
- Wübbenhorst, Dumler, Wagner et al. (2010) Tetracycline-regulated bone morphogenetic protein 2 gene expression in lentivirally transduced primary rabbit chondrocytes for treatment of cartilage defects. *Arthritis and Rheumatism*, 62(7), 2037–2046.
- Xiu & Luo (2021) CXCL9 secreted by tumor-associated dendritic cells up-regulates PD-L1 expression in bladder cancer cells by activating the CXCR3 signaling *BMC Immunology*, 22(1), 1–9.
- Yamagami, Nagase, Takahashi et al. (2020) A retrospective study for investigating the

- relationship between old and new staging systems with prognosis in ovarian cancer using gynecologic cancer registry of japan society of obstetrics and gynecology (Jsog): Disparity between serous carcinoma and cl *Journal of Gynecologic Oncology*, 31(4), 1–10.
- Yang, Chu, Wang et al. (2006) Targeted in vivo expression of IFN-gamma-inducible protein 10 induces specific antitumor activity. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(6), 1434–1444.
- Yaniz, Genestie, Klein et al. (2020) Impact of chemotherapy alone or in combination with an anti-angiogenic on the immune tumor microenvironment (TME) of ovarian cancer: Data from the randomized CHIVA trial (a GINECO –GINEGEPS study). *Journal of Clinical Oncology*, 38(15_suppl), 6011.
- Zentrum für Krebsregisterdaten Robert Koch-Institut (2017) Ovarialkarzinom ICD-10 C56.
- Zeppernick & Meinhold-Heerlein (2014, November) The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. Germany.
- Zhang C., Li, Xu et al. (2018) CXCL9/10/11, a regulator of PD-L1 expression in gastric cancer, 1–10.
- Zhang L., Conejo-Garcia, Katsaros et al. (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(3), 203–213.
- Zheng, Zhang, Chen et al. (2020) Mechanism and current progress of Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors in the treatment of ovarian cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 123, 109661.
- Zlotnik & Yoshie (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2), 121–127.

XIV. DANKSAGUNG

Ein kleiner Dank auf der letzten Seite dieser Dissertation mag kaum ausreichen, um all denen angemessen zu danken, durch die ich jeden einzelnen Tag während meiner Zeit als Doktorandin überaus gerne in unser Labor gegangen bin.

Allen voran gilt mein Dank natürlich meinem Doktorvater Holger Bronger. Du hast nicht nur das nötige Potenzial in mir gesehen, sondern du hast auch ein Forschungsprojekt ins Leben gerufen, in dem ich mit meinen Interessen und Talenten stets bestens aufgehoben war. Ohne hier weit ausholen zu wollen hätte ich mir keinen besseren Betreuer als dich wünschen können. Trotz deiner vielen verschiedenen Verantwortungsbereiche warst du Tag und Nacht für uns erreichbar. Zudem hast du uns immer dazu ermutigt, uns in den jeweiligen Projekten frei zu entfalten und uns als Team gegenseitig zu unterstützen.

Des Weiteren möchte ich meinem Mentor Viktor Magdolen und meinem Zweitbetreuer Michael Groll danken. Ihr habt mir stets mit wertvollen kritischen Fragen zu meinen Projekten den nötigen Impuls gegeben, um auch mal über den Tellerrand hinauszublicken und meine Fragestellungen auf andere Forschungsbereiche zu übertragen. Danke für eure Betreuung und euer wissenschaftliches Mitwirken.

Um niemanden zu vergessen, danke ich zudem allen Mitgliedern der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik. Ich war immer glücklich, von so tollen und offenen Menschen umgeben zu sein. Egal was war, es gab immer jemanden, der ein offenes Ohr für mich hatte, oder der sofort sein eigenes Projekt hat liegen lassen, um mir bei einem Problem zu helfen. Ihr habt alle zu euren persönlichen Anteilen zu dieser Dissertation beigetragen und dafür möchte ich euch danken! Besonders hervorheben möchte ich hierbei Christoph und Tobias – wir haben zusammen gearbeitet, zusammen gelacht und sind zusammen verzweifelt. Ich danke euch, dass ihr tolle Kollegen und Freunde seid.

Nicht zuletzt haben mir meine Familienmitglieder und Freunde in den letzten Jahren den nötigen Halt geschenkt, um diese Dissertation mit so viel Freude fertigzustellen. Ich danke euch, dass ihr mich stets mit so vielen Fragen zu meinen Projekten gelöchert habt. Dadurch habe ich immer die Leidenschaft behalten, euch alles wissenschaftlich korrekt erklären zu wollen. Danke, dass ihr mich alle in meinem ganzen Bildungsweg so sehr unterstützt habt, dass ich meinen großen Traum nun verwirklichen konnte.