

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck

- Direktor: Prof. Dr. med. Achim Rody -

**Immunhistochemische Analyse der Immuncheckpoints
PD-1/PD-L1 und deren prognostische Bedeutung
beim tripel-negativen Mammakarzinom**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Mascha Pervan

aus Frankfurt/M



Lübeck 2020

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Lars Hanker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.06.2020

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung und Fragestellung	7
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	7
1.2 Prognostische Faktoren	7
1.3 Prädiktive Faktoren und Bedeutung des tripel-negativen Subtyps	9
1.4 Therapeutische Überlegungen	12
1.5 Fragestellung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Kollektiv	19
2.2 Tissue Micro Arrays	21
2.3 Immunhistochemische Untersuchung	23
2.4 Mikroskopische Auswertung	24
2.4.1 Programmed Death Ligand-1 (PD-L1)	24
2.4.2 Programmed Death-1 (PD-1)	26
2.5 Statistische Planung	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Klinische Parameter	29
3.2 Tumorbiologie	29
3.3 Immunhistochemie	31
3.4 Korrelations- und Überlebenszeitanalysen	33

3.4.1	Korrelationsanalysen der Markerexpression und Überlebensdaten.....	33
3.4.2	Korrelationsanalysen der Markerexpression und weiteren klinisch-pathologischen Parametern.....	34
3.4.3	Korrelationsanalysen der Überlebensdaten und klinisch-pathologischen Parametern.....	36
3.4.4	Univariate Überlebenszeitanalysen	37
3.4.5	Multivariate Überlebenszeitanalysen	43
4	Diskussion.....	45
4.1	PD-1-Expression und therapeutische Überlegungen	46
4.1.1	PD-1-Expression beim tripel-negativen Mammakarzinom.....	46
4.1.2	Klinische Studien zu PD-1-Inhibition und möglichen Biomarkern	49
4.2	PD-L1-Expression und therapeutische Überlegungen	52
4.2.1	PD-L1-Expression beim tripel-negativen Mammakarzinom	52
4.2.2	PD-L1-Inhibition und Dynamik der Immunogenität des Tumors.....	54
4.3	TILs und TLS beim tripel-negativen Mammakarzinom.....	58
4.4	Limitationen der Studie.....	61
4.5	Fazit	62
5	Zusammenfassung.....	63
6	Literaturverzeichnis.....	64
7	Danksagung	77
8	Lebenslauf	78
9	Wissenschaftliche Publikationen.....	79

Abkürzungsverzeichnis

AGO		Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.
AR	<i>Androgen Receptor</i>	Androgenrezeptor
BET		Brust-erhaltende Therapie
BLBC	<i>Basal-like Breast Cancer</i>	Basal-artiges Mammakarzinom
BRCA	<i>Breast Cancer Susceptibility Gene</i>	Brustkrebsgen
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	Differenzierungscluster
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic acid</i>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTX		Chemotherapie
CXCL13	<i>Chemokine Ligand-13</i>	Chemokin Ligand-13
DCIS	<i>ductal carcinoma in situ</i>	duktales in-situ-Karzinom
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Desoxyribonukleinsäure
EBCTCG	<i>Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group</i>	Kollaboration der Studien zum frühen Mammakarzinom
ED		Erstdiagnose
EDTA		Ethylendiamintetraacetat
ER	<i>Estrogen Receptor</i>	Östrogenrezeptor
Fernmet.		Fernmetastasen
FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FOXP3	<i>Forkhead Box Proteine P3</i>	Forkhead Box Protein P3
GR	<i>Oxford Grades of Recommendation</i>	Oxford Empfehlungsgrade
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>	Humaner epidermaler Wachstumsrezeptor 2
HR	<i>Hormone Receptor</i>	Hormonrezeptor
HR	<i>Hazard Ratio</i>	Hazard Ratio
IFN γ		Interferon Gamma
IL-8		Interleukin-8
IRS		Immunreaktivitätscore
kA		Keine Angabe
KI		Konfidenzintervall

Ki67		Proliferationsindex
kontralat.		Kontralateral
LoE Ox2001	<i>Oxford Levels of Evidence</i>	Oxford Evidenzlevel
L-Status		Lymphangioinvasion
LumA		Luminal A-Subtyp
LumB		Luminal B-Subtyp
<i>M</i>		Median
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>	Boten-Ribonukleinsäure
<i>N</i>		Anzahl
NCI	<i>National Cancer Institute</i>	Nationales Krebs Institut der USA
NST	<i>No Special Type</i>	Kein spezieller Typ
N-Stadium		Nodalstatus
OS	<i>Overall Survival</i>	Gesamtüberleben
PAM50	<i>Prediction Analysis of Microarray</i>	Mikroarray Prädiktionsanalyse
pCR	<i>Pathologic Complete Remission</i>	Pathologische Komplettremission
PD	<i>Programmed Death</i>	Programmierter Zelltod
PD-1	<i>Programmed Death-Receptor-1</i>	Programmed Death-Rezeptor-1
PD-L1	<i>Programmed Death Ligand-1</i>	Programmed Death Ligand-1
PFS	<i>Progression Free Survival</i>	Progressionsfreies Überleben
PR	<i>Progesterone Receptor</i>	Progesteronrezeptor
RCB	<i>Residual Cancer Burden</i>	Residuale Tumorlast
<i>SD</i>	<i>Standard Deviation</i>	Standardabweichung
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>	Erhebung, Epidemiologie und Ergebnisse
TGCA	<i>The Genome Cancer Atlas</i>	Der Krebs Genom Atlas
TILs	<i>Tumor-Infiltrating T-Lymphocytes</i>	Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten
TLS	<i>Tertiary Lymphoid Structures</i>	Tertiäre Lymphoide Strukturen
TMA	<i>Tissue Micro Array</i>	
TNBC	<i>Triple Negative Breast Cancer</i>	Tripel-negatives Mammakarzinom
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>	Tumor Lymphknoten Metastasen
Tregs		Regulatorische T-Zellen
T-Stadium		Tumorgröße
V-Status		Veneninvasion
WHO	<i>World Health Organisation</i>	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom stellt sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste maligne Erkrankung der Frau dar. Insgesamt sind jährlich 2,1 Millionen Frauen betroffen (World Health Organisation, 2018). Gemäß den letzten veröffentlichten Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts aus 2016 wurden in Deutschland 68.950 Neuerkrankungen verzeichnet mit einer altersstandardisierten Inzidenzrate von 112,2/100.000 Personen. So beträgt das Risiko einer Frau innerhalb ihres Lebens zu einem Zeitpunkt an Brustkrebs zu erkranken 12,2 %. Mit einer Mortalitätsrate von 23,4/100.000 Personen ist das Mammakarzinom ebenfalls die häufigste Krebs-bedingte Todesursache von Frauen in Deutschland (Robert Koch-Institut, 2019).

1.2 Prognostische Faktoren

Ein prognostischer Faktor ermöglicht eine Aussage über den natürlichen Verlauf einer Erkrankung. Ein zu einem bestimmten Zeitpunkt erhobener Parameter korreliert mit dem weiteren Überleben, falls keine weitere Therapie erfolgt. Hiervon abzugrenzen sind prädiktive Faktoren, die eine Aussage zum Ansprechen auf eine bestimmte Therapie ermöglichen (Cianfrocca und Goldstein, 2004). Prognostisch für das Mammakarzinom ist zunächst die Größe des Primärtumors, dessen signifikanter prognostischer Wert in einer großen Analyse des Nationalen Krebs Instituts der USA (NCI, *National Cancer Institute*) anhand ihrer Datenbank „Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER)“ aus dem Jahr 2005 mit über 72.000 eingeschlossenen Patientinnen dargelegt werden konnte (Rosenberg et al., 2005). Weiterhin konnte bereits in einer 1989 publizierten Analyse der SEER mit über 24.000 Patientinnen bei Vorliegen eines Lymphknotenbefalls ein signifikanter prognostischer Wert nachgewiesen werden, der sich sowohl additiv zur Tumorgroße als

auch unabhängig hiervon belegen lässt (Carter et al., 1989). Zusammengefasst werden diese Prognosefaktoren in der TNM-Klassifikation, die die anatomische Ausbreitung des Karzinoms beschreibt und so eine Beurteilung des Tumorstadiums erlaubt (Amin et al., 2017; Wittekind et al., 2004). Eine Differenzierung des histologischen Typus eines Mammakarzinoms erfolgt gemäß aktueller WHO-Klassifikation nach dem Anteil der vorliegenden speziellen Differenzierung (Lakhani et al., 2012). Abgesehen von dem am häufigsten vorliegenden nicht-spezialen Typ (NST, *no special type*) gehen einige histologische Typen mit einer günstigeren Prognose einher, wobei jedoch die Abgrenzung eines „reinen“ Typs mit > 90 % spezieller Komponente von „gemischten“ Typen mit ≤ 90 % spezieller Komponente entscheidend ist (Allemani et al., 2004; Lebeau et al., 2014; Northridge et al., 1997). Die Bewertung des histologischen Gradings erfolgt nach Elston und Ellis unter Berücksichtigung der tubulären Formation, nuklearer Pleomorphismen sowie Anzahl der Mitosen und ermöglicht die Einteilung in gut (G1), mäßig (G2) und schlecht differenzierte (G3) Karzinome (Elston und Ellis, 1991). Diese Einteilung konnte als signifikanter Prognoseparameter in vielen Analysen bestätigt werden (Frkovic-Grazio und Bracko, 2002; Rakha et al., 2008). Eine schwedische Studie mit über 22.000 Patientinnen konnte weiterhin das Alter bei Erstdiagnose als signifikanten unabhängigen Prognoseparameter nachweisen, der Effekt zeigte sich für Frauen < 35 Jahren besonders deutlich (Fredholm et al., 2009). Seit dem Einsatz der Chemotherapie präoperativ in der sogenannten neoadjuvanten Situation hat sich das Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie als Prognosefaktor etabliert (Bonadonna et al., 1998; Kaufmann et al., 2006; Sataloff et al., 1995). Ein vollständiges Verschwinden des Tumors unter Chemotherapie wird als pathologische Komplettremission (pCR, *pathologic complete remission*) benannt und konnte als signifikanter Überlebensvorteil in einer systematischen Review mit insgesamt 11.955 Patienten bestätigt werden (Cortazar et al., 2014).

Die oben genannten Aspekte stellen somit etablierte Prognosefaktoren dar, deren Anwendung auch im klinischen Alltag durch die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) empfohlen werden. Aufgrund der starken Evidenz wird die Bestimmung der Prognosefaktoren mit einem Doppel-Plus („++“) bewertet, das heißt die Erhebung ist also „eindeutig empfehlenswert“ (s. Tabelle 1). Die Kommission Mamma der AGO sichtet systematisch aktuelle Studienergebnisse zur Diagnostik und Therapie des

Mammakarzinoms, die wissenschaftliche Evidenz der Ergebnisse wird gemäß Oxford Kriterien (www.cebm.net) bewertet und als jährlich aktualisierte Empfehlungen veröffentlicht.

Tabelle 1: *Prognosefaktoren des primären Mammakarzinoms*, modifiziert nach Liedtke und Thill (Liedtke und Thill, 2016).

Faktor	Oxford		AGO
	LoE Ox2001	GR	
Tumorgröße	1a	A	++
Lymphknotenstatus	1a	A	++
Vorliegen von Fernmetastasen	1a	B	++
Histologischer Typ	2b	B	++
Grading (nach Elston und Ellis)	2a	B	++
Alter	2a	B	++
pCR nach neoadjuvanter Chemotherapie	1a	A	++

pCR pathologische Komplettremission, *LoE Ox2001* Oxford Levels of Evidence, *1a* systematische Review randomisiert-kontrollierter Studien, *2a* systematische Review von Kohortenstudien, *2b* individuelle Kohortenstudien, *GR* Oxford Grades of Recommendation, *A* konsistente Level 1 Studien, *B* konsistente Level 2 oder 3 Studien oder Extrapolation von Level 1 Studien, *AGO* Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, *++* eindeutig empfehlenswert.

1.3 Prädiktive Faktoren und Bedeutung des tripel-negativen Subtyps

Im Gegensatz zu prognostischen Faktoren, die eine Auskunft über den natürlichen Verlauf einer Erkrankung zulassen, erlauben prädiktive Parameter Aussagen über das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie (Cianfrocca und Goldstein, 2004). Für das Mammakarzinom sind hier der Nachweis des Östrogen- (ER, *estrogen receptor*) und Progesteronrezeptors (PR, *progesterone receptor*) zu nennen, die in den 1960er Jahren identifiziert und im weiteren Verlauf zur Etablierung der antihormonellen Therapie geführt haben (McGuire et al., 1977). Der Nachweis von ER oder PR ist prädiktiv für das Ansprechen auf eine antihormonelle Therapie. So konnte in einer großen Metaanalyse der „Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group (EBCTCG)“ basierend auf 20 Studien mit insgesamt über

21.000 Patientinnen ein signifikanter Überlebensvorteil bei Therapie mit dem selektivem Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen bei ER-positiven Karzinomen nachgewiesen werden (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2011). 1987 gelang der Nachweis des sogenannten *Her2/neu*-Gens, welches beim Mammakarzinom einen Wachstumsfaktorrezeptor kodiert und bei Amplifikation mit einem signifikant schlechterem Gesamtüberleben und kürzerem Rezidivintervall vergesellschaftet ist (Slamon et al., 1987). Zur Jahrtausendwende wurde der monoklonale Antikörper Trastuzumab, der gegen den humanen epidermalen Wachstumsrezeptors 2 (HER2, *human epidermal growth factor receptor 2*) gerichtet ist, zunächst in metastasierter und seit 2006 in adjuvanter Situation zur Therapie des HER2-positiven Mammakarzinoms zugelassen. Es folgte die Entwicklung weiterer Wirkstoffe gegen verschiedene Domänen des HER2-Rezeptors. In einer kombinierten Analyse des Nationalen Krebs Instituts der USA unter Einschluss von über 4000 Patienten mit HER2-positivem Mammakarzinom mit einer medianen Nachbeobachtungszeit von 8,4 Jahren zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil von 37 % bei zusätzlicher Gabe von Trastuzumab im Gegensatz zur alleinigen Standardtherapie (Perez et al., 2014). So ist HER2-Positivität prädiktiv für das Ansprechen auf eine zielgerichtete Anti-HER2-Therapie.

Fehlen diese drei Rezeptoren (ER, PR und Her2) liegt der sogenannte tripel-negative Subtyp vor, für den bislang definitionsgemäß keine zielgerichtete Systemtherapie existiert und dementsprechend keine prädiktiven Parameter vorliegen. Histopathologisch ist das tripel-negative Mammakarzinom (TNBC, *triple negative breast cancer*) definiert durch den fehlenden Nachweis von ER und PR, sowie fehlender Überexpression bzw. Amplifikation von HER2. Der Nachweis von ER und PR erfolgt immunhistochemisch mittels Immunreaktivitätscore (IRS) (Allred et al., 1998; Remmele und Stegner, 1987). Nach Empfehlung der Amerikanischen Gesellschaft für Klinische Onkologie und des College der Amerikanischen Pathologen liegt bei ≥ 1 % positiver Tumorzellen ein Hormonrezeptor (HR) positives Karzinom vor, vor 2010 lag der Grenzwert noch bei ≥ 10 % (Hammond et al., 2010). Die Bewertung der HER2-Positivität erfolgt ebenfalls immunhistochemisch bei Nachweis von starker, zirkulärer Färbung von > 10 % der invasiven Zellen oder falls eine schwache Färbung von > 10 % der Zellen vorliegt ergänzend mittels in-situ-Hybridisierung zum Amplifikationsnachweis des *Her2*-Gens (Wolff et al., 2018). So stellt das tripel-negative

Mammakarzinom eine Ausschlussdiagnose dar und bildet dementsprechend eine heterogene Gruppe von Mammakarzinomen.

Anfang des Jahrhunderts wurden in einer wegweisenden Analyse von Perou und Sorlie 78 Mammakarzinome nach Genexpressionsmustern mittels cDNA Microarrays untersucht und molekulare Subtypen identifiziert, die signifikant mit prognostischen Berechnungen des Gesamtüberlebens korrelieren (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001). Nachfolgend wurden in weiteren Studien anhand von genetischen Expressionsmustern und copy number aberrations weitere molekulare Subtypen beschrieben (Curtis et al.; Parker et al., 2009; Prat und Perou, 2011). Das Mammakarzinom stellt also keine einheitliche Erkrankung mit unterschiedlichen morphologischen Aspekten dar, sondern eine heterogene Gruppe von molekular definierten Neoplasien (Sotiriou und Pusztai, 2009). Klinisch relevant sind aktuell zumindest 4 molekulare Subtypen zu unterscheiden:

1. Luminal A (LumA) mit Nachweis der *ER*-Gene und hohem Differenzierungsgrad, sowie Expression von sogenannten luminalen Cytokeratinen.
2. Luminal B (LumB), ER-positiv mit jedoch meist geringer Hormorezeptor-Expression und Differenzierung, sowie Nachweis der luminalen Cytokeratine.
3. HER2-artige (HER2) mit Amplifikation und hoher Expression der *Her2*-Gene und weiterer Wachstumsfaktoren.
4. Basal-like Breast Cancer (BLBC) mit fehlender Expression der *ER*, *PR* und *Her2*-Gene sowie vermehrter Expression von sogenannten basalen Cytokeratinen wie CK 5/6.

Anhand immunhistochemischer Untersuchungen von ER, PR, HER2, Grading und Proliferationsindex (Ki67), die Teil der Routinediagnostik darstellen, lassen sich diese sogenannten „intrinsischen“ Subtypen unterscheiden und bilden die Grundlage für die klinische Entscheidungsfindung. Jedoch muss betont werden, dass eine gewisse Diskordanz zwischen klinischer und molekularer Einteilung besteht. So wiesen Prat et al. in einer Analyse anhand der PAM50-Gen-Panel-Testung (PAM50, *Prediction Analysis of Microarray*) bei 21,4 % der untersuchten tripel-negativen-Fälle kein Basal-like Breast Cancer und in 31,5 % der Basal-like-Fälle kein tripel-negatives Mammakarzinom nach (Prat et al., 2013). Trotzdem wird die Bezeichnung „tripel-negativ“ als weitestgehend synonym zu „Basal-like“ genutzt, da einerseits eine molekulare Typisierung aktuell nicht Teil der

klinischen Routine darstellt und andererseits keine immunhistochemisch eindeutige Definition des Basal-like Breast Cancer existiert (Rakha et al., 2007). Zusätzlich bleibt die Bezeichnung „tripel-negativ“ klinisch hoch relevant, da sich hier das Fehlen der prädiktiven Parameter ER, PR und HER2 manifestiert und die Patienten daher bislang nicht von einer zielgerichteten Therapie profitieren können.

Der tripel-negative Subtyp liegt in 11-20 % der Mammakarzinome vor (Carey et al., 2010; Gluz et al., 2009; Rakha und Ellis, 2009). Die Gruppe der tripel-negativen Mammakarzinome ist durch ein aggressives biologisches Verhalten gekennzeichnet, es liegt meist ein niedriger Differenzierungsgrad und hohe mitotische Aktivität vor (Denkert et al., 2013; Livasy et al., 2006). Sie zeigen im Gegensatz zu rezeptorpositiven Karzinomen eine frühere Metastasierung, diese tritt insbesondere zerebral und im Allgemeinen häufiger viszeral als knöchern auf (Heitz et al., 2009; Minn et al., 2005; Rodríguez-Pinilla et al., 2006). Innerhalb von 3 Jahren nach Erstdiagnose zeigen die tripel-negativen Mammakarzinome deutlich höhere Rezidivraten als Rezeptor-positive Subtypen (Dent et al., 2007). Auch die Mortalität der tripel-negativen Mammakarzinome zeigt sich im Vergleich zu HR-positiven/HER2-negativen Karzinomen speziell in den ersten 2 Jahren nach Erstdiagnose stark erhöht (Lin et al., 2012; Tischkowitz et al., 2007). Ferner weisen insbesondere jüngere Patientinnen mit tripel-negativem Mammakarzinom eine schlechtere Prognose auf, obwohl sie meist eine aggressivere Chemotherapie erhalten (Fredholm et al., 2009; Liedtke et al., 2013).

1.4 Therapeutische Überlegungen

Für Patienten mit tripel-negativem Mammakarzinom hat das Erreichen einer pCR nach neoadjuvanter Chemotherapie eine eindeutig positive prognostische Bedeutung. Symmans et al. haben anhand von verschiedenen Mammakarzinom-Kohorten einen Score zur Bewertung der residualen Tumorlast (RCB, *Residual Cancer Burden*) nach neoadjuvanter Chemotherapie etabliert und 3 Risikogruppen (RCB-I bis -III) mit signifikant unterschiedlichen prognostischen Werten stratifiziert (Symmans et al., 2007, 2017). So ergibt sich hier für den tripel-negativen-Anteil (n=219) ein 5-Jahres-rezidivfreies Überleben von 94 % bei Erreichen der pCR im Gegensatz zu 26 % bei ausgedehntem Residualtumor

(RCB-III), sowie insgesamt ein deutlich schlechteres Gesamtüberleben für Patienten mit RCB-III. Hier liegt anscheinend eine reduzierte Chemosensitivität der Tumorzellen vor, die eine effektive Therapie ohne zielgerichtete Substanzen erschwert (Carey et al., 2007; Cortazar et al., 2014; Liedtke et al., 2008). Lehmann et al. haben an insgesamt 587 tripel-negativen Fällen aus 21 Mammakarzinom-Datensätzen mittels Genexpressionsanalysen 6 Subtypen identifizieren können, die signifikante Unterschiede des rezidivfreien Überlebens aufweisen (Lehmann et al., 2011). Die Subtypen Basal-like 1 und 2 sind durch Genexpressionen von Komponenten und Signalwegen des Zellzyklus und der Zellteilung gekennzeichnet, sowie Genen von Proliferation und DNA-Reparaturmechanismen. Dementsprechend profitieren diese Patienten von Therapien mit Mitosehemmstoffen, was sich in höheren pCR-Raten nach taxanhaltiger Chemotherapie bei Basal-like 1 oder 2 im Gegensatz zu anderen tripel-negativen-Subtypen widerspiegelt (Juul et al., 2010). *BRCA*-mutierte Tumoren zeigen meist einen basalen Phänotyp und bei nicht-*BRCA*-mutierten Basal-like 1 oder 2 Tumoren weisen die Autoren eine mehr als 2 fache Anzahl chromosomaler Aberrationen nach, sodass die genetische Instabilität ein Merkmal der basalen Subtypen darzustellen scheint (Adélaïde et al., 2007; Stefansson et al., 2009). Der luminale Androgen-Rezeptor Subtyp zeigt eine Anreicherung der Gene hormonell-regulierter Signalwege beispielsweise der Steroid-Synthese oder des Östrogen/Progesteron-Stoffwechsels bei Negativität der *ER*-Gene. Sie zeigen vermehrte mRNA des *Androgen-Rezeptors (AR)* sowie ein immunhistochemisch erhöhten Nachweis des AR. In einer Phase-II-Studie konnte ein klinisches Ansprechen des AR-Inhibitors Enzalutamid bei immunhistochemisch AR-positiven fortgeschrittenen tripel-negativen Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Traina et al., 2018). Der mesenchymale Subtyp zeigt Genexpressionen von Signalwegen der Zellmotilität und –differenzierung. Ähnliches lässt sich für den mesenchymal stem-like Subtyp nachweisen, wobei hier zusätzlich vermehrt Merkmale des *growth factor* Signalweges sowie Gene der Angiogenese exprimiert werden. Verminderte Expression von Genen der Proliferation und eine vermehrte Expression von Stammzellgenen ist hier charakteristisch und namensgebend. Es besteht eine Ähnlichkeit zum metaplastischen Mammakarzinom, welches durch Chemoresistenz und Aspekte von Sarkomen gekennzeichnet ist (Gibson et al., 2005). Der immunmodulatorische Subtyp hingegen ist durch Genexpressionsmuster von Immunsignalwegen gekennzeichnet einschließlich T- und B-Zell-Rezeptor. Parallel zu dieser

Subtypisierung haben Rody et al. in einer weiteren großen Analyse Genexpressionen von insgesamt 655 Fällen mit tripel-negativem Mammakarzinom untersucht (Rody et al., 2011). Anhand der Expressionsmuster aus 28 Datensätzen wurden hochgradig co-exprimierte Gene zu Metagenen zusammengefasst. Die 16 identifizierten Gencluster beinhalten unter anderem einen Basal-like-Phänotyp, eine apokrine/Androgen Rezeptor- (AR), Proliferations-, stromale, Claudin-, eine inflammatorische und eine Angiogenese-Signatur sowie fünf verschiedene Immunzell-Signaturen. Insgesamt konnte hier ein prognostischer Vorteil bei Expression der Immunzell-Metogene sowie ein Nachteil bei hoher Expression der inflammatorischen und Angiogenese-Signatur nachgewiesen werden. Prognostisch günstig und statistisch signifikant zeigte sich nach multivariater Coxregression der Quotient aus hoher *B-Zell*- und niedriger *IL-8*-Metagenexpression, unabhängig von Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Grading und Alter. Weiterhin wurden prognostisch signifikante Unterschiede bei Analyse von Genexpressionsmustern des Tumor umgebenden Stromas festgestellt (Finak et al., 2008). Es zeigte sich ein Überlebensvorteil bei Expression der T-Helfer-1-Immunantwort, sowie ein schlechteres Überleben bei Expression von Komponenten der hypoxischen, angiogenetischen und Tumor-assoziierten Makrophagen-Antwort. So verschiebt sich der Fokus auf die Interaktion an der Tumor-Stroma-Grenzfläche und den Einfluss des Immunsystems auf die Effektivität der Tumorabwehr.

Vereinfacht dargestellt werden im Rahmen der adaptiven Immunantwort T-Lymphozyten mittels T-Zellrezeptor spezifisch durch Antigen-präsentierende Zellen beispielsweise dendritische Zellen, Makrophagen und ihre Vorstufen Monozyten aktiviert (Murphy und Weaver, 2017). Hier lassen sich anhand von definierten Oberflächenmerkmalen (CD, *Cluster of differentiation*) unter anderem CD 4- und CD 8-positive T-Lymphozyten unterscheiden, die nach Aktivierung jeweils spezifische Funktionen ausüben. CD 8+ Lymphozyten können infizierte Zielzellen direkt zerstören und werden auch zytotoxische T-Zellen genannt. CD 4+ Lymphozyten sind sogenannte T-Helferzellen, die durch Ausschüttung von Zytokinen unter anderem sogenannte natürliche Killerzellen und B-Lymphozyten anlocken und aktivieren. Nach Aktivierung sezernieren B-Lymphozyten einerseits spezifische Antikörper und ermöglichen andererseits als Plasmazellen ein langanhaltendes immunologisches Gedächtnis.

Bereits 1992 konnte eine finnische Studie mit einem Follow-up von über 10 Jahren einen prädiktiven Wert eines lymphozytären Infiltrats bei hoch-proliferativen Tumoren nachweisen (Aaltomaa et al., 1992). Bei Nachweis von Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten (TILs) konnten Denkert et al. eine signifikante Prädiktion für das Tumorausprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie belegen (Denkert et al., 2010). Für die Subgruppe der tripel-negativen Mammakarzinome konnten Mahmoud et al. sowie Liu et al. bei Nachweis von CD 8+ TILs ein signifikant besseres Brustkrebs-spezifisches Überleben aufzeigen (Liu et al., 2012; Mahmoud et al., 2011). Pro 10 prozentiger Zunahme eines lymphozytären Infiltrates konnten Loi et al. für tripel-negative Mammakarzinome ein signifikant besseres rezidivfreies und Gesamtüberleben nach adjuvanter Chemotherapie nachweisen (Loi et al., 2019). Interessanterweise wurden neben TILs auch Keimzentren angrenzend an das Tumorgewebe gefunden (Adams et al., 2014). Typischerweise liegen Keimzentren im Inneren von Lymphknoten und sind Ort der Reifung und Selektion von B-Lymphozyten. In unmittelbarer Umgebung eines Tumors bedeuten diese sogenannten tertiären lymphoiden Strukturen (TLS) eine Organisation des Immunsystems mit potentiell Tumor-spezifischer Immunantwort sowie möglicherweise Ausbildung von Tumor-spezifischen Gedächtniszellen (Salgado et al., 2015). Gu-Trantien et al. konnten einen gleichartigen Aufbau der Keimzentren in Lymphknoten und tertiären lymphoiden Strukturen beim Mammakarzinom nachweisen, sowie ebenfalls ein häufigeres Auftreten von tertiären lymphoiden Strukturen bei ausgeprägter Immuninfiltration des Tumors (Gu-Trantien et al., 2013).

Einen physiologischen Kontrollmechanismus der T-Zell vermittelten Immunantwort bildet die Programmed Death (PD)-Achse (Ishida et al., 1992; Nishimura et al., 1999). Eine Aktivierung der T-Zelle induziert neben der Abwehrfunktion auch die Expression des PD-1-Rezeptors (Keir et al., 2008). Mittels PD-1 wird der T-Zellrezeptor-vermittelte Signalweg antagonisiert und die Immunaktivität der T-Zelle beendet (Boussiotis, 2016). Die Aktivierung erfolgt mittels Programmed Death Ligand-1 (PD-L1), der auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird, eine vermehrte PD-L1-Expression wird durch das inflammatorische Zytokin Interferon- γ (IFN γ) hervorgerufen (Freeman et al., 2000). So soll einer andauernden T-Zell-vermittelten Inflammationsreaktion entgegengewirkt und Autoimmunität verhindert werden (Ostrand-Rosenberg et al., 2014).

Interessanterweise ist die PD-Achse ebenfalls für das immunologische Privileg der Plazenta verantwortlich und nimmt eine Schlüsselrolle im Rahmen der feto-maternalen Toleranz in der Schwangerschaft ein (Okazaki und Honjo, 2007). Dong et al konnten PD-L1 auf Tumorzellen des Bronchial-, Ovarial- und Kolonkarzinoms nachweisen und demonstrierten im Mausmodell eine PD-vermittelte negative Regulation der T-Zellen im Mikromilieu der Tumoren (Dong et al., 2002). Die Nutzung von Immunsignalwegen durch Tumorzellen lässt sich anhand des Konzepts des *Immunoeditings* nachvollziehen, welches durch die US-amerikanische Arbeitsgruppe um Schneider definiert wurde (Dunn et al., 2002; Schreiber et al., 2011; Shankaran et al., 2001). *Immunoediting* beschreibt die Fähigkeit des Immunsystems Tumorzellen beispielsweise anhand von Antigenen zu erkennen und zu zerstören, wobei diese Reaktion gleichzeitig jedoch zu einem Selektionsdruck auf die Tumorzellen führt. So bleiben nicht identifizierte Tumorzellen erhalten und die Immunogenität des Tumors geht im Verlauf verloren. Schematisch vollzieht sich dieser Prozess in 3 Stadien: in der Phase der *Elimination* können transformierte Zellen nach Versagen der zellulären intrinsischen Tumorsuppression durch die Immunabwehr identifiziert und zerstört werden, die Tumorbildung wird verhindert. Werden im Verlauf einzelne Tumorzellen nicht abgeräumt befinden sie sich im *Equilibrium*. In dieser Phase findet keine vollständige Tumorsuppression mehr statt, die Zellen bleiben allerdings klinisch inapparent. In der Folge können sie aufgrund der Selektion des *Immunoeditings* oder bei Versagen der Immunmechanismen der Kontrolle entkommen (*Escape*) und zur manifesten Tumorerkrankung führen. Das Mikromilieu des Tumors ist ein weiterer wichtiger Faktor sowohl in Bezug auf die *Escape*-Phase, als auch für Tumorabwehr und -progression. Eine effektive wenn auch häufig abgeschwächte Antitumoraktivität des Tumormikromilieus kann bei Beteiligung von CD 4+ T-Helfer 1- und CD 8+ T-Zellen sowie reifen dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und M1-Makrophagen nachgewiesen werden, andererseits scheinen CD 4+ regulatorische T-Zellen (Tregs), unreife dendritische Zellen und M2-Makrophagen die Tumorummunität zu unterdrücken und sogar eine Tumorprogression zu fördern (Gobert et al., 2009; Ruffell et al., 2010; Zamarron und Chen, 2011). Die Charakterisierung der Interaktionen zwischen Immunsystem und Tumormikromilieu bilden einen Schwerpunkt der aktuellen onkologischen Wissenschaft. Eine medikamentöse Unterbrechung der Signalwege der negativen Regulierung des Immunsystems lässt auf eine effektive Tumorabwehr hoffen. So steht die Entwicklung und

Anwendung dieser sogenannten Immuncheckpoint-Inhibitoren im Zentrum zahlreicher klinischer Studien.

1.5 Fragestellung

Die ersten Studien zur PD-L1-Inhibition bei verschiedenen Tumorentitäten konnten keine signifikante Vorhersage bezüglich des Therapieansprechens anhand einer PD-L1-Expression der Tumorzellen treffen (Herbst et al., 2014). Für die palliative Behandlung von Patienten mit metastasiertem Melanom erfolgte im Jahr 2011 die erste Zulassung eines Immuncheckpoint-Inhibitors durch die US-amerikanische Arzneimittelbehörde, da hier ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben nachgewiesen werden konnte (Hodi et al., 2010). In Europa aktuell zugelassene Immuncheckpoint-Inhibitoren der PD-Achse sind Pembrolizumab (anti-PD-L1), Nivolumab (anti-PD-1) und Atezolizumab (anti-PD-L1) zur Therapie bei fortgeschrittenem Melanom, nicht-kleinzelligem Bronchiakarzinom, Hodgkin-Lymphom, Urothelkarzinom und Kopf-Hals-Tumoren, wobei für eine Therapie mit Pembrolizumab in einigen Indikationen ein Nachweis erhöhter PD-L1-Expression erfolgt sein muss (European Medicines Agency, 2019a, 2019b, 2019c). Im Herbst des letzten Jahres erfolgte ebenfalls in Europa die Zulassung von Atezolizumab in Kombination mit einer Chemotherapie bei nicht-vortherapiertem, metastasiertem tripel-negativem Mammakarzinom, die eine definierte PD-L1-Expression aufweisen (F.Hoffmann-La Roche Ltd, 2019).

In der vorliegenden Arbeit wurden Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) und die Expression von PD-1 sowie PD-L1 an Gewebsstanzen der Tumorgrenzfläche von primären tripel-negativen Mammakarzinomen untersucht, mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert und ihre Beziehung zu Überlebensdaten geprüft. Folgende Fragen wurden bei der Auswertung der Daten berücksichtigt:

- Wie groß ist der Anteil der tripel-negativen Mammakarzinome, die eine immunhistochemische PD-1- und PD-L1-Expression aufweisen?
- Lässt sich eine PD-1- oder PD-L1-positive Subgruppe definieren?

-
- Korreliert die Expression von PD-1 oder PD-L1 mit etablierten Prognosefaktoren oder klinisch-pathologischen Parametern?
 - Lassen sich Zusammenhänge der PD-1/ PD-L1-Expression und dem Gesamtüberleben oder progressionsfreien Überleben ableiten? Lässt die PD-1-/ PD-L1-Expression eine Vorhersage bezüglich Überlebensdaten zu?
 - Lässt sich eine unabhängige prognostische Bedeutung der PD-1- oder PD-L1-Expression mittels multivariaten Analyse belegen?
 - Wie häufig lassen sich Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten (TILs) beim tripel-negativen Mammakarzinom nachweisen?
 - Korreliert die TIL-Positivität mit weiteren Prognosefaktoren oder klinisch-pathologischen Parametern?
 - Sind Zusammenhänge zwischen positivem TIL-Status und Gesamtüberleben oder progressionsfreien Überleben darstellbar?
 - Sind tertiäre lymphoide Strukturen erkennbar? Lassen sich Zusammenhänge mit anderen Faktoren darstellen?

2 Material und Methoden

2.1 Kollektiv

Das Kollektiv umfasst Patientinnen mit tripel-negativem Mammakarzinom, die zwischen 2004 und 2014 in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck behandelt wurden. Die Untersuchung wurde vor Beginn durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (Aktenzeichen: 14-247A). Es wurden 192 Fälle tripel-negativer Tumoren über die klinik-interne Tumordokumentation ODSeasy identifiziert und nach Prüfung der folgenden Einschlusskriterien konnten 74 Fälle ausgewertet werden (*Abbildung 1*):

- Histologisch gesichertes Mammakarzinom
- Primärerkrankung, nicht-metastasiertes Stadium
- Weibliches Geschlecht
- Präparat im Institut für Pathologie, Universitätsklinikum SH, Campus Lübeck
- Keine präoperative Chemotherapie (keine Neoadjuvanz)
- Östrogen-Rezeptor IRS 0 („Null“) (Remmele und Stegner, 1987)
- Progesteron-Rezeptor IRS 0 („Null“) (Remmele und Stegner, 1987)
- HER2/neu-Status 0 bzw. 1+ („Negativ“) immunhistochemisch oder keine Amplifikation des *Her2*-Gens („Negativ“) in der FISH (Rüschoff et al., 2009)

Das im Rahmen der Standardtherapie eingesandte Operationspräparat wurde im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck retrospektiv untersucht. Es wurde unbehandeltes Gewebe des Primärtumors verwendet. Um Chemotherapie-induzierte Veränderungen im Tumormilieu auszuschließen, wurden Patientinnen in neoadjuvanter Behandlungssituation von der Studie ausgeschlossen. Basierend auf der Tumordokumentation der Frauenklinik wurden im Befundauskunftssystem Nexus der Pathologie die geeigneten Präparateblöcke recherchiert.

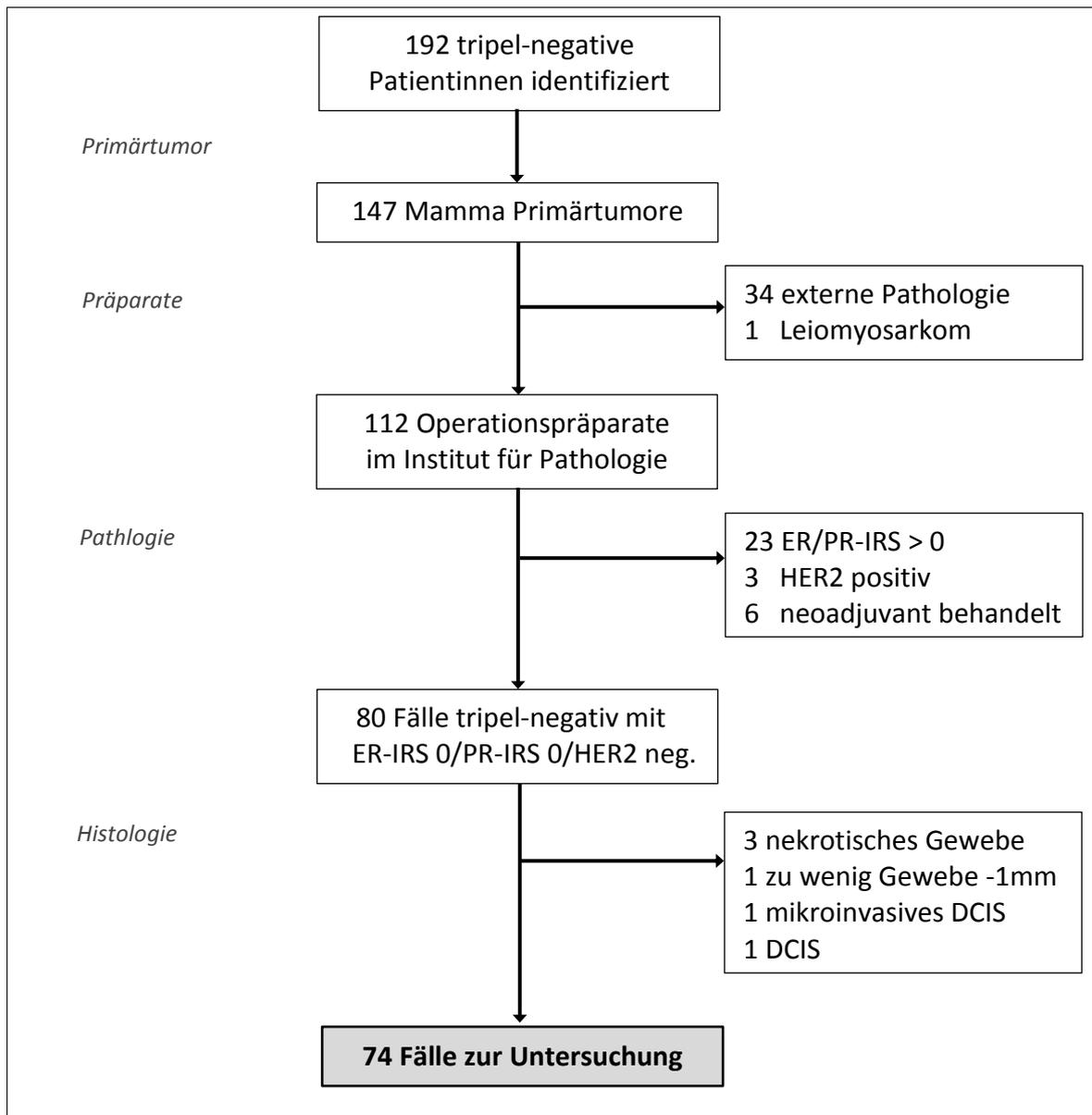


Abbildung 1: Diagramm der Fallzahlentwicklung. *ER-IRS* Östrogenrezeptorexpression, *PR-IRS* Progesteronrezeptorexpression, *HER2 neg.* negativer humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2, *DCIS* duktales in-situ Karzinom.

Die Schnittpräparate der eingeschlossenen Fälle wurden von einem Facharzt der Pathologie lichtmikroskopisch begutachtet und das Karzinomgewebe darauf markiert (Abbildung 2).



Abbildung 2: markierter Tumor-Schnitt (links) und korrespondierender Paraffin-Block (rechts).

Die Gewebspräparate werden Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet (FFPE) gelagert. Die Formalinfixierung erfolgt gemäß internem Standard mit gepuffertem, 4%igen Formaldehyd über 6 bis 48 Stunden mit darauffolgender Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol sowie abschließender Paraffineinbettung im Automaten.

2.2 Tissue Micro Arrays

In Mehrgewebeblöcken, sogenannte Tissue Micro Arrays (TMA) können eine Vielzahl von FFPE-Gewebeproben gleichzeitig verarbeitet und nach verschiedenen Gesichtspunkten untersucht werden. Es werden Zylinder aus dem zu untersuchenden Gewebe gestanzt und in einen Akzeptorblock (TMA-Block) aus Paraffin nach einem präzisen Schema nebeneinander eingebracht (Kononen et al., 1998) (Abbildung 3).

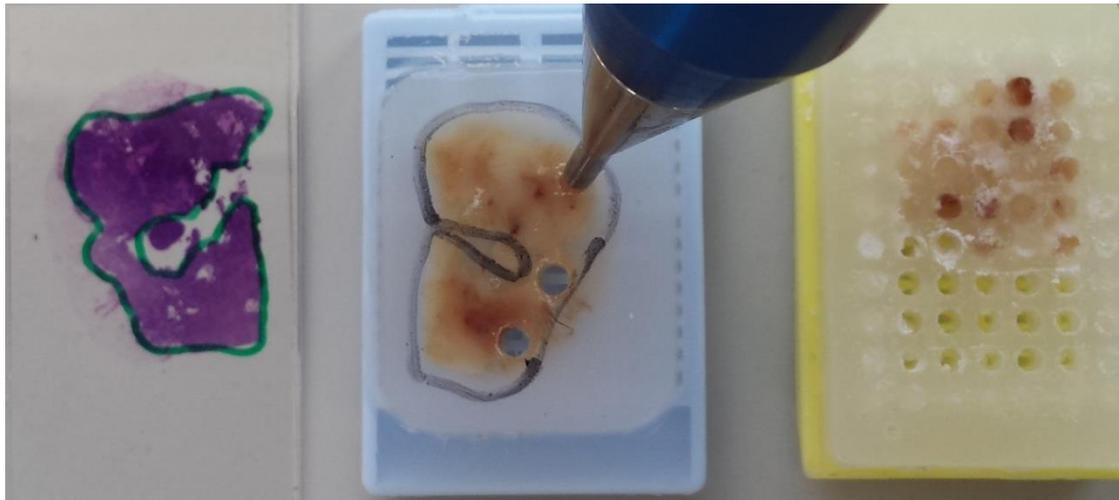


Abbildung 3: Erstellung des Tissue Micro Array-Blocks (TMA). Markierter Tumorschnitt (links), Paraffinblock bei Entnahme der Stanze (Mitte) und TMA-Block (rechts).

Mit diesem Verfahren können einerseits unter ökonomischem Gesichtspunkt Laborressourcen und Antikörper eingespart werden, zudem verläuft die mikroskopische Auswertung effizienter. Andererseits wird unter methodischem Gesichtspunkt die Variabilität der Färbung verringert, da die Proben gemeinsam selben Färbeverfahren laufen. Weiterhin bleibt der Originalblock des Tumorgewebes erhalten und steht für mögliche weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Die Erstellung der TMAs erfolgte mithilfe des Manual Tissue Arrayers Quick Ray UT06 (Unitma Co., Seoul, Korea). Der Durchmesser der Stanzen beträgt 2 mm, die in einem Abstand von 1 mm im Akzeptorblock platziert werden. Dies gewährleistet eine gute Handhabbarkeit und minimiert die Brüchigkeit der TMAs. Um der Heterogenität des Mammakarzinoms gerecht zu werden wurden für jeden Fall 3 Stanzen entnommen (Gillett et al., 2000). Versuche mit Tumorstanzen in aufsteigender Zahl im Vergleich zum vollständigen Tumorblock ergeben bei 3 Stanzen Übereinstimmungsraten von über 97% für das Mammakarzinom (Camp et al., 2000). Studien an anderen Tumoren kommen zu vergleichbaren Ergebnissen, sodass im Allgemeinen die Entnahme von 2-3 Stanzen pro Fall empfohlen werden kann (Hedvat et al., 2002; Hoos et al., 2001; Rubin et al., 2002; Simon et al., 2004). Die Stanzen wurden aus verschiedenen Bereichen der Invasionsfront des zuvor markierten Tumors entnommen und bilden 3 Sets von TMAs. Die oberste Reihe des TMA-Blocks wurde asymmetrisch bestückt, um die korrekte Orientierung bei der Auswertung zu gewährleisten. Hier liegen die Positivkontrollen der immunhistochemischen

Färbungen: Gewebe von humaner Tonsille und Plazenta, sie stammen aus dem Archiv des Instituts aus den Jahren 2015 - 2016 (*Abbildung 4*).

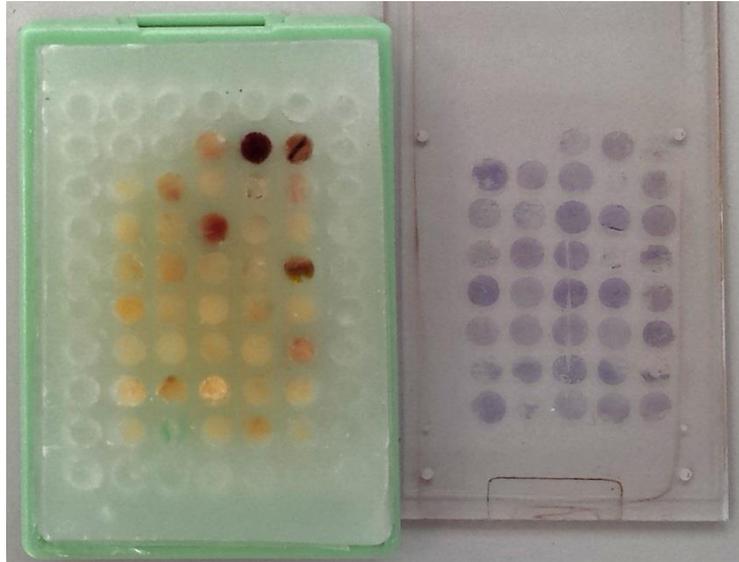


Abbildung 4: TMA-Paraffinblock und -Schnittpräparat.

Die Studie wurde unter Berücksichtigung der Kriterien zur Erstellung und Auswertung von TMAs sowie der „REMARK“-Empfehlungen für Biomarker in der onkologischen Forschung geplant und ausgeführt (McShane et al., 2005; Pinder et al., 2013).

2.3 Immunhistochemische Untersuchung

Von den im TMA zusammengefassten Tumorproben wurden mithilfe eines Mikrotoms 4 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Superfrost Plus Objektträger (Leica Biosystems, Deutschland) aufgebracht. Diese wurden in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Die Vorbehandlung zur Demaskierung der Antigene und die optimale Verdünnung der Primärantikörper wurden zuvor Antikörper-spezifisch ausgetestet. Die Färbung der TMA-Schnitte erfolgte sodann im Färbeautomaten BOND-MAX (Leica Biosystems, Deutschland) unter Verwendung der Hitze-induzierten Epitop-Rückgewinnung in EDTA-Puffer (pH 9,0) (Tabelle 2). Abschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin, Dehydrierung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol, sowie die Deckelung im Automaten.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper und Färbeverfahren

Antikörper	Klon	Verdünnung / Vorbehandlung	Bestellnr.	Hersteller
PD-L1	E1L3N	1:50 / EDTA	13684S	Cell Signaling Technology, USA
PD-1	MRQ-22	1:100 / EDTA	315M-95	Cell Marque, USA

PD-L1 Programmed Death Ligand-1, *PD-1* Programmed Death-1, *EDTA* Ethylendiamintetraacetat.

Ein monoklonaler IgG-Antikörper vom Hasen der Firma Cell Signaling wurde zum Nachweis von PD-L1 verwendet. Eine membranäre Anfärbung der Tumorzellen wird erwartet. Zur Färbekontrolle wurde humanes Plazentagewebe mitgeführt, hier wird PD-L1 zur Erhaltung der feto-maternalen Toleranz exprimiert (Okazaki und Honjo, 2007). Zum Nachweis von PD-1 diente ein monoklonaler Maus-Antikörper der Klasse IgG₁ der Firma Cell Marque. Eine zytoplasmatische Reaktion der Lymphozyten wird erwartet. Als Kontrollgewebe fungiert humane Tonsille, da PD-1 hier auf den meisten T-Zellen, sowie einigen Blasten innerhalb der Keimzentren exprimiert wird (Iwai et al., 2002).

2.4 Mikroskopische Auswertung

Basierend auf einer ausführlichen Literaturrecherche wurde vor Beginn für jeden Marker ein Algorithmus zur Auswertung festgelegt. Die mikroskopische Auswertung der TMA-Schnitte erfolgte verblindet am Lichtmikroskop (Typ BX41, Olympus, Deutschland) im Konsens durch zwei approbierte Ärzte, hiervon ein Facharzt für Pathologie.

2.4.1 Programmed Death Ligand-1 (PD-L1)

Der zum Zeitpunkt der Planung dieser Studie meist verwendete Auswertungsscore der immunhistochemischen PD-L1-Färbung wurde 2004 von Thompson et al. veröffentlicht (Thompson et al., 2004). Es wird der Anteil der membranär gefärbten Tumorzellen in Prozent erfasst und aufgrund der breiten Anwendung auch in dieser Untersuchung eingesetzt (Larkin et al., 2015; Taube et al., 2012; Topalian et al., 2012). Hierbei entspricht eine Färbung auf weniger als 5 % der Tumorzellen dem Wert „Null“, also „PD-L1 negativ“,

darüber hinaus wird der Fall als „PD-L1 positiv“ gewertet. Für die quantitative Bewertung ergibt eine membranäre Färbung von bis 10 % der Tumorzellen den Zahlenwert 10, eine Färbung von 20 % ergibt 20 und so weiter bis zum Maximalwert von 100 bei 100 % positiven Tumorzellen. Der Mittelwert der 3 entnommenen Stanzten ergibt die Bewertung des Falls (*Abbildung 5*).

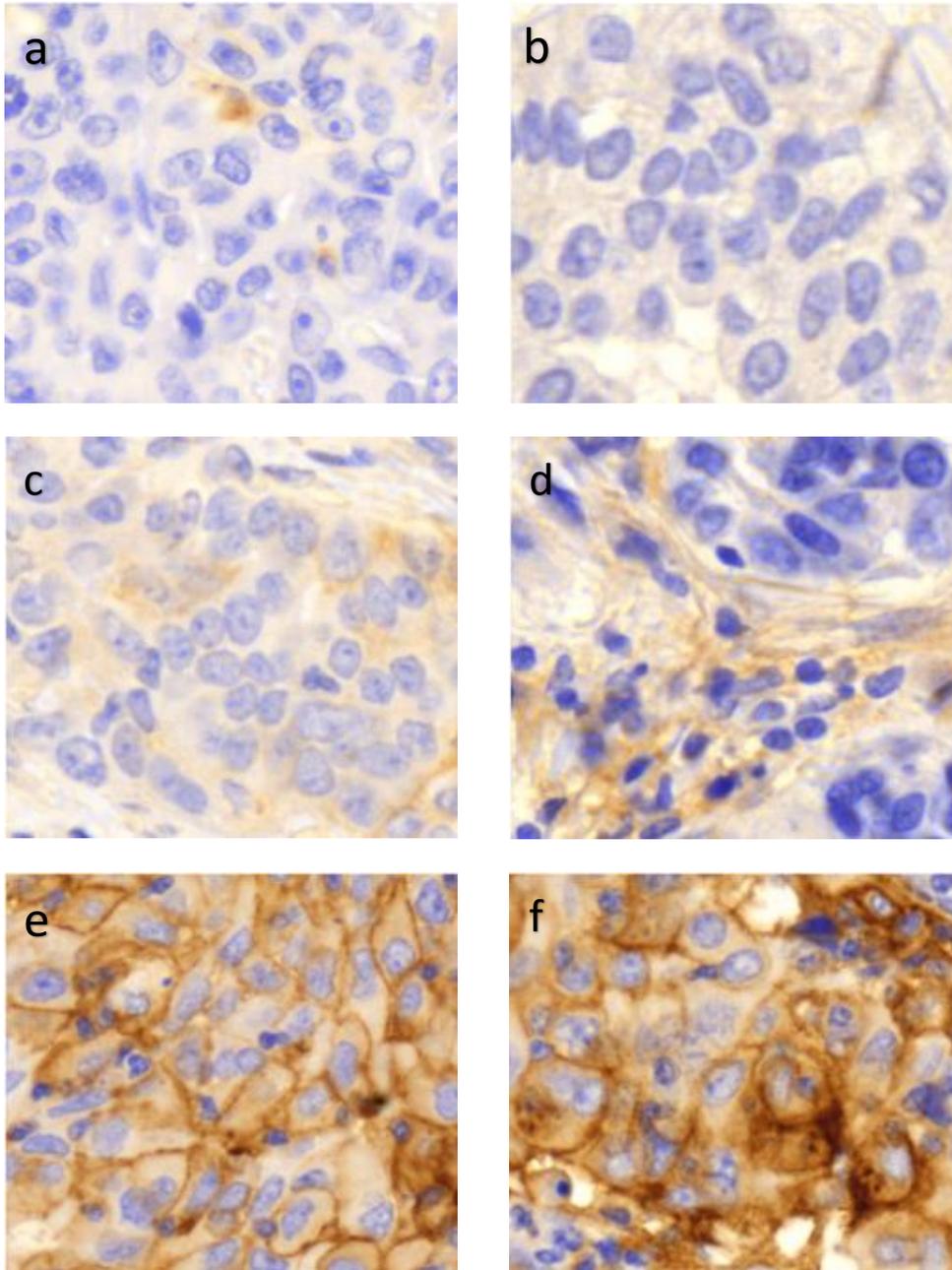
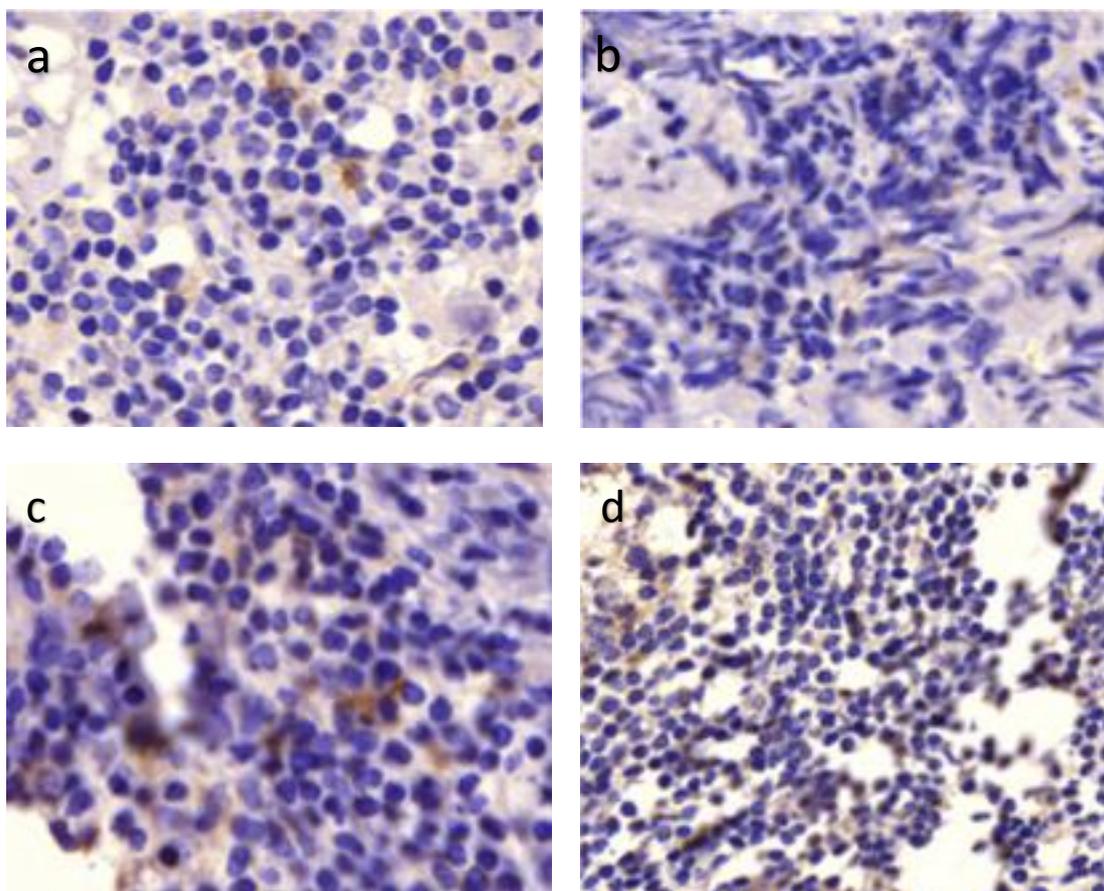


Abbildung 5 a-f: Beispiele der immunhistochemischen Programmed Death Ligand-1- (PD-L1) Auswertung. Prozentualer Anteil der positiv gefärbten Tumorzellen. a) 10% der Tumorzellen positiv, b) 20% positiv, c) 30% positiv, d) 40% positiv, e) 80% positiv, f) 90% positiv. Originalvergrößerung jeweils ca. 400x.

2.4.2 Programmed Death-1 (PD-1)

Die Literatur zur Auswertung einer PD-1-Färbung bewertet insgesamt meist An- bzw. Abwesenheit von PD-1-positiven Lymphozyten, es gibt keine einheitliche Beurteilung oder Untersuchung zur Definition eines Grenzwerts (Böger et al., 2016; Darb-Esfahani et al., 2015; Strickland et al., 2016). In der vorliegenden Studie wurde zunächst erfasst ob Lymphozyten in der Gewebsstanze zur Auswertung zur Verfügung standen, sodann wurden die zytoplasmatisch angefärbten PD-1-positiven Lymphozyten pro 500 Lymphozyten ausgezählt. Die Bewertung des Falls ergab sich aus dem Mittelwert der 3 Tumorstanzen, ein Wert unter 1 zählt „PD-1 negativ“, ab 1 wird der Fall als „PD-1 positiv“ bewertet (*Abbildung 6*). Die 2014 veröffentlichten Empfehlungen zur Auswertung der TILs-Arbeitsgruppe wurden hier berücksichtigt, jedoch wurden zur Beurteilung von TILs mittels TMA kaum konkrete Aussagen getroffen (Salgado et al., 2015). Die Autoren verweisen allerdings auf Studien mit großen Datensätzen, deren Ergebnisse bezüglich der TIL-Auswertung anhand von TMAs vergleichbar zu Untersuchungen ganzer Tumorschnitte sind (Liu et al., 2014; Schalper et al., 2014).



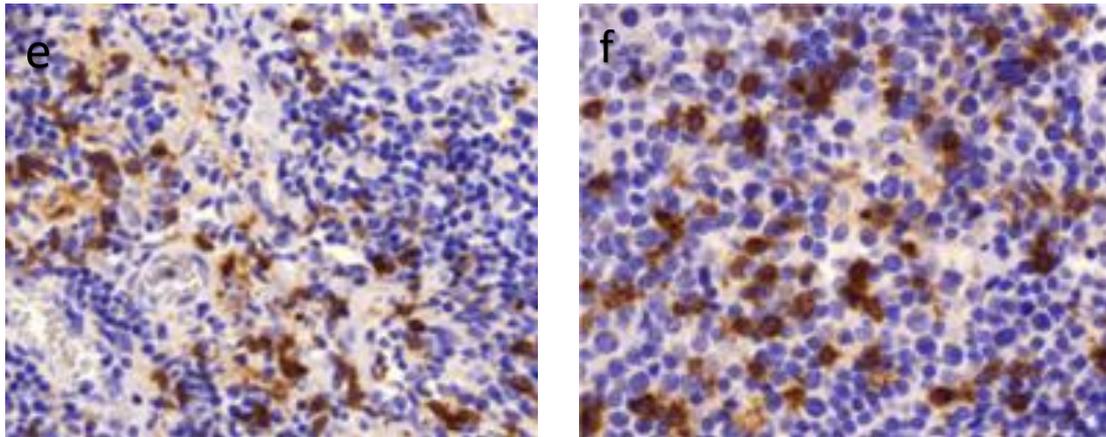


Abbildung 6 a-f: Beispiele der immunhistochemischen Programmed Death-1-Auswertung (PD-1). Positive Lymphozyten pro 500 Lymphozyten. a) 5/500 Lymphozyten positiv, b) 10/500 positiv, c) 15/500 positiv, d) 25/500 positiv, e) 50/500 positiv, f) 75/500 positiv. Originalvergrößerung jeweils ca. 400x.

Betreffend der tertiären lymphoiden Strukturen wird lediglich empfohlen sie unabhängig von TILs zu erfassen, darüber hinaus wird keine Empfehlung ausgesprochen. Daher wurde in dieser Untersuchung eine Anwesenheit von tertiären lymphoiden Strukturen im Immuninfiltrat erfasst und zusätzlich PD-1-positive Lymphozyten im Innern evaluiert (Abbildung 7).

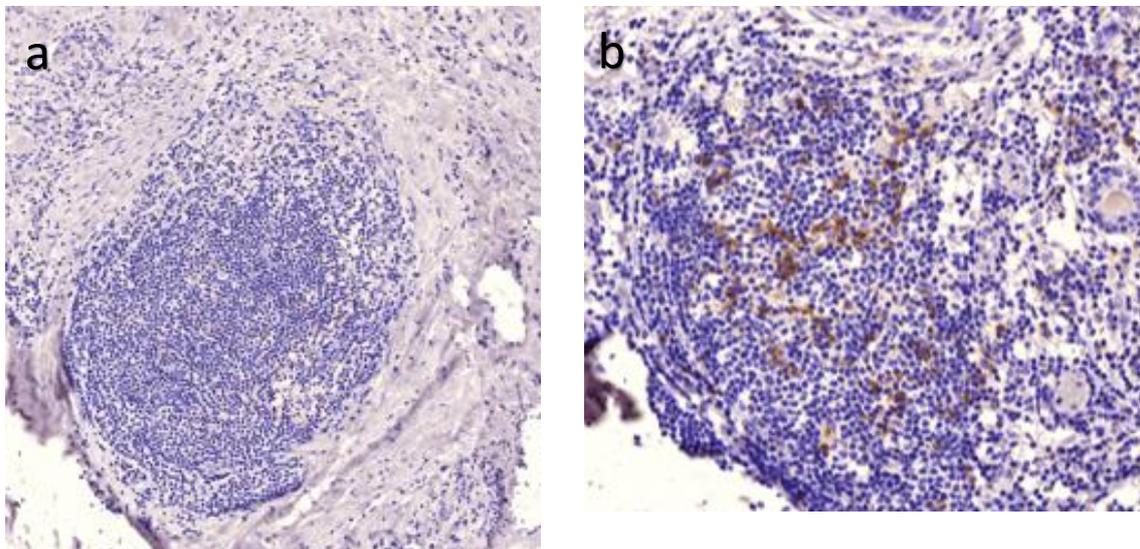


Abbildung 7 a-b: Beispiel einer Tertiären Lymphoiden Struktur (TLS). a) formierter Sekundärfollikel im Tumorgewebe Originalvergrößerung ca. 100x. b) Ausschnitt aus (a) mit Programmed Death-1 (PD-1)-positiven Lymphozyten in der TLS, Originalvergrößerung ca. 300x.

2.5 Statistische Planung

Die statistische Auswertung erfolgte entsprechend der im Vorfeld durchgeführten biometrischen Beratung am Institut für Medizinische Biometrie und Statistik. Die erhobenen Daten wurden in Microsoft Excel 2013 dokumentiert, die statistische Analyse erfolgte anschließend mittels IBM SPSS Statistics 23.0. Das Signifikanzniveau wurde 2-seitig auf $p \leq 0,05$ festgesetzt.

Im Rahmen der statistischen Analyse wurde das Ereignis „Tod“ definiert als Versterben aufgrund jeglicher Ursache, das heißt nicht krankheitsspezifisch. Das Ereignis „Progress“ wurde definiert als Progress oder Rezidiv der Mammakarzinomerkrankung oder Tod. Es erfolgten zunächst Korrelationsanalysen der Markerexpression mit dem Gesamtüberleben bzw. progressionsfreiem Überleben sowie anschließend der Markerexpression und klinisch-pathologischen Parametern unter Berechnung von Pearsons Regressionskoeffizient r . Varianzanalysen kontinuierlicher Parameter erfolgten nach der vorgesehenen Dichotomisierung mittels Student's t -Test. Es wurden Kreuztabellen dichotomer und kategorialer Parameter erstellt, der statistische Zusammenhang wurde mittels Pearsons χ^2 -Test respektive exaktem Test nach Fisher überprüft. Abschließend wurden Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier durchgeführt, der Vergleich der Überlebensraten erfolgte im Log-Rank-Test. Der prognostische Einfluss der einzelnen Parameter wurde mittels univariaten Coxregressionsanalysen berechnet unter Angabe der Hazard Ratio (HR) mit dem dazugehörigen 95%-Konfidenzintervall (KI). Zur Evaluierung des unabhängigen prognostischen Wertes der Parameter wurden multivariate Regressionsanalysen unter Berücksichtigung der etablierten Prognosefaktoren durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Parameter

Das mediane Alter bei Diagnose lag bei 66,6 Jahren, mit einer Spannweite von 30 – 91 Jahren. 81 % der Frauen befanden sich bei Diagnose in der Postmenopause (n = 60). Die Operation konnte in 58 % der Fälle brusterhaltend (BET, Brusterhaltende Therapie) durchgeführt werden (n = 43). Eine adjuvante Chemotherapie erhielten 65 % der Patienten (n = 48), 77 % wurden bestrahlt (n = 56). Die mediane Zeit der Nachsorge bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung betrug 37 Monate, mit einer Spannweite von 5 – 83 Monaten. Es wurden 26 Events registriert: insgesamt verstarben 15 Patientinnen (20 %), es kam zu 6 lokoregionalen Rezidiven (8 %) sowie 5 Erstdiagnosen einer Fernmetastasierung (7 %). Im ersten Jahr nach Erstdiagnose waren 6 % der Patientinnen verstorben (n = 4), nach 3 Jahren 20 % (n = 11) und nach 5 Jahren 37 % (n = 14), wobei die 5-Jahresdaten der Nachbeobachtung für n = 38 Patientinnen vorlagen. Ein kontralaterales Mammakarzinom trat bei 14 % der Patientinnen auf (n = 10), hierbei in 3 Fällen (4 %) synchron zur Erstdiagnose (Tabelle 3).

3.2 Tumorbiologie

In 78 % der Fälle (n = 58) zeigte sich ein schlecht differenzierter G3-Tumor. Bei 53 % der Patientinnen lag ein T1-Stadium mit einer Tumorgröße von bis zu 2 cm (n = 39) vor, bei 39 % ein T2-Stadium mit maximal 5 cm Ausdehnung (n = 29) und bei 8 % ein T3-Stadium mit einer Tumorgröße über 5 cm (n = 6). Insgesamt wurde bei 20 % der Patientinnen ein Lymphknotenbefall (Stadium N1-N3) nachgewiesen (n = 15). In 18 % der Fälle bestand eine Invasion der Lymph- und in 4 % der Blutgefäße (L1, n = 13 respektive V1, n = 3). Bei 20 % wurde der Proliferationsmarker Ki-67 erhoben (n = 15) und ergab eine Spannweite von 5-90 % mit einem Median von 30 % (Tabelle 3).

Tabelle 3: *Klinisch-pathologische Charakteristika des Kollektivs primärer tripel-negativer Mammakarzinome*

	N	%		N	%
Altersgruppen			Grading		
30 – 40 Jahre	3	4	G1/2	16	22
40 – 50 Jahre	7	10	G3	58	78
50 – 60 Jahre	19	26	<i>Gesamt</i>	74	100
60 – 70 Jahre	21	28	T-Stadium		
70 – 80 Jahre	9	12	T1	39	53
> 80 Jahre	15	20	T2	29	39
<i>Gesamt</i>	74	100	T3	6	8
Menopausenstatus			<i>Gesamt</i>	74	100
Prä-	12	16	N-Stadium		
Peri-	2	3	N0	59	80
Postmenopausal	60	81	N1	9	12
<i>Gesamt</i>	74	100	N2	5	7
Operation			N3	1	1
Ablatio	31	42	<i>Gesamt</i>	74	100
BET	43	58	L-Status		
<i>Gesamt</i>	74	100	L0	58	82
Chemotherapie			L1	13	18
Ja	48	65	<i>Gesamt</i>	71	100
Nein	26	35	Unbekannt	3	
<i>Gesamt</i>	74	100	V-Status		
Bestrahlung			V0	68	96
Ja	56	77	V1	3	4
Nein	17	23	<i>Gesamt</i>	71	100
<i>Gesamt</i>	73	100	Unbekannt	3	
Unbekannt	1				

Progress			Ki-67		
Kein Progress	64	87	< 20 %	1	7
Progress	10	13	≥ 20%	14	93
<i>Rezidiv^a</i>	6	8	Gesamt	15	100
<i>Metastasen^a</i>	5	7	Unbekannt	59	
<i>Gesamt</i>	74	100	kontralaterales Mammakarzinom		
Tod			Nein	64	86
Ja	15	20	Ja	10	14
Nein	59	80	<i>metachron</i>	5	7
<i>Gesamt</i>	74	100	<i>synchron</i>	3	4
			<i>unbekannt</i>	2	3
			<i>Gesamt</i>	74	100

BET Brusterhaltende Therapie, *T-Stadium* Tumorgröße: *T1* bis 2 cm, *T2* bis 5 cm, *T3* größer 5 cm, *N-Stadium* Lymphknotenbefall: *N0* kein Lymphknotenbefall, *N1* bis 3 befallene Lymphknoten, *N2* bis 9 befallene Lymphknoten, *N3* ab 10 befallene Lymphknoten, *L-Status* Lymphgefäßstatus: *L0* kein Lymphgefäßbefall, *L1* Lymphgefäßbefall, *V-Status* Gefäßstatus: *V0* kein Gefäßbefall, *V1* Gefäßbefall, *Ki67* Proliferationsmarker, *metachron* zeitlich versetztes Auftreten zur Erstdiagnose, *synchron* gleichzeitiges Auftreten zur Erstdiagnose.

^a Eine Patientin mit sowohl Rezidiv als auch Fernmetastasen im Verlauf.

3.3 Immunhistochemie

Nach Anfertigung und Färbung der TMA-Schnitte standen von insgesamt 666 entnommenen Stenzen, 663 zur Auswertung zur Verfügung (99,6 %). Die mitgeführten on-slide Kontrollen belegen die gelungene immunhistochemische Färbung der jeweiligen Zielstrukturen. In allen 74 Fällen der PD-L1-Auswertung (100 %) wurde Tumorgewebe erfasst. Die Expression von PD-L1 erreicht eine Spannweite von 0 bis 86,7 %, mit einem Mittelwert von 4,1 % ($\pm 12,6$ % einfache Standardabweichung (*SD*)), für 8 % der Fälle ergibt sich so ein positiver PD-L1-Status ($n = 6$), 92 % der Fälle sind PD-L1 negativ ($n = 68$) (*Abbildung 8*).

Intratumorale Lymphozyten konnten in 61 Fällen (82,4 %) für die PD-1-Färbung ausgewertet werden. Die lymphozytäre PD-1-Expression lag maximal bei 50/500

Lymphozyten mit einem Mittelwert von $6,4/500$ ($\pm 10,3$ SD) Lymphozyten. Für 54 % der Fälle ergibt sich ein positiver PD-1-Status ($n = 33$), 46 % waren negativ ($n = 28$) (Abbildung 8).

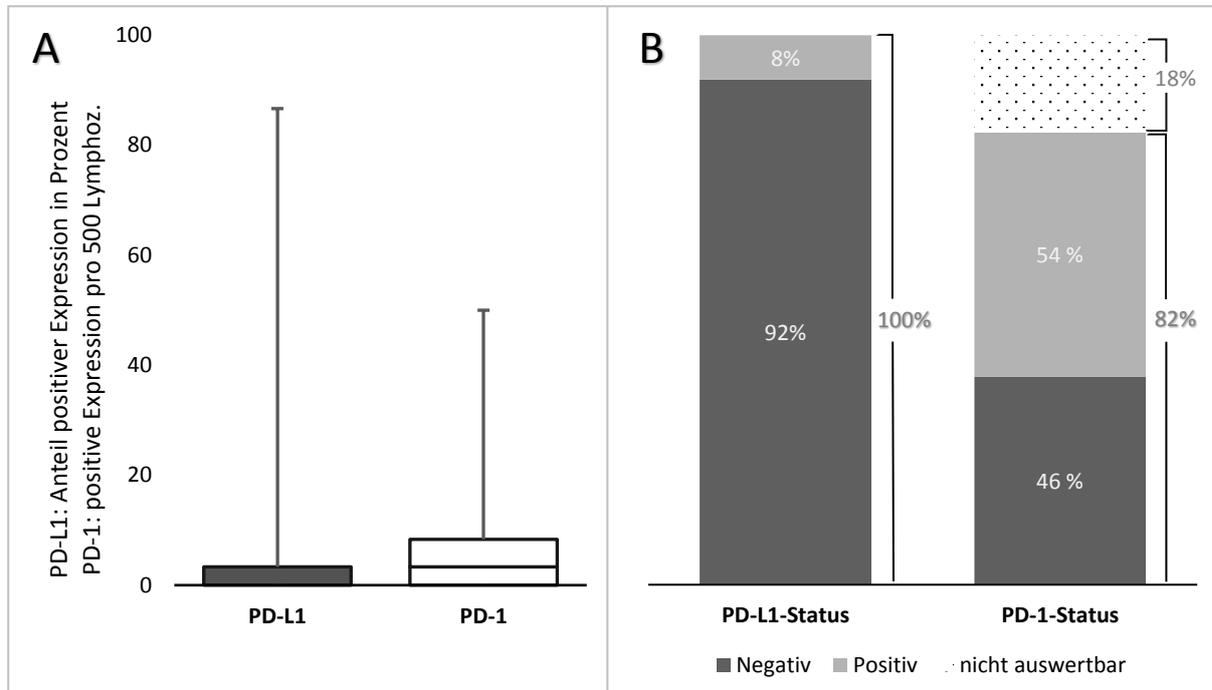


Abbildung 8: a) Box-Whisker-Plot der Markerexpression (25%-75%-Quartil-Box, Median, Minimum- und Maximum- Whisker) für die Expression von Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) und Programmed Death-1 (PD-1), b) Verteilung des Expressionsstatus PD-L1 und PD-1. Angabe des Status in jeweils gültigen Prozent, sowie Anteil der auswertbaren Fälle insgesamt in Prozent in gewinkelter Klammer.

Ein Nachweis von TILs erfolgte in 82 % der Fälle ($n = 61$). In 11 % konnten formierte tertiären lymphoiden Strukturen nachgewiesen werden ($n = 8$) und es fand sich bei 86 % dieser tertiären lymphoiden Strukturen eine PD-1-Expression der Lymphozyten ($n = 6$) (Abbildung 9).

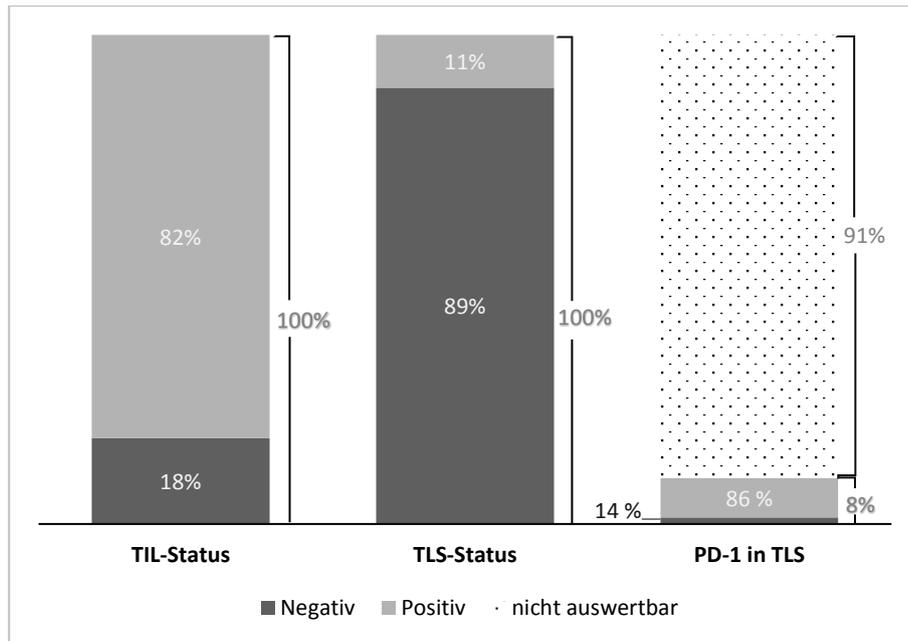


Abbildung 9: Verteilung der Positivität bezüglich Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TILs), Tertiärer lymphoider Strukturen (TLS) und Programmed Death-1-Expression (PD-1) innerhalb der TLS. Angabe der jeweils gültigen Prozent, sowie Anteil der auswertbaren Fälle insgesamt in Prozent in gewinkelter Klammer.

3.4 Korrelations- und Überlebenszeitanalysen

3.4.1 Korrelationsanalysen der Markerexpression und Überlebensdaten

Anhand von Berechnungen der linearen Regression nach Pearson konnte eine signifikante inverse Korrelation der PD-1-Expression mit dem Gesamtüberleben in Monaten (OS, *Overall Survival*) nachgewiesen werden ($p = 0,045$; $r = -0,274$) (Abbildung 10 a). Ebenso konnte eine inverse Korrelation mit dem progressionsfreien Überleben (PFS, *Progression Free Survival*) nachgewiesen werden, die knapp das Signifikanzniveau überschreitet ($p = 0,053$; $r = -0,265$) (Abbildung 10 b). Anhand von Kreuztabellen konnte ein positiver Effekt bei TIL-Positivität auf das Überleben mit dem exakten Test nach Fisher berechnet werden. Bei positivem TIL-Status überlebten 86 % der Patientinnen im Gegensatz zu 67 % bei TIL-Negativität. Dieser Unterschied überschreitet jedoch das Signifikanzniveau ($p = 0,122$).

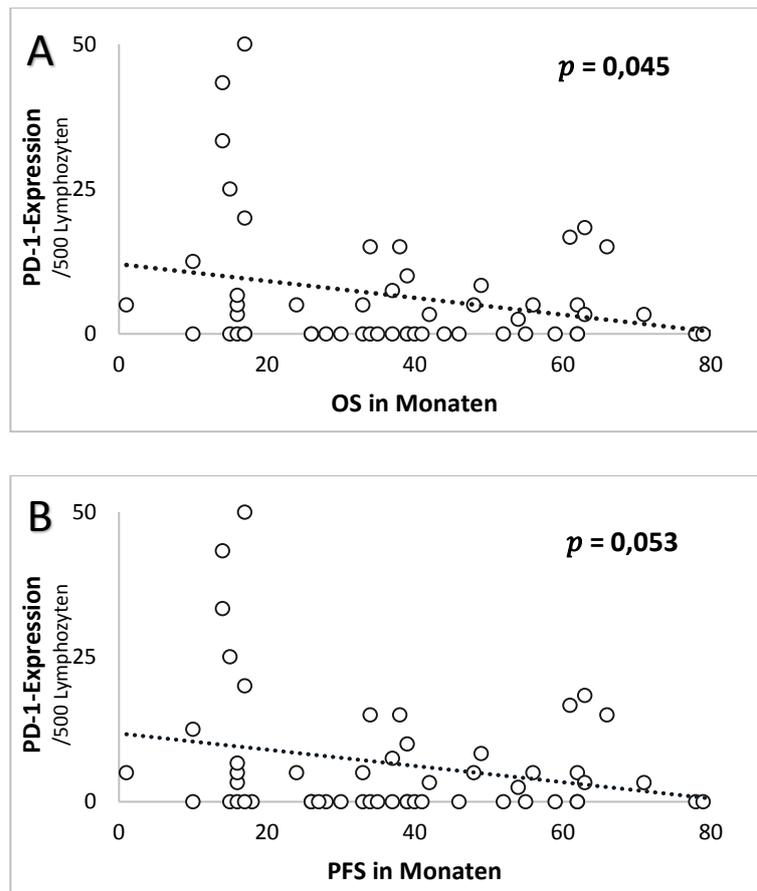


Abbildung 10: Lineare Regressionsanalyse nach Pearson a) signifikante inverse Korrelation zwischen Programmed Death-1-Expression (PD-1) und Gesamtüberleben (OS, *Overall Survival*) ($p = 0,045$), b) inverse Korrelation zwischen PD-1 und progressionsfreiem Überleben (PFS, *Progression Free Survival*) ($p = 0,053$).

3.4.2 Korrelationsanalysen der Markerexpression und weiteren klinisch-pathologischen Parametern

Stratifiziert nach TIL-Status lässt sich im Student's *t*-Test ein signifikanter Unterschied der PD-L1-Expression bei TIL-Negativität ($M < 0,001\%$; $SD < 0,001\%$) im Gegensatz zu TIL-positiven Fällen ($M = 5,0\%$; $SD = 13,7\%$) nachweisen ($p = 0,006$) (Abbildung 11 a). Es war ebenfalls ein Unterschied der TIL-negativen und – positiven Gruppen bezüglich des Alters bei Diagnose nachweisbar (TIL negativ: $M = 70,8$ Jahre; $SD = 13,1$ Jahre; TIL positiv: $M = 63,4$ Jahre; $SD = 14,5$ Jahre), jedoch wurde das Signifikanzniveau hier knapp überschritten ($p = 0,093$) (Abbildung 11 b).

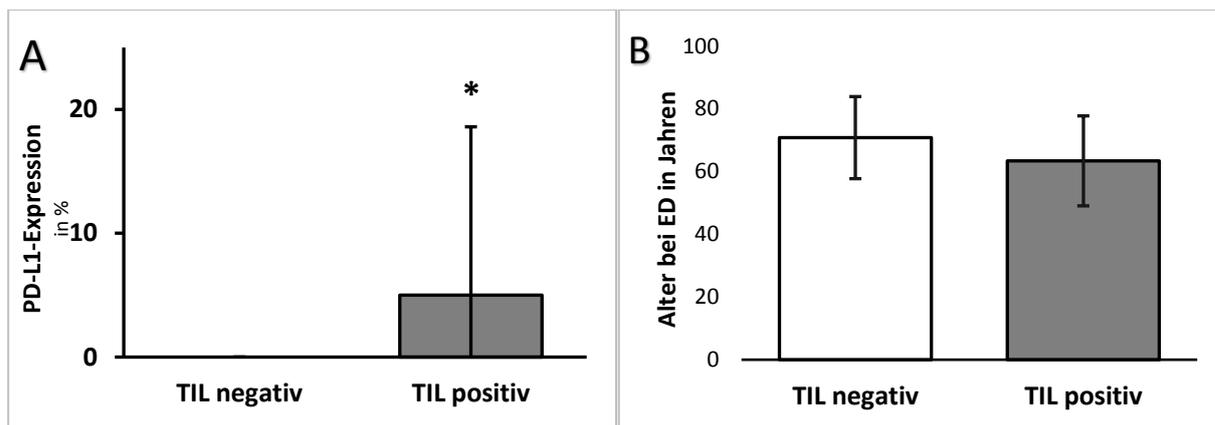


Abbildung 11: Student's *t*-Test. a) Die Programmed Death Ligand-1- (PD-L1) Expression ist signifikant (*) unterschiedlich in TIL (Tumor-infiltrierenden Lymphozyten) negativen und positiven Tumoren ($p = 0,006$), b) das Alter bei Erstdiagnose (ED) unterscheidet sich bei TIL-negativen im Gegensatz zu TIL-positiven Tumoren, jedoch ist dieser Unterschied knapp nicht signifikant ($p = 0,093$).

Mittels Kreuztabellen wurden die kategorialen klinisch-pathologischen Parameter mit dem Status der Markerexpression korreliert und anhand χ^2 -Test bzw. exaktem Test nach Fisher auf ihrer Signifikanz überprüft. Bei TIL-Positivität liegen in 84 % G3-Tumore im Gegensatz zu 54 % bei TIL-Negativität vor. Dieser statistische Zusammenhang zwischen TIL-Status und Grading ist signifikant ($p = 0,028$; exakter Test nach Fisher) (Tabelle 4).

Tabelle 4: Korrelationsanalysen des TIL-Expressionsstatus und klinisch-pathologischen Parametern, *p*-Wert nach χ^2 -Test bzw. exakten Test nach Fisher.

	TIL-Status [n (%)]		<i>p</i> ^a		TIL-Status [n (%)]		<i>p</i> ^a
	negativ	positiv			negativ	positiv	
Grading			0,028	CTX			0,051
G1/2	6 (46)	10 (16)		ja	5 (38)	43 (71)	
G3	7 (54)	51 (84)		nein	8 (62)	18 (29)	

Prozentangaben bezogen auf die jeweilige Spalte. TIL Tumor-infiltrierende Lymphozyten, CTX Chemotherapie. ^a χ^2 -Test bzw. exakter Test nach Fisher bei erwarteten Häufigkeiten < 5.

Weiterhin korreliert knapp über dem Signifikanzniveau der TIL-Status damit, ob eine Chemotherapie appliziert wurde (ja vs. nein), 38 % der Patientinnen erhielten eine Chemotherapie in der TIL-negativen im Gegensatz zu 71 % in der TIL-positiven Gruppe ($p = 0,051$; exakter Test nach Fisher) (Tabelle 4). Es ließen sich keine signifikanten

Zusammenhänge bezüglich Markerstatus und den folgenden Parametern belegen: kontralaterales Mammakarzinom, Menopausenstatus bei Diagnose, T-, N-, L-, V-Status, lokoregionales Rezidiv, Fernmetastasierung oder Tod.

3.4.3 Korrelationsanalysen der Überlebensdaten und klinisch-pathologischen Parametern

Zwischen Tod (ja vs. nein) und den folgenden Parametern konnte anhand Pearson's χ^2 -Test respektive exaktem Test nach Fisher ein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden: T-Stadium ($p = 0,009$), N-Stadium ($p = 0,001$); Lymphangioinvasion ($p = 0,014$), Chemotherapie erhalten ($p = 0,024$) und Fernmetastasierung ($p = 0,005$) (Tabelle 5). Ein Progress (ja vs. nein) korrelierte signifikant mit dem Tumorgrading ($p = 0,030$), Lymphgefäßinvasion ($p = 0,008$), einem kontralateralen Mammakarzinom ($p = 0,025$) und dem zeitlichen Auftreten eines Zweit-Mammakarzinoms ($p < 0,001$) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Korrelationsanalysen zwischen Tod bzw. Progress und klinisch-pathologischen Parametern, p -Wert des χ^2 -Tests bzw. exakten Tests nach Fisher.

	Tod [n (%)]		p^a		Progress [n (%)]		p^a
	ja	nein			ja	nein	
T-Stadium			0,009	Grading			0,030
T1	3 (20)	36 (61)		G1	1 (10)	0 (0)	
T2	11 (73)	18 (31)		G2	1 (10)	14 (22)	
T3	1 (7)	5 (8)		G3	8 (80)	50 (78)	
N-Stadium			0,001	L-Status^c			0,008^b
N0	8 (53)	51 (86)		L0	4 (44)	54 (87)	
N1	2 (13)	7 (12)		L1	5 (56)	8 (13)	
N2	4 (27)	1 (2)					
N3	1 (7)	0 (0)		kontralaterales Mammakarzinom			0,025^b
				ja	4 (40)	6 (9)	
				nein	6 (60)	58 (91)	

L-Status^c			0,014	Zweit-Mammakarzinom	<0,001
L0	9 (60)	49 (88)		metachron 4 (40)	1 (2)
L1	6 (40)	7 (12)		synchron 0 (0)	3 (5)
				unbekannt 0 (0)	2 (3)
CTX			0,024	nein	6 (60) 58 (90)
ja	6 (40)	42 (71)			
nein	9 (60)	17 (29)			
Fernmet.			0,005^b		
ja	4 (27)	1 (2)			
nein	11 (73)	58 (98)			

Prozentangaben bezogen auf die jeweilige Spalte. *T-Stadium* Tumorgöße: *T1* bis 2 cm, *T2* bis 5 cm, *T3* größer 5 cm, *N-Stadium* Lymphknotenbefall: *N0* kein Lymphknotenbefall, *N1* bis 3 befallene Lymphknoten, *N2* bis 9 befallene Lymphknoten, *N3* ab 10 befallene Lymphknoten, *L-Status* Lymphgefäßstatus: *L0* kein Lymphgefäßbefall, *L1* Lymphgefäßbefall, *CTX* Chemotherapie, *Fernmet.* Fernmetastasierung, *metachron* Zweit-Mammakarzinom zeitlich versetzt aufgetreten zur Erstdiagnose, *synchron* gleichzeitiges Auftreten zur Erstdiagnose.

^a χ^2 -Test ^b exakter Test nach Fisher bei erwarteten Häufigkeiten < 5. ^c Prozentangaben basierend auf unterschiedlichen Gesamtzahlen.

3.4.4 Univariate Überlebenszeitanalysen

Aus der Stratifizierung nach TIL-Status ergibt sich ein Vorteil des Gesamtüberlebens von 19 Monaten bei TIL-Positivität (mittleres Gesamtüberleben 68 Monate (95 %-KI 61 – 76) vs. 49 (95 %-KI 35 – 63)), allerdings wird das Signifikanzniveau hier im Log Rank-Test überschritten ($p = 0,204$). Die berechnete Hazard Ratio (*HR*) von 0,50 für TIL-positive Fälle ist ebenfalls nicht signifikant (95 %-KI 0,17 - 1,48; $p = 0,214$), bietet jedoch in Zusammenschau der Ergebnisse einen Anhalt für eine sinnvolle Stratifizierung (*Abbildung 12*, *Tabelle 6* und *Tabelle 7*).

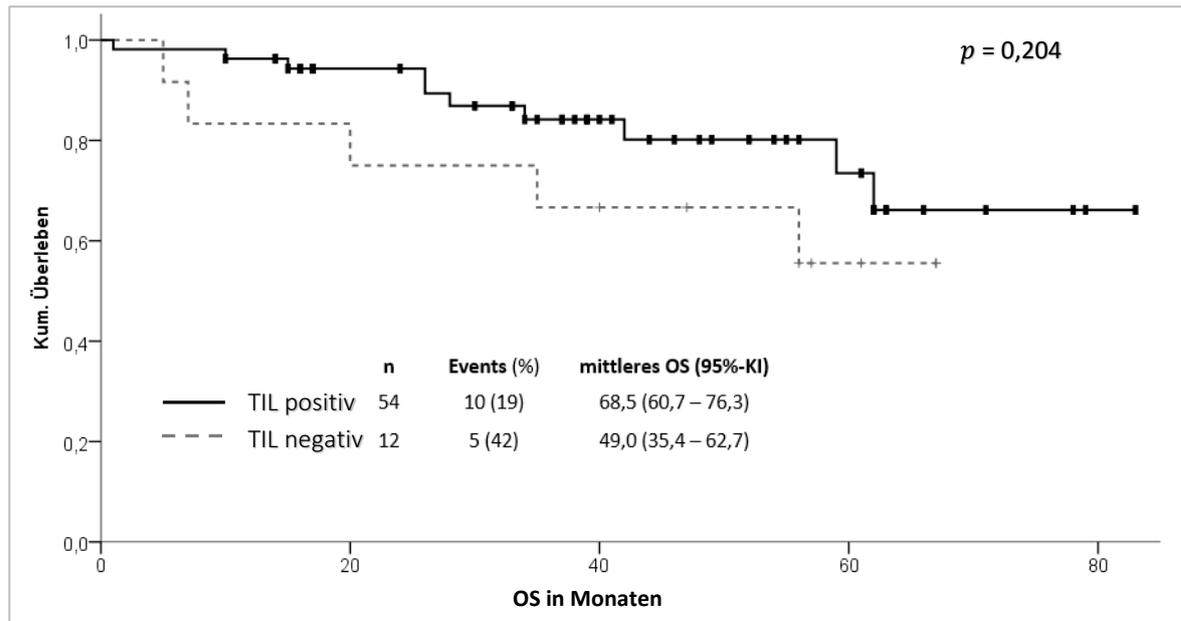
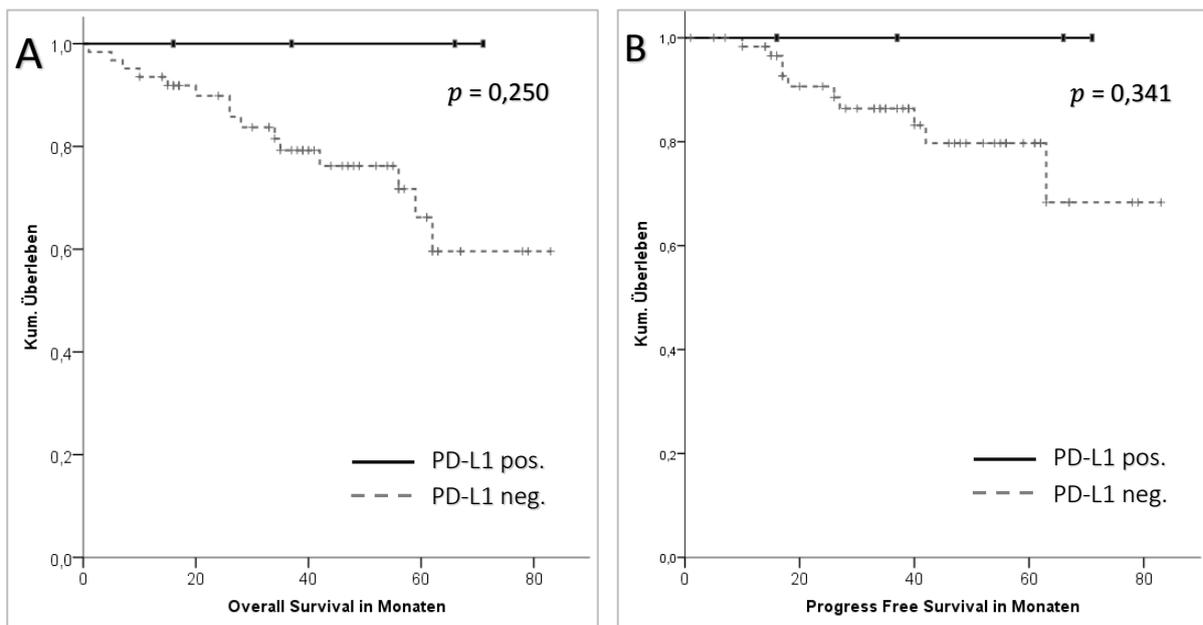


Abbildung 12: Kaplan-Meier Überlebenszeitkurven. Gesamtüberleben (OS, Overall Survival) stratifiziert nach Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) – Status ($p = 0,204$ im Log Rank Test).

In der Stratifizierung nach PD-L1-negativ vs. –positiv, PD-1-negativ vs. –positiv, sowie TLS-negativ vs. –positiv ergeben sich sowohl im Log Rank Test, als auch in der univariaten Cox Regression keine signifikanten Unterschiede des Gesamt- und progressionsfreien Überlebens (Abbildung 13, Tabelle 6 und Tabelle 7).



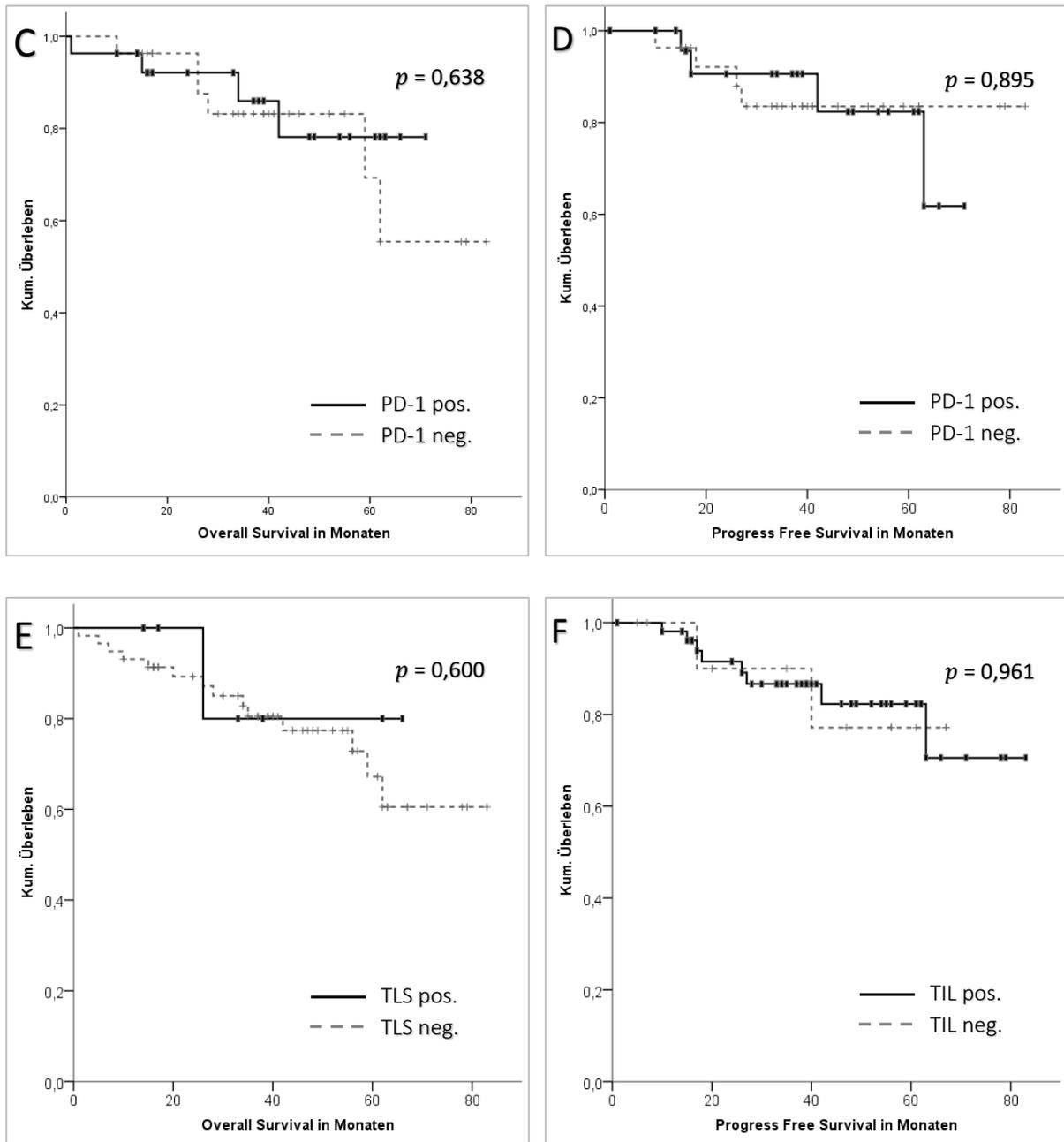


Abbildung 13: Kaplan-Meier Überlebenszeitkurven, p -Werte im Log Rank Test. Gesamtüberleben (OS, *Overall Survival*) stratifiziert nach a) Programmed Death Ligand-1- (PD-L1) – Status ($p = 0,250$), c) Programmed Death-1- (PD-1) – Status ($p = 0,638$), e) tertiäre lymphoide Struktur (TLS) – Status ($p = 0,600$), sowie progressionsfreies Überleben (PFS, *Progression Free Survival*) stratifiziert nach b) Programmed Death Ligand-1- (PD-L1) – Status ($p = 0,341$), d) Programmed Death-1- (PD-1) – Status ($p = 0,895$) und f) Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) – Status ($p = 0,961$).

Tabelle 6: Mittleres OS und PFS stratifiziert nach Markerexpressionsstatus, p-Wert des Log Rank-Tests.

		OS [in Monaten]			PFS [in Monaten]			
		<i>N</i>	<i>M</i>	95 %-KI	<i>p</i> ^a	<i>M</i>	95 %-KI	<i>p</i> ^a
PD-L1	negativ	62	kA		0,250	kA		0,341
	positiv	4	kA			kA		
PD-1	negativ	27	67	56 – 77	0,638	73	63 – 82	0,895
	positiv	27	62	53 – 70		62	54 – 70	
TILs	negativ	12	49	35 – 63	0,204	59	48 – 69	0,961
	positiv	54	68	61 – 76		70	62 – 78	
TLS	negativ	58	65	58 – 73	0,600	kA		0,286
	positiv	8	58	44 – 72		kA		

OS Gesamtüberleben (*Overall Survival*), PFS Progressionsfreies Überleben (*Progression Free Survival*), *M* Mittelwert, *95%-KI* 95%-Konfidenzintervall, *PD-L1* Programmed Death Ligand-1, *PD-1* Programmed Death-1, *TIL* Tumor-infiltrierende Lymphozyten, *TLS* Tertiäre Lymphozytäre Strukturen, *kA* keine Angabe, da alle Fälle zensiert. ^a Log Rank-Test.

Tabelle 7: Hazard Ratio (HR) der Marker bezüglich Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben, p-Wert der univariaten Coxregression.

Faktor	OS [in Monaten]			PFS [in Monaten]		
	<i>HR</i>	<i>95%-KI</i>	<i>p</i> ^a	<i>HR</i>	<i>95%-KI</i>	<i>p</i> ^a
PD-L1 ^b	0,04	0,00 – 166,55	0,455	0,04	0,00 – 1037,28	0,538
PD-1 ^c	0,74	0,21 – 2,63	0,640	1,01	0,27 – 4,43	0,895
TIL ^d	0,50	0,17 – 1,48	0,214	0,96	0,20 – 4,55	0,961
TLS ^e	0,59	0,08 – 4,47	0,605	0,04	0,00 – 349,31	0,491

OS Gesamtüberleben (*Overall Survival*), PFS Progressionsfreies Überleben (*Progression Free Survival*), *HR* Hazard Ratio, *95%-KI* 95%-Konfidenzintervall, *PD-L1* Programmed Death Ligand-1, *PD-1* Programmed Death-1, *TILs* Tumor-infiltrierende Lymphozyten, *TLS* Tertiäre Lymphozytäre Strukturen.

^a univariate Coxregression, ^b PD-L1-negativ vs. -positiv, ^c PD-1-negativ vs. -positiv, ^d TIL-negativ vs. -positiv, ^e TLS-negativ vs. -positiv.

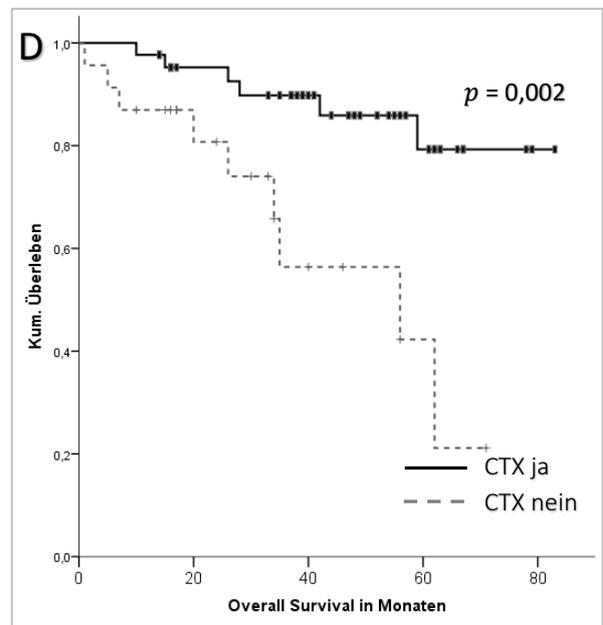
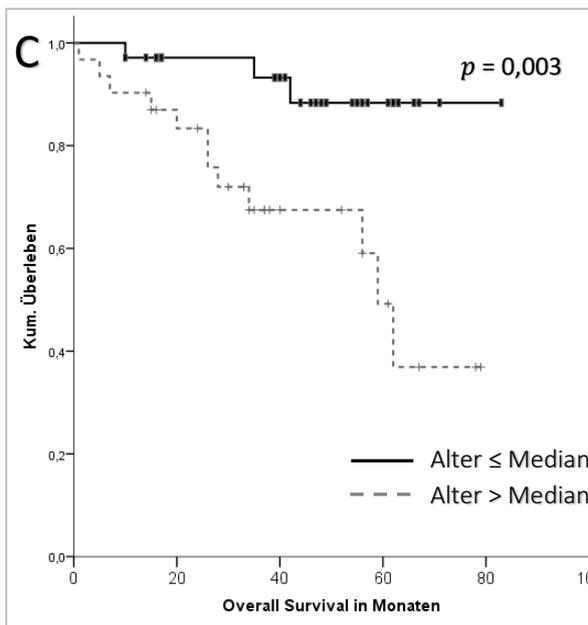
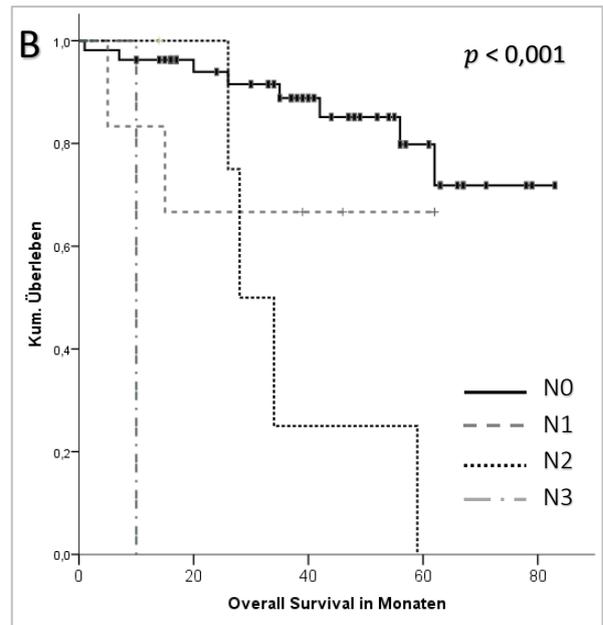
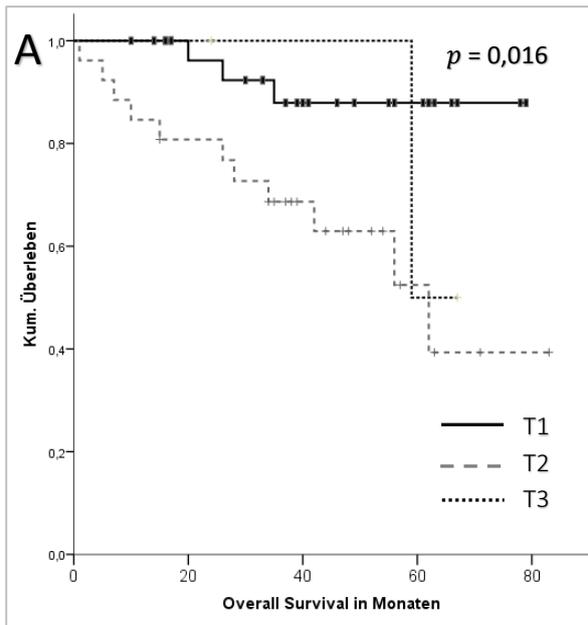
Mittels univariater Cox-Regressionsanalyse ließ sich für den T- und N-Stadium ein signifikanter Effekt auf das Gesamtüberleben ermitteln ($p = 0,036$ und $p = 0,001$) (Abbildung 14 und Tabelle 8). Bei einem Alter bei Erstdiagnose größer als der Median wurde eine signifikante Erhöhung der Hazard Ratio in Bezug auf das Gesamtüberleben nachgewiesen (HR 5,50 (95%-KI 1,54 – 19,58); $p = 0,009$), ebenso ließ sich für die Faktoren Chemotherapie (erhalten vs. nicht erhalten, HR 4,66 (95%-KI 1,63 – 13,33); $p = 0,004$) und Fernmetastasierung (nein vs. ja, HR 7,24 (95%-KI 2,17 – 24,15); $p = 0,001$) ein signifikanter Effekt nachweisen. Bei Vorliegen einer Lymphangiainvasion erhöht sich die Hazard Ratio bezüglich sowohl des Gesamt- als auch des progressionsfreien Überlebens (L0 vs. L1, HR 4,55 (95%-KI 1,61 - 12,89); $p = 0,004$ und HR 8,97 (95%-KI 2,39 – 33,61); $p = 0,001$) (Abbildung 14 und Tabelle 8).

Tabelle 8: Hazard Ratio der klinisch-pathologischen Parameter bezüglich Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben, p -Wert der univariaten Coxregression.

OS [in Monaten]				OS [in Monaten]			
Faktor	HR	95% KI	p^a	Faktor	HR	95% KI	p^a
T-Status			0,036	Alter ^b	5,50	1,54 – 19,58	0,009
- T1	1,00			CTX ^c	4,66	1,63 – 13,33	0,004
- T2	5,34	1,49 - 19,21	0,010	Fernmet ^d	7,24	2,17 – 24,15	0,001
- T3	2,96	0,31 – 28,75	0,350	L-Status ^e	4,55	1,61 - 12,89	0,004
N-Status			0,001				
- N0	1,00			PFS [in Monaten]			
- N1	2,07	0,44 – 9,81	0,360	Faktor	HR	95% KI	p^a
- N2	7,19	2,11 – 24,54	0,002	L-Status ^e	8,97	2,39 – 33,61	0,001
- N3	33,44	3,29 - 340,37	0,003				

OS Gesamtüberleben (*Overall Survival*), PFS Progressionsfreies Überleben (*Progression Free Survival*), HR Hazard Ratio, 95 %-KI 95 % Konfidenzintervall, CTX Chemotherapie, Rx Bestrahlung, Fernmet. Fernmetastasierung, *kontralat.* BC kontralaterales Mammakarzinom, *Zweit-Ca* zeitliches Auftreten eines Zweit-Mammakarzinoms.

^a univariate Coxregression, ^b ≤ Median vs. > Median ^cChemotherapie ja vs. nein ^dFernmetastasen nein vs. ja ^eL0 vs. L1.



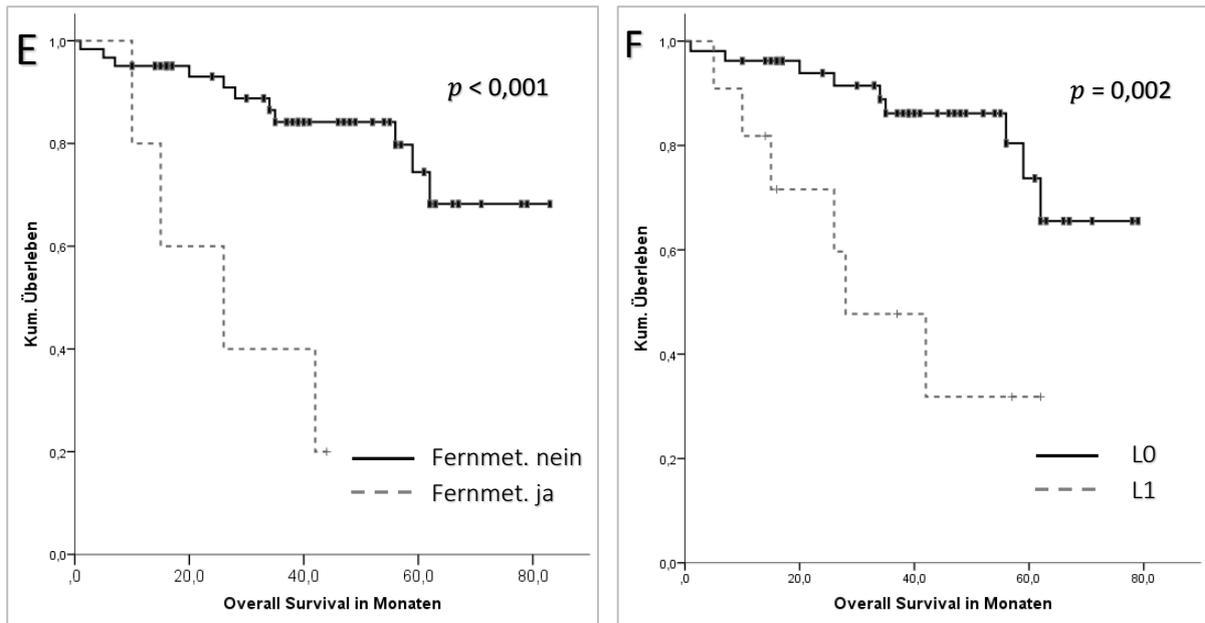


Abbildung 14: Kaplan-Meier Überlebenszeitkurven, p -Werte im Log Rank Test. Gesamtüberleben (OS, *Overall Survival*) stratifiziert nach a) T-Stadium ($p = 0,036$), b) N-Stadium ($p = 0,001$), c) Alter bei Erstdiagnose ($p = 0,009$), d) Chemotherapie ($p = 0,004$), e) Fernmetastasen ($p < 0,001$) und f) L-Status ($p = 0,002$).

3.4.5 Multivariate Überlebenszeitanalysen

Unter Einschluss der etablierten Prognosefaktoren T-, N-Stadium, Grading und Alter bei Diagnose wurden multivariate Cox-Regressionen der Markerexpression durchgeführt, um den unabhängigen prognostischen Einfluss auf das Gesamt- und progressionsfreie Überleben zu überprüfen. So lässt sich ein signifikanter und unabhängiger Überlebensvorteil bei positivem TIL-Status nachweisen (HR 0,19 (95 %-KI 0,04 - 0,86); $p = 0,031$), bei ebenfalls signifikantem Einfluss von T- und N-Stadium sowie Alter bei Diagnose auf das Gesamtüberleben ($p = 0,038$ und $p = 0,002$, sowie $p = 0,011$) (Tabelle 9). Bei positivem PD-1-Status ist eine Hazard Ratio von 3,86 (95 %-KI 0,60 - 24,78) nachweisbar, dieses Ergebnis liegt jedoch über dem Signifikanzniveau ($p = 0,155$), bei allerdings signifikantem Einfluss von N-Stadium und Alter bei Erstdiagnose ($p = 0,010$ und $p = 0,015$), (Tabelle 9). Es ließ sich weder ein signifikanter Einfluss des PD-L1- oder TLS-Status auf das Gesamtüberleben, noch einer Markerexpression in Bezug auf das progressionsfreie Überleben nachweisen.

Tabelle 9: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalysen des TIL- und PD-1-, sowie PD-L1- und TLS-Status, unter Einschluss von T-, N-Stadium, Grading und Alter bei Diagnose für das Gesamtüberleben.

Faktor	HR	95% KI	p ^a	Faktor	HR	95% KI	p ^a
TILs^b	0,19	0,04 - 0,86	0,031	PD-1^e	3,86	0,60 - 24,78	0,155
T-Stadium			0,038	T-Stadium			0,125
- T1	1,00			- T1	1,0		
- T2	4,24	1,03 - 17,49	0,046	- T2	9,41	0,88 - 101	0,064
- T3	0,35	0,03 - 4,96	0,441	- T3	1,20	0,04 - 41,25	0,921
N-Stadium			0,002	N-Stadium			0,010
- N0	1,00			- N0	1,0		
- N1	8,07	1,21 - 52,43	0,029	- N1	5,69	0,41 - 79,83	0,197
- N2	7,31	1,48 - 36,11	0,015	- N2	6,89	0,99 - 47,76	0,051
- N3	227,26	10,09 - 5121,03	0,001	- N3	2170	19,14 - 245969	0,001
Grading ^c	1,57	0,37 - 6,64	0,539	Grading ^b	3,88	0,44 - 34,03	0,222
Alter ^d	10,00	1,68 - 59,34	0,011	Alter ^c	36,37	1,99 - 663,23	0,015

Faktor	HR	95% KI	p ^a	Faktor	HR	95% KI	p ^a
PD-L1^f	< 0,001	0,00 - n.e.	0,986	TLS^g	0,96	0,12 - 9,17	0,955
T-Stadium			0,081	T-Stadium			0,107
- T1	1,00			- T1	1,00		
- T2	3,85	0,95 - 15,53	0,058	- T2	3,56	0,86 - 14,70	0,079
- T3	0,67	0,05 - 8,77	0,762	- T3	0,68	0,05 - 9,32	0,769
N-Stadium				N-Stadium			0,006
- N0	1,00		0,011	- N0	1,00		
- N1	6,47	1,02 - 40,92	0,047	- N1	7,56	1,20 - 47,51	0,031
- N2	3,41	0,85 - 13,70	0,083	- N2	3,76	0,94 - 15,08	0,062
- N3	113,88	5,46 - 2376,68	0,002	- N3	143,34	6,74 - 3048,35	0,001
Grading ^b	0,97	0,28 - 3,40	0,968	Grading ^b	0,87	0,25 - 3,09	0,828
Alter ^c	9,67	1,64 - 56,73	0,012	Alter ^c	10,49	1,76 - 62,44	0,010

HR Hazard Ratio, 95%-KI 95 % - Konfidenzintervall, TILs Tumor-infiltrierende Lymphozyten, PD-1 Programmed Death-1, PD-L1 Programmed Death Ligand-1, TLS Tertiäre lymphoide Strukturen, n.e. nicht erreicht.

^a multivariate Coxregression, ^b TIL-negativ vs. -positiv, ^c G1/G2 vs. G3, ^d Alter bei Diagnose (≤ Median vs. > Median),

^e PD-1-negativ vs. -positiv, ^f PD-L1-negativ vs. -positiv, ^g TLS-negativ vs. -positiv.

4 Diskussion

Die hier vorgelegte Studie untersucht zum ersten Mal die immunhistochemische Expression von PD-1, PD-L1 und TILs an der Tumorgrenzfläche eines exakt definierten Kollektivs primärer tripel-negativer Mammakarzinome im Microarray. Zum Zeitpunkt der Planung der Studie lagen keinerlei Untersuchungen mit vergleichbarer Fragestellung vor, sodass dies eine valide Analyse der Immuncheckpoint-Marker PD-1 und PD-L1 sowie TILs an der Grenzfläche primärer tripel-negativer Mammakarzinome darstellt.

Die hier erhobenen klinisch-pathologischen Parameter zeigen übereinstimmende Ergebnisse verglichen mit tripel-negativen Kollektiven anderer Studien. In einer Zusammenschau werden für tripel-negative Mammakarzinome 66-91 % G3-Tumore angegeben, in unseren Daten liegt dies in 78 % der Fälle vor (Carey et al., 2010). Die Verteilung der TumorgroÙe bei Diagnose entspricht ebenfalls den publizierten Studien: unsere Daten zeigen in 8 % ein T3-Stadium (≥ 5 cm) im Vergleich zu 5-8 % der Literaturangabe, 39 % T2-Stadium (2-5 cm) im Vergleich zu 34-59 % und in 53 % T1-Stadium (bis 2 cm) im Vergleich zu 33-46 % (Adams et al., 2014; Dent et al., 2007; Liedtke et al., 2013). In unserem Kollektiv ist ein nachgewiesener Lymphknotenbefall in 20 % der Fälle etwas geringer als die Vergleichswerte von 40-59 %. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt in unserer Untersuchung bei 67 Jahren und damit etwas über dem lediglich bei Dent et al. angegebenen Wert von 53 Jahren. Ein deutlich niedriges medianes Alter von 48 Jahren bei Erstdiagnose findet sich für den tripel-negativen Anteil einer US-amerikanischen Studie in neoadjuvanter Situation aus 2008 (Liedtke et al., 2008). In einer Studie von Beckers et al. aus 2016, die mit unserer Analyse am besten zu vergleichen ist, liegt das mediane Alter bei 57 Jahren, also näher an unserem Wert, der jedoch insgesamt etwas über den Literaturangaben liegt (Beckers et al., 2016). Ebenfalls lässt sich der prognostische Wert der hier erhobenen Daten als signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben bestätigen, was sich in den Überlebenskurven der Kaplan-Meier-Analyse sowie den berechneten Hazard Ratios der univariaten Coxregression darstellen lässt. Es

zeigt sich insgesamt eine gute Übereinstimmung der hier erhobenen Daten und deren prognostischer Aussagekraft im Vergleich mit den Literaturangaben, sodass hier ein repräsentatives Kollektiv primärer tripel-negativer Mammakarzinome zur Analyse vorlag.

4.1 PD-1-Expression und therapeutische Überlegungen

4.1.1 PD-1-Expression beim tripel-negativen Mammakarzinom

Zu einem funktionierenden Immunsystem gehört die negative Regulation durch die PD-Achse. Eine Aktivierung des PD-1-Rezeptors inhibiert die exprimierende T-Zelle lokal und unterbindet die Immunreaktion. An der Tumorgrenzfläche ermöglicht dies vor Ort befindlichen Tumorzellen sich einer möglichen Erkennung durch das Immunsystem zu entziehen. Der Ligand der PD-1-Rezeptors PD-L1 wurde bereits auf der Oberfläche verschiedener Tumoren nachgewiesen und legt die Vermutung nahe, dass die Expression von PD-1 auf T-Zellen bzw. PD-L1 auf Tumorzellen mit einer Verschlechterung der Prognose und des Überlebens einhergeht (Dong et al., 2002). Aus den hier vorgelegten Daten ergibt sich für das tripel-negative Mammakarzinom eine PD-1-Positivität in 54 % der Fälle. In einer Untersuchung von Muenst et al. wurde dies für 27,4 % der Gruppe der Basal-like Mammakarzinome nachgewiesen (Muenst et al., 2013). Die Untersuchung erfolgte mittels TMAs von insgesamt 660 Mammakarzinom-Fällen, wovon durch negative Rezeptorexpressionen für ER, PR und HER2 $n = 128$ als Basal-like definiert wurden und sich so mit unseren Ergebnissen vergleichen lassen. Eine chinesische Studie aus 2018 von Ren et al. gibt in 70,3 % eine Positivität für PD-1 an für ihr Kollektiv bestehend aus 195 Fällen tripel-negativer Mammakarzinome, die mittels TMAs untersucht wurden (Ren et al., 2018). Bei Ghebeh et al. findet sich eine PD-1-Positivität von 60 % in einem Kollektiv von 68 Mammakarzinomen (Ghebeh et al., 2006, 2008). Allerdings erfolgt keine Angabe zum tripel-negativen Anteil innerhalb des Kollektivs, sodass ein Vergleich mit unseren Daten kaum möglich ist, während sich bei Muenst et al. für ihr Mammakarzinom-Gesamtkollektiv eine PD-1-Positivität von 15,8 % findet. Interessanterweise wurden bei Ghebeh neben Lymphozyten im Tumorgewebe auch im angrenzenden nicht-befallenen Brustdrüsengewebe bis zu 30 % PD-1-positive T-Lymphozyten nachgewiesen. Allerdings hatten über die Hälfte der Patientinnen eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten ($n = 36$). Diese Gruppe wurde nicht differenziert betrachtet oder mögliche Einflüsse auf die

getroffenen Aussagen kommentiert. In unserer Studie wurden explizit nur adjuvant behandelte Fälle eingeschlossen, um Chemotherapie-induzierte Veränderungen des Tumormikromilieus auszuschließen. Veränderungen der Tumorumgebung durch neoadjuvante Chemotherapie beim Mammakarzinom haben Pelekanou et al. vor kurzem an einem kleinen Kollektiv von 59 Mammakarzinom-Fällen untersucht, ebenfalls ohne Differenzierung nach Subtypen (Pelekanou et al., 2018). Im Vergleich von prä- und posttherapeutischen Tumorproben zeigte sich in 78 % eine Abnahme der TILs von im Median 15 %, die allerdings nicht mit einer pCR korreliert. Beim high-grade serösem Ovarialkarzinom wurden von Lo et al. an 26 Fällen Veränderungen der TILs sowie des Mikromilieus zu Beginn einer neoadjuvanten Chemotherapie mit den Befunden nach 3 Zyklen Chemotherapie bei Intervall-Operation verglichen (Lo et al., 2017). Hierbei konnte eine signifikante Zunahme der PD-1-positiven TILs nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich für PD-1 als prognostischen Marker nach Erweiterung der Kohorte um zusätzlich 64 postneoadjuvante Proben aus Intervall-Operationen keine statistische Signifikanz. Auch ließ sich keine signifikante Zunahme von PD-L1-positiven Zellen nachweisen. Studien mit größeren Fallzahlen zur genauen Untersuchung der Änderungen des Mikromilieus unter Chemotherapie wären wünschenswert, allerdings muss eine wiederholte invasive Intervention zur Probengewinnung als limitierender Faktor gesehen werden.

Bei Korrelation der PD-1-Expression mit dem Gesamtüberleben konnte in der hier vorgelegten Studie ein signifikanter inverser Zusammenhang nachgewiesen werden. Eine Zunahme der PD-1-Expression der Lymphozyten im Tumormikromilieu geht in dieser Untersuchung mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben einher. Diese Aussage deckt sich mit den Ergebnissen von Muenst et al., die ebenfalls ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben bei Vorliegen von PD-1-positiven TILs beim Basal-like Mammakarzinomen nachgewiesen haben (Muenst et al., 2013). Es konnte ebenfalls über alle Subtypen hinweg ein insgesamt schlechteres Gesamtüberleben bei PD-1-Positivität nachgewiesen werden. Die multivariate Analyse von Muenst erfolgte für das Gesamtkollektiv, zusätzlich zum Subtyp wurden die gleichen etablierten Prognosefaktoren wie in unserer Studie berücksichtigt (Alter, Grading, T- und N-Status). Es zeigte sich für die PD-1-Positivität einen signifikanten prognostischen Einfluss in Bezug auf das Gesamtüberleben, den unsere Ergebnisse auch bei Überschreiten des Signifikanzniveaus

bestätigen. Diese Daten untermauern das Konzept, dass der Tumor über PD-1-Aktivierung eine effektive Immunantwort unterbindet und so ein vermehrter Nachweis des PD-1-Rezeptors im Mikromilieu mit schlechterem Überleben vergesellschaftet ist. Im Gegensatz dazu weisen jedoch die Ergebnisse von Ren et al. einen signifikanten Vorteil des Gesamt- und erkrankungsfreien Überlebens bei PD-1-Positivität nach (Ren et al., 2018). Bei vergleichbarer Größe der tripel-negativen Kollektive beider Studien ist der wesentliche Unterschied der verwendete Antikörper. Bei Muenst et al. wurde der gleiche PD-1-Antikörper wie in unserer Studie verwendet und die veröffentlichten Abbildungen zeigen eine mit unseren Ergebnissen sehr vergleichbare Färbung. Ren et al. verwendeten Antikörper eines anderen Herstellers und die abgebildeten Beispiele für PD-1 zeigen eine deutlich dezentere und insgesamt reduzierte immunhistochemische Reaktion. Eine weitere kürzlich veröffentlichte Studie aus Singapur hat in ihrem Kollektiv von 269 tripel-negativen Mammakarzinomen auch ein signifikant verbessertes Gesamt- und erkrankungsfreies Überleben bei „hoher“ PD-1- Expression nachweisen können (Yeong et al., 2019). Die Untersuchung erfolgte mittels TMAs, die Bewertung „hoch“ erfolgte bei mehr als im Median ausgezählten PD-1-positiven Lymphozyten und es wurde hier der gleiche Antikörper wie in unserer Studie verwendet. Im Vergleich dieser signifikanten und divergenten Ergebnisse fällt auf, dass beide Studien mit positivem Einfluss auf das Überleben bei PD-1-Positivität ein rein asiatisches Kollektiv untersucht haben. Unterschiede der Inzidenz von tripel-negativen Mammakarzinomen bei Patienten verschiedener Ethnizitäten und Länder sind beschrieben, so liegt ein tripel-negativer Subtyp in Westafrika in bis zu 55 % der Fälle vor, bis 47 % bei Afroamerikanern, 31 % in Korea, 18 % in China und 8 % in Japan (Carey et al., 2010). Weiterführende Unterschiede in der Tumorbilogie sind vorstellbar, jedoch gibt es hierzu keine veröffentlichten Untersuchungen. Studien anderer Autoren finden weniger eindeutige Ergebnisse in Bezug auf Überlebensdaten. Brockhoff et al. konnten in ihrem Kollektiv von 103 tripel-negativen Mammakarzinomen eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens, jedoch nicht des Gesamtüberlebens bei PD-1-Positivität über 10 TILs pro Ausschnitt nachweisen, wobei hier ebenfalls 8 neoadjuvant behandelte Fälle eingeschlossen waren und ein anderer Antikörper als in unserer Studie verwendet wurde (Brockhoff et al., 2018). Die von Noske et al. untersuchte PD-1-Expression an einem Kollektiv von Mammakarzinomen mit Lymphknotenbefall beinhaltete 182 Fälle von tripel-negativem

Subtyp (Noske et al., 2019). Mittels TMA konnte ein signifikant verbessertes progressionsfreies nicht jedoch Gesamtüberleben bei PD-1-Positivität von $\geq 1\%$ festgestellt werden, wobei dieser Grenzwert nach Auswertung definiert wurde. Barrett et al. haben in ihrer Untersuchung von Tumorschnitten von 55 tripel-negativen Mammakarzinomen keine signifikanten Änderungen des progressionsfreien oder Gesamtüberlebens feststellen können (Barrett et al., 2018). Es wurden 16 neoadjuvant behandelte Fälle eingeschlossen und der gleiche Antikörper wie in unserer Studie verwendet. In dieser US-amerikanischen Studie wäre zum Vergleich mit den zuvor genannten Studien eine Aufschlüsselung der Ethnizität der eingeschlossenen Patientinnen interessant gewesen, bei jedoch eingeschränkter Aussagekraft aufgrund der Fallzahl. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich zum aktuellen Zeitpunkt keine prognostische Aussagekraft für die immunhistochemische PD-1-Expression beim tripel-negativen Mammakarzinom ableiten. Es muss darauf hingewiesen werden, dass insbesondere Unterschiede in der immunhistochemischen Aufbereitung sowie verschiedene Cut-offs die Etablierung einer prognostischen Aussage erschweren. Eine Untersuchung zur Standardisierung der Erhebung und Auswertung der immunhistochemischen PD-1-Expression ist wünschenswert.

4.1.2 Klinische Studien zu PD-1-Inhibition und möglichen Biomarkern

Im Mausmodell konnten andere Autoren im Rahmen chronischer Virusinfektionen die spezifische Hochregulierung des PD-1-Rezeptors als Zeichen der T-Zellermüdung nachweisen (Barber et al., 2006). Durch-Blockade des PD-Signalweges ließ sich hier die T-Zellfunktion vollständig rehabilitieren, es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Anzahl und Funktionalität der Virus-spezifischen T-Zellen, sowie eine anhaltende Immunantwort. Diese Möglichkeit der therapeutischen Wiederaktivierung des Immunsystems hat zu einer Vielzahl von klinischen Studien in verschiedenen Tumorentitäten geführt, die den Einsatz monoklonaler Antikörper zur Hemmung verschiedener Immuncheckpoints untersuchen. Hier steht neben der Frage des therapeutischen Einsatzes der untersuchten Antikörper auch die Suche nach prädiktiven Parametern im Vordergrund, also die Suche nach Biomarkern, die eine Vorhersage zum Therapieansprechen ermöglichen und somit die Grundlage einer sinnvollen Stratifizierung bilden können. Eine PD-1-Inhibition zur Therapie des Mammakarzinoms kommt in der

gynäkologischen Onkologie zu den folgenden Ergebnissen: In einer Phase-I-Studie des PD-1-Inhibitors Pembrolizumab in Monotherapie bei verschiedenen Primärtumoren war eine Patientin mit Hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom eingeschlossen (Patnaik et al., 2015). Es wurde neben Überlebensdaten die immunhistochemische Expression von PD-L1, jedoch nicht von PD-1 evaluiert. Die PD-L1-Positivität wurde bei Expression auf $> 5\%$ der Tumorzellen festgesetzt. Die Patientin mit dem Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom zeigte sich unter der Therapie stabil und war negativ für die genannte Definition der PD-L1-Expression. 2 Fälle des vollständigen Ansprechens waren nicht immunhistochemisch evaluiert worden und 2 von 8 Patienten mit progredienter Erkrankung waren positiv für PD-L1. Hieraus lassen sich keine weiteren Rückschlüsse auf einen etwaigen prädiktiven Wert der PD-L1-Expression für eine PD-1-Inhibition für die untersuchten Tumorentitäten ableiten. In dieser Analyse oder den nachfolgenden *Keynote*-Studien wird nicht erläutert, weshalb hier die PD-L1-Expression untersucht wurde oder dies einer Stratifizierung nach PD-1, der Zielstruktur des verwendeten Antikörpers vorgezogen wurde. Die Phase-Ib-Studie (*Keynote-012*) untersuchte den Einsatz von Pembrolizumab als Monotherapie unter Einschluss von 32 Patienten mit fortgeschrittenem sowie PD-L1-positivem tripel-negativem Mammakarzinom, wobei die PD-L1-Expression als positiv bei $\geq 1\%$ der Tumorzellen oder bei Nachweis im Stroma bewertet wurde (Nanda et al., 2016). Es zeigten sich auch hier divergente Ergebnisse. Es kam zu einem Todesfalls durch intravaskuläre disseminierte Gerinnung, 7 Fälle waren unter Therapie stabil, 4 Fälle zeigten ein teilweises Ansprechen sowie ein Fall erreichte ein vollständiges Ansprechen sogar 15 Monate nach Beendigung der Studienmedikation. In der Phase-II-Studie *Keynote-086* wurde der Einsatz von Pembrolizumab als Monotherapie beim metastasierten tripel-negativen Mammakarzinom untersucht (Adams et al., 2019a, 2019b). Es wurden 170 Patienten mit metastasiertem tripel-negativem Mammakarzinom in höheren Therapielinien, also mit mindestens einer palliativen Vortherapie und 84 Patienten mit PD-L1-positivem metastasiertem tripel-negativem Mammakarzinom in der Erstlinientherapie, also ohne palliative Vortherapie in 2 Kohorten untersucht. Die Autoren beziehen sich auf die *Keynote*-Vorstudie um die alleinige Erfassung der PD-L1-Positivität zu begründen, jedoch wurde der PD-L1-Status hier anders definiert und zwar $\geq 1\%$ im sogenannten kombinierten positiven Score, das heißt der Anteil der PD-L1-positiven Tumorzellen, Lymphozyten und Makrophagen pro Gesamttumorzellen in Prozent. Es ergab

sich für die erste Kohorte eine objektive Ansprechrates von 5,3 % und für den PD-L1-positiven Teil (62 %) innerhalb dieser Kohorte lag sie mit 5,7 % minimal höher. Für die zweite Kohorte ergab sich eine objektive Ansprechrates von 21 % mit 4 Fällen kompletten Ansprechens, 14 Fällen teilweisen Ansprechens und 13 Patienten mit stabiler Erkrankung. Trotzdem ließ sich für PD-L1-negative Tumoren ebenfalls ein Ansprechen auf Anti-PD-1-Monotherapie nachweisen und für beide Kohorten ergab sich ein medianes progressionsfreies Überleben von jeweils 2 Monaten. Trotzdem versuchen die Autoren aufgrund dieser Daten den PD-L1-Status beim metastasierten tripel-negativen Mammakarzinom als prädiktiven Marker für die Therapie mit Pembrolizumab zu etablieren. Dies muss jedoch zunächst vorsichtig bewertet werden, da die PD-L1-Positivität in allen genannten *Keynote*-Studien unterschiedlich erfasst wird, also zur Validierung der prädiktiven Wertigkeit des Parameters zusätzliche größere Untersuchungen notwendig sind. Weiterhin basiert die Wahl der PD-L1-Positivität als Parameter der Stratifizierung auf einer Phase-I-Studie des PD-1-Inhibitors Nivolumab, bei der keine Mammakarzinome eingeschlossen waren (Topalian et al., 2012). Hier wurde die PD-L1-Positivität wiederum bei 5 % positiver Tumorzellen festgesetzt. Es konnte ein signifikant besseres Ansprechen bei PD-L1-positiven Tumoren nachgewiesen werden, wobei dies in Zahlen für 9 von 25 Patienten (36 %) zutreffend war. Es wurden hier keine Informationen zu Untersuchungen anderer möglicher Biomarker publiziert und die Autoren verweisen selbst auf notwendige weitere Untersuchungen, um die PD-L1-Expression als prädiktiven Faktor einer Anti-PD-1-Therapie zu verifizieren. Die derzeitige Datenlage lässt also aktuell keine Prädiktion des Therapieansprechens einer Subgruppe von PD-L1-positiven tripel-negativen Mammakarzinomen zu, die von einer monoklonalen PD-1-Inhibition profitieren. Zur vollständigen Evaluation sollte zunächst die Bewertung der PD-L1-Expression standardisiert, sowie die Bedeutung der Expression auf Tumor- und Immunzellen differenziert werden. Es werden zudem weitere Untersuchungen benötigt um ein Patientenkollektiv zu identifizieren, das von einer PD-1-Blockade sicher profitiert.

4.2 PD-L1-Expression und therapeutische Überlegungen

4.2.1 PD-L1-Expression beim tripel-negativen Mammakarzinom

In Bezug auf die Expression von PD-L1 als Ligand des PD-1-Rezeptors zeigten sich in unserem Kollektiv 8 % der primären tripel-negativen Mammakarzinome positiv für PD-L1. Im Vergleich zu anderen publizierten Ergebnissen der PD-L1-Expression beim tripel-negativen Mammakarzinom ist eine Bandbreite von Auswertungsscores und Cut-offs zu verzeichnen, sowie der Einsatz von Antikörpern verschiedener Hersteller. Beckers et al. fanden in ihrem zuvor genannten Kollektiv von 161 tripel-negativen Mammakarzinomen eine Positivität von 64 % auf Tumorzellen, sowie in 93 % der Stromalen Immunzellen (Beckers et al., 2016). Hier wurde der gleiche Antikörper wie in unserer Studie verwendet, allerdings liegt der Cut-off bei $\geq 1\%$ und so deutlich unter unserem von $\geq 10\%$, wodurch sich möglicherweise die unterschiedlichen Prävalenzen bereits erklären lassen. Muenst et al. untersuchten in einer anderen Publikation ebenfalls die PD-L1-Expression an ihrem bereits beschriebenen Kollektiv von 660 Mammakarzinomen und fanden für den als tripel-negativ definierten Subtyp des Basal-like Mammakarzinoms ($n = 127$) eine Positivität von 30,7 % (Muenst et al., 2014). Zur Evaluation wurde hier der H-Score verwendet (Skala: 0-300) mit einem Cut-off ≥ 100 für Positivität. Bei Mittendorf et al. werden in ihrem Kollektiv von 105 tripel-negativen Mammakarzinomen 19 % als PD-L1-positiv bewertet bei einem Cut-off von $> 5\%$ membranärer Färbung der Tumorzellen (Mittendorf et al., 2014). Der gleiche Cut-off von $\geq 10\%$ positiver Tumorzellen wie in unserer Studie bei Verwendung eines anderen Antikörpers wurde von Brockhoff et al. genutzt (Brockhoff et al., 2018). Sie fanden für ihr gemischt adjuvant/neoadjuvant behandeltes Kollektiv von 103 tripel-negativen Mammakarzinomen 19 % der Fälle positiv für PD-L1. Im Kollektiv von 269 tripel-negativen Mammakarzinomen wurde ein Antikörper desselben Herstellers verwendet, in der Auswertung galt eine membranäre Färbung $\geq 1\%$ der Tumorzellen als positiv und lag in 27 % der Fälle vor (Yeong et al., 2019). Es zeigt sich also eine Bandbreite der PD-L1-Positivität von 8 – 64 % der Tumorzellen beim tripel-negativen Mammakarzinom. Es ist vorstellbar, dass die ermittelten Expressionswerte bei gleicher Methodik, Auswertung und Cut-off eine geringere Bandbreite aufweisen. Wie bereits erwähnt wurden zur Bewertung des PD-L1-Status im Rahmen der *Keynote*-Studien ebenfalls unterschiedliche Scores genutzt, sowie Antikörper unterschiedlicher Hersteller in den Phase-I-Studien im Gegensatz

zu den Phase-II-Studien. Weiterhin wurde in der Phase-II-Studie neben der immunhistochemischen Expression von PD-L1 auf Tumorzellen auch die Expression auf Lymphozyten und Makrophagen evaluiert und in einem Score zusammengefasst (Adams et al., 2019a). Die produzierende Firma des hier verwendeten Antikörpers hat ein Manual zur Durchführung und Interpretation der Färbung veröffentlicht, in dem die Bewertung der PD-L1-Expression ausschließlich auf Tumorzellen erläutert wird (Agilent Technologies Inc., 2018). Die Zulassung des Antikörpers erfolgte indes für die Evaluation des PD-L1-Status beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom vor Pembrolizumab-Therapie.

Vergleichbar wenig eindeutig ist die Datenlage der Korrelationen von PD-L1-Expression und Überlebensdaten beim tripel-negativen Mammakarzinom. In den durch uns vorgelegten Daten lassen sich keine signifikanten Zusammenhänge des PD-L1-Status in den Überlebenszeitanalysen darstellen. Ebenso ließen sich aus den Daten der tumoralen PD-L1-Expression von Beckers et al. keine signifikanten Einflüsse auf die Überlebensdaten ableiten (Beckers et al., 2016). In dieser strukturierten Analyse der PD-L1-Expression erfolgte die Auswertung jedoch nach zwei Grenzwerten sowie in mehreren Kompartimenten in dem Versuch der Ungewissheit der korrekten Auswertung gerecht zu werden. So konnte hier ein signifikanter Vorteil des Gesamtüberlebens bei positiver stromaler PD-L1-Expression von $\geq 1\%$ nachgewiesen werden sowie bei positiver zytoplasmatischer PD-L1-Expression von $\geq 1\%$ der Tumorzellen. Muenst et al. wiesen hingegen ein schlechteres Gesamtüberleben bei positiver tumoraler PD-L1-Expression in univariater Analyse nach (Muenst et al., 2014). Brockhoff et al. konnten keine signifikanten Zusammenhänge der Überlebensdaten bei PD-L1-Expression nachweisen, auch Ren et al. konnten in ihrem Kollektiv von 195 Fällen tripel-negativer Mammakarzinome keine signifikanten Einflüsse auf Überlebensdaten nachweisen, wobei hier ein vergleichsweise hoher Cut-off von $\geq 25\%$ positiver Tumorzellen verwendet wurde (Brockhoff et al., 2018; Ren et al., 2018). Bei der semi-quantitativen Auswertung von Barrett et al. konnte für den Anteil von 39 tripel-negativen Mammakarzinomen des ebenfalls gemischt adjuvant/neoadjuvant behandelten Kollektivs ab einem Nachweis von vereinzelt PD-L1-positiven Zellen eine signifikante Verbesserung des erkrankungsfreien und Gesamtüberlebens nachgewiesen werden (Barrett et al., 2018). Auch konnten Yeong et al. für die PD-L1-positiven tripel-negativen Mammakarzinome in ihrem Kollektiv eine signifikante Verbesserung des

erkrankungsfreien, jedoch nicht des Gesamtüberlebens nachweisen (Yeong et al., 2019). Insgesamt lässt sich daher ein prognostischer Wert der PD-L1-Expression beim tripel-negativen Mammakarzinom zum aktuellen Zeitpunkt nicht zweifelsfrei belegen, dies gilt weder für Expression des Tumors noch der Immunzellen. Auch hier muss die Vielzahl der verwendeten Auswertungsscores, deren unterschiedliche Bewertung sowie Unterschiede in der Verarbeitung als eine der Ursachen der unklaren Datenlage gesehen werden, bevor die PD-L1-Expression als möglicher valider Biomarker etabliert werden kann. Weiterhin konnten in epigenetischen Untersuchungen Fraktionen von dysfunktionalen T-Zellen differenziert werden, die sich nicht durch Blockade des PD-Signalweges reaktivieren ließen, also irreversibel ermüdet waren (Pauken et al., 2016; Philip et al., 2017). Dies kann darauf hindeuten, dass andere Komponenten der PD-Signalkaskade relevant bei der Suche nach potenziellen Biomarkern sind.

4.2.2 PD-L1-Inhibition und Dynamik der Immunogenität des Tumors

Nichtsdestotrotz wurden kürzlich mehrere klinische Phase-I-III-Studien zur PD-L1-Inhibition mittels monoklonalem Antikörper initiiert, die sich ebenfalls auf die PD-L1-Expression zur Unterscheidung von Subgruppen stützen. In einer Phase-I-Studie mit 116 Patientinnen mit metastasiertem tripel-negativem Mammakarzinom wurde der Einsatz des PD-L1-Inhibitors Atezolizumab als Monotherapie untersucht (Emens et al., 2019). Hier zeigte sich eine bessere objektive Ansprechrates bei Anwendung von Atezolizumab in der Erstlinientherapie im Gegensatz zum Einsatz in höheren Therapielinien (24 % vs. 6 %). Es wurden zudem TILs sowie PD-L1-positive Tumor- und Immunzellen als Biomarker untersucht, wobei eine PD-L1-Positivität bei ≥ 1 % der jeweiligen Zellfraktion pro Tumorfläche festgesetzt wurde. Es war eine numerisch verbesserte objektive Ansprechrates von 12 % im Gegensatz zu 0 % bei Nachweis von PD-L1-positiven Immunzellen zu verzeichnen. Interessanterweise zeigte sich bei 92 % der PD-L1-positiven Tumoren ebenfalls ein positiver PD-L1-Status der Immunzellen. In 9 untersuchten Tumorproben nach Atezolizumab-Exposition ließ sich eine signifikante Zunahme der PD-L1-Expression auf Immunzellen nachweisen, wobei diese Beobachtung bei eingeschränkter Fallzahl vorsichtig bewertet werden muss. Die Zunahme an PD-L1-Expression war hier unabhängig vom Tumoransprechen, welches von stabilem bis progredientem Befund reichte. Basierend auf diesen Ergebnissen haben auch die Autoren der sogenannten *IMpassion-130*-Studie den PD-L1-Status der Immunzellen im Rahmen

ihrer Phase-III-Studie erhoben, hier galt der Tumor als positiv ab 1 % PD-L1-positiver Tumor-infiltrierender Immunzellen pro Tumorfläche (Schmid et al., 2018). In dieser randomisiert-kontrollierten Phase-III-Studie wurde der Einsatz von Atezolizumab oder Placebo bei Therapie mit nab-Paclitaxel in der Erstlinientherapie bei insgesamt 902 Patienten mit metastasiertem tripel-negativem Mammakarzinom untersucht. In der Intention-To-Treat-Analyse mit medianer Nachbeobachtung von 12,9 Monaten ließ sich ein signifikanter Vorteil des progressionsfreien Überlebens im Median von 1,7 Monaten (7,2 vs. 5,5 Monate) nachweisen. In der PD-L1-positiven Subgruppe fand sich der Unterschied etwas deutlicher mit 2,5 Monaten (7,5 vs. 5,0 Monate). Bemerkenswert war der Vorteil des Gesamtüberlebens in der PD-L1-positiven Subgruppe mit 9,5 Monaten (25,0 vs. 15,5 Monate); welcher ebenfalls signifikant war. Diese doch eindrücklichen Daten haben zunächst in den USA und inzwischen auch in Europa zur Zulassung von Atezolizumab in Kombination mit nab-Paclitaxel als Erstlinientherapie des Immunzell-PD-L1-positiven metastasierten tripel-negativen Mammakarzinoms geführt. Obwohl dieser Überlebensvorteil bei Stratifizierung nach PD-L1-Status der Immunzellen signifikant ausfällt, konnte bislang nicht zufriedenstellend geklärt werden, wieso dies einen besseren Biomarker zur PD-L1-Inhibition darstellt als beispielsweise die PD-L1-Expression der Tumorzellen, die belegt, dass der PD-Signalweg durch den Tumor selbst genutzt wird oder auch die PD-1-Expression der Immunzellen, die die effektive Endstrecke des Signalwegs darstellt. Jedoch bedeutet der sehr niedrige Cut-off-Wert von 1 % vor allem, dass eine minimale Reaktion der Immunzellen mit dem untersuchten Antikörper ausreichend ist, um eine Therapie durchzuführen. Zumindest scheint die PD-L1-Positivität der Immunzellen anzuzeigen, dass der PD-Signalweg prinzipiell im Tumormikromilieu vorhanden ist. Es ist auch vorstellbar, dass der gewählte Antikörper mit einer PD-L1-ähnlichen Zielstruktur reagiert, die möglicherweise mit dem PD-Signalweg in Zusammenhang steht. Leider wurden keine Daten zu weiteren potenziellen Biomarkern in dieser Studie veröffentlicht, deren Untersuchung möglicherweise ebenfalls stattgefunden hat, anscheinend jedoch keine signifikanten Ergebnisse erbracht hatte. Zumindest ist die minimale Reaktion des Antikörpers mit 1 % der Tumor-infiltrierender Immunzellen pro Tumorfläche bislang der erste Hinweis auf einen Biomarker zur PD-L1-Therapie des metastasierten tripel-negativen Mammakarzinoms.

Es ist aktuell weiterhin unklar, ob die Blockade von PD-L1 bessere Ergebnisse erzielt als von PD-1, dem direkten Vermittler der Immuninhibition. Hierzu findet sich eine Phase-III-Studie zum Einsatz von Pembrolizumab mit vergleichbarem Setting zur *IMpassion-130*-Studie. Die Rekrutierung der Studie wurde inzwischen abgeschlossen, es sind jedoch bislang keine Ergebnisse von Überlebensdaten veröffentlicht worden. Diese sogenannte *Keynote-355*-Studie untersucht doppel-blind und randomisiert an 882 Patienten mit metastasiertem tripel-negativem Mammakarzinom einerseits in Erstlinientherapie und andererseits in höheren Therapielinien Pembrolizumab vs. Placebo zur Chemotherapie mit nab-Paclitaxel, Paclitaxel oder Gemcitabin/Carboplatin. Weiterhin wird in neoadjuvanter Situation im Rahmen der *Keynote-522*-Studie doppel-blind randomisiert unter Einschluss von 1174 Patienten mit tripel-negativem Mammakarzinom der Einsatz von Pembrolizumab vs. Placebo zusätzlich zur neoadjuvanten Standard-Chemotherapie sowie postoperativ als Erhaltungstherapie über 9 Zyklen untersucht. Auch hier sind Ergebnisse zum aktuellen Zeitpunkt ausstehend. Die Studien-Protokolle sehen, wie bereits in den Vorstudien, erneut die Stratifizierung nach PD-L1 als sekundären Endpunkt vor. Die Phase-III-Studie *Keynote-119*, die den Einsatz von Pembrolizumab als Monotherapie in höherer Therapielinie gegen eine Chemotherapie der Wahl der behandelnden Ärzte (Capecitabin, Eribulin, Gemcitabin oder Vinorelbin) bei 622 Patienten mit metastasiertem tripel-negativem Mammakarzinom untersucht hat, wurde gemäß Presseerklärung vom Sponsor MSD vom 20. Mai 2019 frühzeitig abgebrochen, da der primäre Endpunkt im Gesamtüberleben im Pembrolizumab-Arm nicht erreicht wurde (MSD Merck & Co. Inc, 2019). Bemerkenswert hier ist die Prüfung einer neuartigen Immuntherapie als Monotherapie gegen das etablierte Konzept der Chemotherapie, die den aktuellen Standard in der Therapie des metastasierten tripel-negativen Mammakarzinoms darstellt. Bereits im Mausmodell ließ sich für Immuncheckpoint-Inhibitoren unter Hinzunahme einer sequentiellen Chemotherapie ein signifikant besseres Überleben nachweisen (Parra et al., 2017). Auch die Kombination von Immuncheckpoint-Inhibition mit lokaler Bestrahlung führte im Mausmodell an primär wenig immunologischen Mammakarzinomen zu einem verbesserten Tumoransprechen und guten Überlebensraten (Demaria et al., 2005). Der Untergang von Tumorzellen führt zu einer vermehrten Freisetzung von Antigenen aus dem Tumor, den sogenannten Neoantigenen, die anschließend zur Ausbildung von tumorspezifischen T-Zellen führen können (Tesniere et al., 2008). Mittels

Immuncheckpoint-Inhibition kann dann eine Inhibierung der T-Zellvermittelten Immunantwort verhindert werden. In einer RNA-Sequenz-Analyse von Daten des Krebs Genom Atlas (TCGA, *The Cancer Genome Atlas*) konnte bei Nachweis von Mutationen, die zu einer Zunahme von präsentierten Epitopen führen, ein verbessertes Überleben nachgewiesen werden, sowie ebenfalls ein erhöhter Anteil von zytotoxischen T-Zellen innerhalb des Tumors (Brown et al., 2014). Bei geringer zytotoxischer T-Zell-Infiltration waren auch weniger mutierte Epitope nachweisbar. So lassen sich immunologisch „kalte“ und „heiße“ Tumoren unterscheiden (Binnewies et al., 2018). Eine ausgeprägte T-Zell-Infiltration sowie Expression von PD-1 und PD-L1 sind charakteristisch für immunologisch „heiße“ Tumore, die durch signifikant höhere Ansprechraten auf Immuncheckpoint-Inhibitoren gekennzeichnet sind. Die „kalten“ Tumoren weisen eine geringe T-Zell-Infiltration im Inneren des Tumors auf, während Tumor-assoziierte Makrophagen an der Tumorgrenzfläche die ebenfalls nur an der Grenzfläche lokalisierten TILs mutmaßlich inaktivieren. Dieses Konzept wird in den Ergebnissen unserer Daten bestätigt, in denen die mittlere PD-L1-Expression bei negativem TIL-Status signifikant niedriger im Gegensatz zu TIL-positiven Fällen ausfällt. Muenst et al. wiesen ebenfalls eine Korrelation zwischen PD-L1-Expression und Vorliegen von PD-1 positiven TILs nach (Muenst et al., 2014). Auch lässt sich auf mRNA-Ebene eine positive Korrelation von PD-L1 mit TILs nachweisen, die ebenfalls mit einem verbesserten Überleben einhergeht (Denkert et al., 2015; Schalper et al., 2014). Die bereits angesprochene Dynamik des Tumormikromilieus unter Therapie scheint auch Veränderungen der Immunogenität zu ermöglichen. Für eine Phase-I-Studie des PD-L1-Inhibitors Atezolizumab in Monotherapie wurden serielle Biopsien bei Patienten mit verschiedenen fortgeschritten oder metastasierten Tumorentitäten unter laufender Therapie durchgeführt, wobei 3 Mammakarzinom-Fälle ohne weitere Angabe zum Subtyp eingeschlossen waren (Herbst et al., 2014). Bei Tumorregress konnte eine signifikante Zunahme der PD-L1-Expression der Immunzellen, sowie ein dichtes Immuninfiltrat nachgewiesen werden, wohingegen bei einem Progress ein vermindertes Immuninfiltrat und keine Hochregulierung von PD-L1 nachweisbar war. Die genannten Daten geben erste Vorstellungen einer erfolgreichen, therapeutischen Anwendung einer Inhibition des PD-Signalweges, jedoch zeigen sie vor allem wie dringend notwendig weitere Untersuchungen zu Zusammenhängen und Wirkweisen der Signalwege des Immunsystems im Rahmen der Tumorabwehr sind.

4.3 TILs und TLS beim tripel-negativen Mammakarzinom

Als Zeichen der Immunreaktion lässt sich ein Entzündungsinfiltrat an der Tumorgrenzfläche von Mammakarzinomen nachweisen, in dem Lymphozyten als Teil der körpereigenen Tumorabwehr zu finden sind (Aaltomaa et al., 1992; Naukkarinen und Syrjänen, 1990). Diese sogenannten Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten (TILs) haben eine prognostische Bedeutung bei tripel-negativen Mammakarzinomen (Liu et al., 2012; Loi et al., 2019; Mahmoud et al., 2011).

In unserem Kollektiv wurden in 82 % der primären tripel-negativen Mammakarzinome TILs nachgewiesen. Beckers et al. wiesen an 161 mittels TMA untersuchten Fällen von tripel-negativen Mammakarzinomen eine TIL-Positivität in insgesamt 70 % der Fälle nach (Beckers et al., 2016). Adams et al. beschreiben nach Auswertung von Tumorschnitten von 481 tripel-negativen Mammakarzinomen aus 2 großen klinischen Studien in 80 % TILs im peritumoralen Stroma (Adams et al., 2014). Eine internationale Arbeitsgruppe hat 2014 Empfehlungen zur Standardisierung der TIL-Auswertung bei Brustkrebs erarbeitet, die die prozentuale Erhebung der Stromalen TILs als reproduzierbaren Parameter mit prognostischer und prädiktiver Aussagekraft empfiehlt (Salgado et al., 2015). Dies bezieht sich allerdings auf Auswertung von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten ganzen Tumorschnitten. Eine Evaluation von TILs mittels TMA wird nicht grundsätzlich empfohlen, da keine großangelegten methodischen Untersuchungen vorliegen, insbesondere in Bezug auf eine mögliche Heterogenität der Infiltration. So wurde in unserer Studie der Fokus auf eine qualitative Erhebung der TILs gelegt. Zuletzt haben Althobiti et al. eine ausführliche Analyse zur Heterogenität des lymphozytären Infiltrats beim Mammakarzinom vorgelegt (Althobiti et al., 2018). Es wurde in 52 Fällen die TIL-Auswertung von jeweils 4 Schnitten von verschiedenen Blöcken des Primärtumors verglichen, weiterhin wurde jeder Schnitt in 4 Quadranten unabhängig voneinander ausgewertet. Die Auswertung der Quadranten ergab signifikant unterschiedliche Ergebnisse, während sich bei Auswertung der TILs anhand ganzer Schnitte von verschiedenen Blöcken kein signifikanter Unterschied nachweisen ließ. Weiterhin wurden die Schnitte von 1165 Mammakarzinomen mit einem tripel-negativen Anteil von 213 Fällen auf verschiedene Fraktionen von Lymphozyten untersucht: CD 3 als pan-T-Zellmarker, CD 8-positive zytotoxische T-Zellen, FOXP3-positive Tregs, CD 20-positive B-Zellen und CD 68-positive Histiozyten. Bei den tripel-negativen

Mammakarzinomen zeigte sich ein insgesamt höherer Anteil von Immunzellen im Stroma, welcher bei Nachweis von CD 3+, CD 8+ und CD 20+ Zellen mit einem signifikanten Vorteil des Brustkrebs-spezifischen Überlebens einherging. Bei quantitativer Auswertung der stromalen TILs von insgesamt 154 tripel-negativen Mammakarzinomen zeigte sich ein signifikanter Vorteil des Brustkrebs-spezifischen Überlebens. In der multivariaten Analyse unter Einbezug von Alter, Grading und N-Status konnte der TIL-Status als unabhängiger Prognosefaktor nachgewiesen werden. Dies deckt sich in hohem Maße mit unseren Ergebnissen. Wir konnten ebenfalls einen signifikanten und unabhängigen Überlebensvorteil bei positivem TIL-Status nachweisen, mit ebenfalls signifikantem Einfluss von T- und N- Status sowie Alter bei Diagnose. Vergleichbare Ergebnisse präsentieren Adams et al. in der bereits genannten gepoolten Analyse mit 481 tripel-negativen Mammakarzinomen. Die multivariate Analyse unter Einschluss von T- und N-Status, sowie Alter (das Grading war nicht vollständig erfasst) zeigte einen signifikanten Vorteil des Gesamtüberlebens je 10 % Zunahme von TILs im Stroma (Adams et al., 2014). In einer Analyse von Denkert et al. wurden die Daten von 6 großen Studien gepoolt und nach TILs ausgewertet. An insgesamt 632 Fällen tripel-negativen Mammakarzinomen ließ sich ebenfalls ein Vorteil des Gesamtüberlebens bei Zunahme der TILs bestätigen, hier unter Einschluss von Alter, T- und N-Status, histologischem Subtyp, Grading und initialer Studie (Denkert et al., 2018).

Interessanterweise waren in unserem Kollektiv in 11 % der Fälle tertiäre lymphoide Strukturen (TLS) an der tumoralen Grenzfläche nachweisbar (n = 8). Morphologisch sind hier lichtmikroskopisch formierte Lymphfollikel im Randbereich des Tumors erkennbar. Auch Adams et al. haben in ihrer Untersuchung von 481 tripel-negativen Mammakarzinomen in 1 % der Tumorschnitte TLS erfasst (Adams et al., 2014). Das Vorkommen von TLS wird als räumlich heterogen im peritumoralen Stroma beschrieben, es liegen allerdings aktuell keine Empfehlungen zur Auswertung und Bewertung von TLS vor (Salgado et al., 2015). Die Stenzen in unserer Untersuchung wurden gezielt an der Grenzfläche des Tumors entnommen, wohingegen die Auswahl der Schnitte von Adams et al. möglicherweise auf Tumorgewebe fokussiert gewesen ist, sodass im Zweifelsfall kein peritumorales Gewebe erfasst wurde. Prognostisch konnten TLS als positiver Faktor beim Bronchial- und Kolorektalkarzinom nachgewiesen werden (Coppola et al., 2011; Dieu-

Nosjean et al., 2008). Interessanterweise wurde in unserem Kollektiv in 7 von 8 Fällen mit TLS innerhalb des nachbeobachteten Zeitraumes kein Rezidiv, Fernmetastasierung oder Todesfall registriert. Weiterhin wurden in ebendiesen 7 Fällen auch PD-1-positive Lymphozyten innerhalb der TLS nachgewiesen. Dies passt zu den Daten der umfassenden Arbeit von Gu-Trantien et al., die nachwiesen, dass PD-1-positive folliculäre T-Helferzellen innerhalb der TLS beim Mammakarzinom nicht in direktem Kontakt zu PD-L1-positiven Tumorzellen treten und daher in ihrer Funktion nicht über die PD-Achse supprimiert werden (Gu-Trantien et al., 2013). Während die Tumor-vermittelte Aktivierung über PD-L1 zu T-Zellsuppression führt und die PD-1-Expression als Zeichen der chronischen Aktivierung und T-Zellermüdung nachgewiesen wurde, werden in dieser privilegierten Nische durch PD-1-Aktivierung andere Funktionen vermittelt. Zum Beispiel konnten Inozume et al. bei PD-1-positiven CD-8+TILs in vitro eine erhöhte Produktion von tumorspezifischem IFN- γ nachweisen, welches einen wichtigen Teil der endogenen Tumorabwehr darstellt (Ikeda et al., 2002; Inozume et al., 2010; Shankaran et al., 2001). Gu-Trantien et al. haben weiterhin Zusammenhänge der TLS mit dem lymphoiden Chemokin CXCL13 untersucht, welches bei Bildung und Erhaltung von sekundären lymphoiden Strukturen eine wichtige Rolle im Rahmen der lymphoiden Neogenese einnimmt (Link et al., 2011; Müller et al., 2003). Erhöhte CXCL13-Werte innerhalb der TLS beim Mammakarzinom korrelierten in den Untersuchungen von Gu-Trantien et al. mit dem Ausmaß der Tumordinfiltration, zusätzlich konnten sie die CXCL13-Expression der folliculären T-Helferzellen als Zeichen von organisierten TLS mit aktiven Keimzentren sowie eine Assoziation mit verbessertem Überleben nachweisen (Gu-Trantien et al., 2013). Hier eröffnen sich interessante therapeutische Angriffsmöglichkeiten, die sicherlich noch außerhalb der konkreten Anwendung liegen. Hier wäre jedoch das Ziel mittels gezielter Aktivierung eine systemische Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren umgehen zu können und damit generalisierte immunvermittelte Nebenwirkungen zu vermeiden. Es wäre weiterführend spannend zu untersuchen, ob sich eine Induktion von TLS erzielen lässt und hierdurch ein therapeutischer Effekt erreichbar ist. Weiterhin stellt sich die Frage ob durch Applikation von PD-L1 innerhalb der TLS die endogene Tumorabwehr gefördert werden kann und ob eine in vivo Differenzierung von PD-1-positiven TLS ermöglicht werden kann.

4.4 Limitationen der Studie

Als Limitation der hier vorgelegten Studie muss die statistisch eingeschränkte Aussagekraft aufgrund der Größe des Kollektivs genannt werden. Es erfolgte eine genaue Untersuchung der pathologischen und klinischen Parameter der initial 192 identifizierten Fälle, sodass abschließend 74 Fällen eines genau definierten Kollektivs zur explorativen Analyse der immunhistochemischen Expression von Immuncheckpoint-Markern vorlagen. Studien, in denen FFPE-Proben von mehr als 75 Fällen primärer tripel-negativer Mammakarzinome systematisch untersucht wurden finden sich insgesamt wenig, diejenigen werden hier aufgeführt. Eine wahrscheinliche Ursache für die begrenzte Fallzahl unserer Studie scheint die Etablierung des neoadjuvanten Therapiekonzepts zu sein, dessen Anwendung seit 2009 durch die AGO empfohlen wird und sich schnell zur Standardtherapie entwickelt hat. Postneoadjuvante Operationspräparate wurden in unserer Studie bewusst ausgeschlossen, um Therapie-natives Tumorgewebe auf die Expression von Immuncheckpoint-Markern zu untersuchen. Dies könnte ebenfalls der Grund dafür sein, dass im vorliegenden Kollektiv ein deutlich höheres medianes Alter (67 Jahre) im Gegensatz zur Literatur (53 Jahre) vorliegt und sich ferner das schlechtere Überleben jüngerer Patientinnen mit tripel-negativem Mammakarzinom nicht in den vorliegenden Daten reproduzieren lässt (Dent et al., 2007). Als weitere Einschränkung muss die einleitend genannte Verschärfung der Bewertung des ER-Status genannt werden. Die von 10 auf 1 % herabgesetzte Grenze der ER-Expression für einen negativen ER-Status könnte zu einer geringgradigen Inhomogenität der Ergebnisse geführt haben, ebenfalls wie die aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie nicht vordefinierten Therapieschemata. Jedoch ist zu bedenken, dass das tripel-negative Mammakarzinom prinzipiell ein inhomogenes Kollektiv bildet, da alle Patienten deren Tumor nicht aufgrund von Rezeptor-Expression in eine andere Subgruppe fällt, in der Gruppe der tripel-negativen Karzinome zusammengefasst werden. Es handelt sich also gewissermaßen um eine Ausschlussdiagnose, ein tripel-negatives Kollektiv umfasst alle Mammakarzinom-Fälle die zu diesem Zeitpunkt nicht besser definiert werden können und ist immer zu einem gewissen Grade inhomogen. Gleichwohl konnte hier ein signifikanter prognostischer Effekt der PD-1-Expression beim tripel-negativen Mammakarzinom nachgewiesen werden.

4.5 Fazit

Diese retrospektive translationelle Kohortenstudie dient aufgrund ihres explorativen Charakters der Hypothesengenerierung bezüglich eines möglichen prognostischen Werts der immunhistochemischen PD-1- und PD-L1-Expression beim primären tripel-negativen Mammakarzinom. Zum Zeitpunkt der Planung der Studie lagen keine publizierten Untersuchungen zu dieser Fragestellung an einem so klar umschriebenen Kollektiv von unbehandelten tripel-negativen Mammakarzinomen vor. Der hier nachgewiesene signifikante prognostische Wert der PD-1-Expression stellt einen Erkenntnisgewinn der Tumor-Immunsystem-Interaktion beim tripel-negativen Mammakarzinom dar, der in weiteren großangelegten Studien validiert werden sollte. Die Evaluation sowohl der PD-L1- als auch der PD-1-Expression als mögliche Biomarker ist hier von besonderer Bedeutung. Weiterhin weisen die hier erstmals systematisch erfassten TLS im peritumoralen Stroma der tripel-negativen Mammakarzinome auf weitere Mechanismen der Tumorabwehr hin. Diese sollten zunächst weiter systematisch charakterisiert werden, ermöglichen jedoch weitere Angriffspunkte für potenzielle therapeutische Ansätze in der Zukunft.

5 Zusammenfassung

Das sogenannte triple-negative Mammakarzinom (TNBC) ist definiert durch die fehlende Expression bzw. Amplifikation des Östrogen-, Progesteron- und Her2-Rezeptors. Es zeigt ein aggressives biologisches Verhalten und ist im Vergleich zu anderen Mammakarzinom-Subtypen durch eine ungünstige Prognose gekennzeichnet, da aktuell keine spezifische Systemtherapie zur Verfügung steht. Als günstiger Prognosefaktor konnten Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) nachgewiesen werden und Immuncheckpoint Marker wie PD-1/PD-L1 geben Hinweise auf therapeutische Einsatzmöglichkeiten.

Ziel der vorgelegten Studie war die Korrelation der immunhistochemischen Expression von PD-1, PD-L1 sowie TILs mit klinisch relevanten Endpunkten. Hierfür wurden Gewebstanzen von 74 Fällen primären adjuvant behandelten TNBC mittels sogenannter Tissue Mikro Arrays analysiert und anschließend auf eine Korrelation mit klinischen-pathologischen Parametern untersucht. Es konnte eine signifikante inverse Korrelation der PD-1-Expression mit dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden ($p = 0,045$). Weiterhin zeigte die Anwesenheit von TILs in der multivariaten Cox-Regression einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben ($HR\ 0,19; p = 0,031$). In diesem Zusammenhang wurden in 11 % der Fälle formierte tertiäre lymphoide Strukturen (TLS) nachgewiesen, wovon in über 80 % kein Progress verzeichnet wurde.

Trotz signifikanter Korrelation mit dem Gesamtüberleben und laufenden klinischen Studien zur PD-1-Inhibition kann hier bislang kein valider prädiktiver Faktor gefunden werden. Die Immunzell-PD-L1-Positivität ist prädiktiv für das Ansprechen auf eine PD-L1-Inhibition, was zur ersten Zulassung eines monoklonalen PD-L1-Antikörpers bei fortgeschrittenem Immunzell-PD-L1-positivem TNBC geführt hat. Es ist jedoch auch hier die Validität des Biomarkers nicht abschließend geklärt. In Zukunft könnte eine mögliche Induktion von TLS als lokale organisierte Immunantwort eine effiziente endogene Tumorabwehr ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

- Aaltomaa, S., Lipponen, P., Eskelinen, M., Kosma, V.M., Marin, S., Alhava, E., and Syrjänen, K. (1992). Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur. J. Cancer* 28A, 859–864.
- Adams, S., Gray, R.J., Demaria, S., Goldstein, L., Perez, E.A., Shulman, L.N., Martino, S., Wang, M., Jones, V.E., Saphner, T.J., et al. (2014). Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *Journal of Clinical Oncology* 32, 2959–2966.
- Adams, S., Schmid, P., Rugo, H.S., Winer, E.P., Loirat, D., Awada, A., Cescon, D.W., Iwata, H., Campone, M., Nanda, R., et al. (2019a). Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol* 30, 397–404.
- Adams, S., Loi, S., Toppmeyer, D., Cescon, D.W., De Laurentiis, M., Nanda, R., Winer, E.P., Mukai, H., Tamura, K., Armstrong, A., et al. (2019b). Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol* 30, 405–411.
- Adélaïde, J., Finetti, P., Bekhouche, I., Repellini, L., Geneix, J., Sircoulomb, F., Charafe-Jauffret, E., Cervera, N., Desplans, J., Parzy, D., et al. (2007). Integrated profiling of basal and luminal breast cancers. *Cancer Res.* 67, 11565–11575.
- Agilent Technologies Inc. (2018). PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual – NSCLC. FDA-approved for in vitro diagnostic use, https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29158_pd-l1-ihc-22c3-pharmdx-nsclc-interpretation-manual.pdf (abgerufen am 28.05.2019).
- Allemani, C., Sant, M., Berrino, F., Aareleid, T., Chaplain, G., Coebergh, J.W., Colonna, M., Contiero, P., Danzon, A., Federico, M., et al. (2004). Prognostic value of morphology and hormone receptor status in breast cancer – a population-based study. *Br J Cancer* 91, 1263–1268.
- Allred, D.C., Harvey, J.M., Berardo, M., and Clark, G.M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod. Pathol.* 11, 155–168.
- Althobiti, M., Aleskandarany, M.A., Joseph, C., Toss, M., Mongan, N., Diez-Rodriguez, M., Nolan, C.C., Ashankyty, I., Ellis, I.O., Green, A.R., et al. (2018). Heterogeneity of Tumour Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer and its prognostic significance. *Histopathology*.

- Amin, M.B. (Hrsg.), Edge, Stephen, S., Greene, Frederick, F., Byrd, D.R., Brookland, R.K., Washington, M.K., Gershewald, J.E., Compton, C.C., Hess, K.R., Sullivan, D.C., et al. (2017). *AJCC Cancer Staging Manual (8th Edition)*, Springer International Publishing).
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* *439*, 682–687.
- Barrett, M.T., Lenkiewicz, E., Malasi, S., Basu, A., Yearley, J.H., Annamalai, L., McCullough, A.E., Kosiorek, H.E., Narang, P., Wilson Sayres, M.A., et al. (2018). The association of genomic lesions and PD-1/PD-L1 expression in resected triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Res.* *20*, 71.
- Beckers, R.K., Selinger, C.I., Vilain, R., Madore, J., Wilmott, J.S., Harvey, K., Holliday, A., Cooper, C.L., Robbins, E., Gillett, D., et al. (2016). Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology* *69*, 25–34.
- Binnewies, M., Roberts, E.W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D.F., Merad, M., Coussens, L.M., Gabilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C.C., et al. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine* *24*, 541–550.
- Böger, C., Behrens, H.-M., Mathiak, M., Krüger, S., Kalthoff, H., Röcken, C., Böger, C., Behrens, H.-M., Mathiak, M., Krüger, S., et al. (2016). PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget* *7*, 24269–24283.
- Bonadonna, G., Valagussa, P., Brambilla, C., Ferrari, L., Moliterni, A., Terenziani, M., and Zambetti, M. (1998). Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute. *J. Clin. Oncol.* *16*, 93–100.
- Boussiotis, V.A. (2016). Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med* *375*, 1767–1778.
- Brockhoff, G., Seitz, S., Weber, F., Zeman, F., Klinkhammer-Schalke, M., Ortmann, O., and Wege, A.K. (2018). The presence of PD-1 positive tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancers is associated with a favorable outcome of disease. *Oncotarget* *9*, 6201–6212.
- Brown, S.D., Warren, R.L., Gibb, E.A., Martin, S.D., Spinelli, J.J., Nelson, B.H., and Holt, R.A. (2014). Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res* *24*, 743–750.
- Camp, R.L., Charette, L.A., and Rimm, D.L. (2000). Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab. Invest.* *80*, 1943–1949.
- Carey, L., Winer, E., Viale, G., Cameron, D., and Gianni, L. (2010). Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol* *7*, 683–692.

- Carey, L.A., Dees, E.C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D.T., Collichio, F., Ollila, D.W., Sartor, C.I., Graham, M.L., and Perou, C.M. (2007). The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clin Cancer Res* 13, 2329–2334.
- Carter, C.L., Allen, C., and Henson, D.E. (1989). Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63, 181–187.
- Cianfrocca, M., and Goldstein, L.J. (2004). Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *The Oncologist* 9, 606–616.
- Coppola, D., Nebozhyn, M., Khalil, F., Dai, H., Yeatman, T., Loboda, A., and Mulé, J.J. (2011). Unique Ectopic Lymph Node-Like Structures Present in Human Primary Colorectal Carcinoma Are Identified by Immune Gene Array Profiling. *Am J Pathol* 179, 37–45.
- Cortazar, P., Zhang, L., Untch, M., Mehta, K., Costantino, J.P., Wolmark, N., Bonnefoi, H., Cameron, D., Gianni, L., Valagussa, P., et al. (2014). Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 384, 164–172.
- Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.-F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., Speed, D., Lynch, A.G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486, 346.
- Darb-Esfahani, S., Kunze, C.A., Kulbe, H., Sehouli, J., Wienert, S., Lindner, J., Budczies, J., Bockmayr, M., Dietel, M., Denkert, C., et al. (2015). Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget* 7, 1486–1499.
- Demaria, S., Kawashima, N., Yang, A.M., Devitt, M.L., Babb, J.S., Allison, J.P., and Formenti, S.C. (2005). Immune-Mediated Inhibition of Metastases after Treatment with Local Radiation and CTLA-4 Blockade in a Mouse Model of Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 11, 728–734.
- Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B.M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., et al. (2010). Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *JCO* 28, 105–113.
- Denkert, C., Loibl, S., Müller, B.M., Eidtmann, H., Schmitt, W.D., Eiermann, W., Gerber, B., Tesch, H., Hilfrich, J., Huober, J., et al. (2013). Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann. Oncol.* 24, 2786–2793.
- Denkert, C., Minckwitz, G. von, Brase, J.C., Sinn, B.V., Gade, S., Kronenwett, R., Pfitzner, B.M., Salat, C., Loi, S., Schmitt, W.D., 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. *JCO* 33, 983–991.

- Denkert, C., von Minckwitz, G., Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B.I., Weber, K.E., Budczies, J., Huober, J., Klauschen, F., Furlanetto, J., et al. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* *19*, 40–50.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res* *13*, 4429–4434.
- Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L., et al. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol.* *26*, 4410–4417.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., et al. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* *8*, 793–800.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* *3*, 991–998.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* *378*, 771–784.
- Elston, C. w., and Ellis, I. o. (1991). pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* *19*, 403–410.
- Emens, L.A., Cruz, C., Eder, J.P., Braitheh, F., Chung, C., Tolaney, S.M., Kuter, I., Nanda, R., Cassier, P.A., Delord, J.-P., et al. (2019). Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA Oncol* *5*, 74–82.
- European Medicines Agency (2019a). Keytruda Product Information, https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information_en.pdf (abgerufen am 26.04.2019).
- European Medicines Agency (2019b). Opdivo Product Information, https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information_en.pdf (abgerufen am 26.04.2019).
- European Medicines Agency (2019c). Tecentriq Product, https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecentriq-epar-product-information_de.pdf (abgerufen am 02.12.2019).
- F.Hoffmann-La Roche Ltd (2019). Media Relase European Commission approves Roche's Tecentriq <https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2019-08-29.htm> (abgerufen am 02.12.2019).

- Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A., et al. (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat. Med.* *14*, 518–527.
- Fredholm, H., Eaker, S., Frisell, J., Holmberg, L., Fredriksson, I., and Lindman, H. (2009). Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS ONE* *4*, e7695.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* *192*, 1027–1034.
- Frkovic-Grazio, S., and Bracko, M. (2002). Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* *55*, 88–92.
- Ghebeh, H., Mohammed, S., Al-Omair, A., Qattan, A., Lehe, C., Al-Qudaihi, G., Elkum, N., Alshabanah, M., Amer, S.B., Tulbah, A., et al. (2006). The B7-H1 (PD-L1) T Lymphocyte-Inhibitory Molecule Is Expressed in Breast Cancer Patients with Infiltrating Ductal Carcinoma: Correlation with Important High-Risk Prognostic Factors. *Neoplasia* *8*, 190–198.
- Ghebeh, H., Barhoush, E., Tulbah, A., Elkum, N., Al-Tweigeri, T., and Dermime, S. (2008). FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy. *BMC Cancer* *8*, 57.
- Gibson, G.R., Qian, D., Ku, J.K., and Lai, L.L. (2005). Metaplastic breast cancer: clinical features and outcomes. *Am Surg* *71*, 725–730.
- Gillett, C.E., Springall, R.J., Barnes, D.M., and Hanby, A.M. (2000). Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study. *J. Pathol.* *192*, 549–553.
- Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., and Harbeck, N. (2009). Triple-negative breast cancer—current status and future directions. *Ann Oncol* *20*, 1913–1927.
- Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D., et al. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* *69*, 2000–2009.
- Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., et al. (2013). CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest* *123*, 2873–2892.
- Hammond, M.E.H., Hayes, D.F., Dowsett, M., Allred, D.C., Hagerty, K.L., Badve, S., Fitzgibbons, P.L., Francis, G., Goldstein, N.S., Hayes, M., et al. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for

immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch. Pathol. Lab. Med.* 134, e48-72.

Hedvat, C.V., Hegde, A., Chaganti, R.S. k, Chen, B., Qin, J., Filippa, D.A., Nimer, S.D., and Teruya-Feldstein, J. (2002). Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. *Hum. Pathol.* 33, 968–974.

Heitz, F., Harter, P., Lueck, H.-J., Fissler-Eckhoff, A., Lorenz-Salehi, F., Scheil-Bertram, S., Traut, A., and du Bois, A. (2009). Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur. J. Cancer* 45, 2792–2798.

Herbst, R.S., Soria, J.-C., Kowanetz, M., Fine, G.D., Hamid, O., Gordon, M.S., Sosman, J.A., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Gettinger, S.N., et al. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515, 563–567.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711–723.

Hoos, A., Urist, M.J., Stojadinovic, A., Mastorides, S., Dudas, M.E., Leung, D.H.Y., Kuo, D., Brennan, M.F., Lewis, J.J., and Cordon-Cardo, C. (2001). Validation of Tissue Microarrays for Immunohistochemical Profiling of Cancer Specimens Using the Example of Human Fibroblastic Tumors. *Am J Pathol* 158, 1245–1251.

Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13, 95–109.

Inozume, T., Hanada, K., Wang, Q.J., Ahmadzadeh, M., Wunderlich, J.R., Rosenberg, S.A., and Yang, J.C. (2010). Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T-cells. *J Immunother* 33, 956–964.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11, 3887–3895.

Iwai, Y., Okazaki, T., Nishimura, H., Kawasaki, A., Yagita, H., and Honjo, T. (2002). Microanatomical localization of PD-1 in human tonsils. *Immunol. Lett.* 83, 215–220.

Juul, N., Szallasi, Z., Eklund, A.C., Li, Q., Burrell, R.A., Gerlinger, M., Valero, V., Andreopoulou, E., Esteva, F.J., Symmans, W.F., et al. (2010). Assessment of an RNA interference screen-derived mitotic and ceramide pathway metagene as a predictor of response to neoadjuvant paclitaxel for primary triple-negative breast cancer: a retrospective analysis of five clinical trials. *Lancet Oncol.* 11, 358–365.

Kaufmann, M., Hortobagyi, G.N., Goldhirsch, A., Scholl, S., Makris, A., Valagussa, P., Blohmer, J.-U., Eiermann, W., Jackesz, R., Jonat, W., et al. (2006). Recommendations from

an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J. Clin. Oncol.* 24, 1940–1949.

Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704.

Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Bärlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G., and Kallioniemi, O.P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* 4, 844–847.

Lakhani, S., Ellis, I., Schnitt, S., Tan, P., and van de Vijver, M. (2012). *WHO Classification of Tumours of the Breast. Fourth Edition.*

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., et al. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *New England Journal of Medicine* 373, 23–34.

Lebeau, A., Kriegsmann, M., Burandt, E., and Sinn, H.-P. (2014). [Invasive breast cancer: the current WHO classification]. *Pathologe* 35, 7–17.

Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121, 2750–2767.

Liedtke, C., and Thill, M. (2016). AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2016. *Breast Care (Basel)* 11, 204–214.

Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K.R., André, F., Tordai, A., Mejia, J.A., Symmans, W.F., Gonzalez-Angulo, A.M., Hennessy, B., Green, M., et al. (2008). Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *JCO* 26, 1275–1281.

Liedtke, C., Hess, K.R., Karn, T., Rody, A., Kiesel, L., Hortobagyi, G.N., Pusztai, L., and Gonzalez-Angulo, A.M. (2013). The prognostic impact of age in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 138, 591–599.

Lin, N.U., Vanderplas, A., Hughes, M.E., Theriault, R.L., Edge, S.B., Wong, Y.-N., Blayney, D.W., Niland, J.C., Winer, E.P., and Weeks, J.C. (2012). Clinicopathological Features, Patterns of Recurrence, and Survival Among Women With Triple-Negative Breast Cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer* 118, 5463–5472.

Link, A., Hardie, D.L., Favre, S., Britschgi, M.R., Adams, D.H., Sixt, M., Cyster, J.G., Buckley, C.D., and Luther, S.A. (2011). Association of T-Zone Reticular Networks and Conduits with Ectopic Lymphoid Tissues in Mice and Humans. *Am J Pathol* 178, 1662–1675.

Liu, S., Lachapelle, J., Leung, S., Gao, D., Foulkes, W.D., and Nielsen, T.O. (2012). CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research* 14, R48.

- Liu, S., Foulkes, W.D., Leung, S., Gao, D., Lau, S., Kos, Z., and Nielsen, T.O. (2014). Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Research* 16, 432.
- Livasy, C.A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M.S., Olopade, O.I., Moore, D.T., and Perou, C.M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol.* 19, 264–271.
- Lo, C.S., Sanii, S., Kroeger, D.R., Milne, K., Talhouk, A., Chiu, D.S., Rahimi, K., Shaw, P.A., Clarke, B.A., and Nelson, B.H. (2017). Neoadjuvant Chemotherapy of Ovarian Cancer Results in Three Patterns of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Response with Distinct Implications for Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 23, 925–934.
- Loi, S., Drubay, D., Adams, S., Pruneri, G., Francis, P.A., Lacroix-Triki, M., Joensuu, H., Dieci, M.V., Badve, S., Demaria, S., et al. (2019). Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *JCO* JCO.18.01010.
- Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H.S., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 1949–1955.
- McGuire, W.L., Horwitz, K.B., Pearson, O.H., and Segaloff, A. (1977). Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 39, 2934–2947.
- McShane, L.M., Altman, D.G., Sauerbrei, W., Taube, S.E., Gion, M., and Clark, G.M. (2005). Reporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer* 93, 387–391.
- Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D.D., Viale, A., Olshen, A.B., Gerald, W.L., and Massagué, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518–524.
- Mittendorf, E.A., Philips, A.V., Meric-Bernstam, F., Qiao, N., Wu, Y., Harrington, S., Su, X., Wang, Y., Gonzalez-Angulo, A.M., Akcakanat, A., et al. (2014). PD-L1 Expression in Triple Negative Breast Cancer. *Cancer Immunol Res* 2, 361–370.
- MSD Merck & Co. Inc (2019). Update on Phase 3 KEYNOTE-119 Study of KEYTRUDA® (pembrolizumab) Monotherapy in Previously-Treated Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer, <https://www.mrknewsroom.com/news-release/oncology/merck-provides-update-phase-3-keynote-119-study-keytruda-pembrolizumab-monothe> (abgerufen am 31.05.2019).
- Muenst, S., Soysal, S.D., Gao, F., Obermann, E.C., Oertli, D., and EGillanders, W. (2013). The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 139.

- Muenst, S., Schaerli, A.R., Gao, F., Däster, S., Trella, E., Droeser, R.A., Muraro, M.G., Zajac, P., Zanetti, R., Gillanders, W.E., et al. (2014). Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* *146*, 15–24.
- Müller, G., Höpken, U.E., and Lipp, M. (2003). The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol. Rev.* *195*, 117–135.
- Murphy, K., and Weaver, C. (2017). *Janeway's Immunobiology* (New York: Garland Science).
- Nanda, R., Chow, L.Q.M., Dees, E.C., Berger, R., Gupta, S., Geva, R., Pusztai, L., Pathiraja, K., Aktan, G., Cheng, J.D., et al. (2016). Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J. Clin. Oncol.* *34*, 2460–2467.
- Naukkarinen, A., and Syrjänen, K.J. (1990). Quantitative immunohistochemical analysis of mononuclear infiltrates in breast carcinomas--correlation with tumour differentiation. *J. Pathol.* *160*, 217–222.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* *11*, 141–151.
- Northridge, M.E., Rhoads, G.G., Wartenberg, D., and Koffman, D. (1997). The importance of histologic type on breast cancer survival. *J Clin Epidemiol* *50*, 283–290.
- Noske, A., Möbus, V., Weber, K., Schmatloch, S., Weichert, W., Köhne, C.-H., Solbach, C., Ingold Heppner, B., Steiger, K., Müller, V., et al. (2019). Relevance of tumour-infiltrating lymphocytes, PD-1 and PD-L1 in patients with high-risk, nodal-metastasised breast cancer of the German Adjuvant Intergroup Node-positive study. *Eur. J. Cancer* *114*, 76–88.
- Okazaki, T., and Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int. Immunol.* *19*, 813–824.
- Ostrand-Rosenberg, S., Horn, L.A., and Haile, S.T. (2014). The Programmed Death-1 Immune-Suppressive Pathway: Barrier to Antitumor Immunity. *J Immunol* *193*, 3835–3841.
- Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C.U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., et al. (2009). Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol* *27*, 1160–1167.
- Parra, K., Valenzuela, P., Lerma, N., Gallegos, A., Reza, L.C., Rodriguez, G., Emmenegger, U., Di Desidero, T., Bocci, G., Felder, M.S., et al. (2017). Impact of CTLA-4 blockade in conjunction with metronomic chemotherapy on preclinical breast cancer growth. *Br J Cancer* *116*, 324–334.
- Patnaik, A., Kang, S.P., Rasco, D., Papadopoulos, K.P., Elassaiss-Schaap, J., Beeram, M., Drengler, R., Chen, C., Smith, L., Espino, G., et al. (2015). Phase I Study of Pembrolizumab

(MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* 21, 4286–4293.

Pauken, K.E., Sammons, M.A., Odorizzi, P.M., Manne, S., Godec, J., Khan, O., Drake, A.M., Chen, Z., Sen, D.R., Kurachi, M., et al. (2016). Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* 354, 1160–1165.

Pelekanou, V., Barlow, W.E., Nahleh, Z.A., Wasserman, B., Lo, Y.-C., von Wahlde, M.-K., Hayes, D., Hortobagyi, G.N., Gralow, J., Tripathy, D., et al. (2018). Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1 Expression in Pre- and Posttreatment Breast Cancers in the SWOG S0800 Phase II Neoadjuvant Chemotherapy Trial. *Mol. Cancer Ther.*

Perez, E.A., Romond, E.H., Suman, V.J., Jeong, J.-H., Sledge, G., Geyer, C.E., Martino, S., Rastogi, P., Gralow, J., Swain, S.M., et al. (2014). Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer: Planned Joint Analysis of Overall Survival From NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol* 32, 3744–3752.

Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.

Philip, M., Fairchild, L., Sun, L., Horste, E.L., Camara, S., Shakiba, M., Scott, A.C., Viale, A., Lauer, P., Merghoub, T., et al. (2017). Chromatin states define tumor-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* 545, 452–456.

Pinder, S.E., Brown, J.P., Gillett, C., Purdie, C.A., Speirs, V., Thompson, A.M., Shaaban, A.M., and on behalf of the Translational Subgroup of the NCRI Breast Clinical Studies Group (2013). The manufacture and assessment of tissue microarrays: suggestions and criteria for analysis, with breast cancer as an example. *Journal of Clinical Pathology* 66, 169–177.

Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 5, 5–23.

Prat, A., Adamo, B., Cheang, M.C.U., Anders, C.K., Carey, L.A., and Perou, C.M. (2013). Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist* 18, 123–133.

Rakha, E.A., and Ellis, I.O. (2009). Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology* 41, 40–47.

Rakha, E.A., Tan, D.S., Foulkes, W.D., Ellis, I.O., Tutt, A., Nielsen, T.O., and Reis-Filho, J.S. (2007). Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res* 9, 404.

Rakha, E.A., El-Sayed, M.E., Lee, A.H.S., Elston, C.W., Grainge, M.J., Hodi, Z., Blamey, R.W., and Ellis, I.O. (2008). Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 26, 3153–3158.

- Remmele, W., and Stegner, H.E. (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologie* 8, 138–140.
- Ren, X., Wu, H., Lu, J., Zhang, Y., Luo, Y., Xu, Q., Shen, S., and Liang, Z. (2018). PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PDL1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* 19, 373–380.
- Robert Koch-Institut (2019). und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland für 2015/2016* (12. Ausgabe, 78-81, Berlin).
- Rodríguez-Pinilla, S.M., Sarrió, D., Honrado, E., Hardisson, D., Calero, F., Benitez, J., and Palacios, J. (2006). Prognostic Significance of Basal-Like Phenotype and Fascin Expression in Node-Negative Invasive Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res* 12, 1533–1539.
- Rody, A., Karn, T., Liedtke, C., Pusztai, L., Ruckhaeberle, E., Hanker, L., Gaetje, R., Solbach, C., Ahr, A., Metzler, D., et al. (2011). A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res* 13, R97.
- Rosenberg, J., Chia, Y.L., and Plevritis, S. (2005). The effect of age, race, tumor size, tumor grade, and disease stage on invasive ductal breast cancer survival in the U.S. SEER database. *Breast Cancer Res. Treat.* 89, 47–54.
- Rubin, M.A., Dunn, R., Strawderman, M., and Pienta, K.J. (2002). Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 312–319.
- Ruffell, B., DeNardo, D.G., Affara, N.I., and Coussens, L.M. (2010). Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 3–10.
- Rüschoff, J., Nagelmeier, I., Hofmann, M., Henkel, T., and Stoss, O. (2009). [ErbB2 diagnostics in breast cancer--an update]. *Pathologie* 30, 147–155.
- Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Eynden, G.V. den, Baehner, F.L., Penault-Llorca, F., et al. (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 26, 259–271.
- Sataloff, D.M., Mason, B.A., Prestipino, A.J., Seinige, U.L., Lieber, C.P., and Baloch, Z. (1995). Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J. Am. Coll. Surg.* 180, 297–306.
- Schalper, K.A., Velcheti, V., Carvajal, D., Wimberly, H., Brown, J., Pusztai, L., and Rimm, D.L. (2014). In Situ Tumor PD-L1 mRNA Expression Is Associated with Increased TILs and Better Outcome in Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res* 20, 2773–2782.

- Schmid, P., Adams, S., Rugo, H.S., Schneeweiss, A., Barrios, C.H., Iwata, H., Diéras, V., Hegg, R., Im, S.-A., Wright, G.S., et al. (2018). Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer | NEJM. *N Engl J Med* 379, 2108–2121.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.
- Simon, R., Mirlacher, M., and Sauter, G. (2004). Tissue microarrays. *BioTechniques* 36, 98–105.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177–182.
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869–10874.
- Sotiriou, C., and Puztai, L. (2009). Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 360, 790–800.
- Stefansson, O.A., Jonasson, J.G., Johannsson, O.T., Olafsdottir, K., Steinarsdottir, M., Valgeirsdottir, S., and Eyfjord, J.E. (2009). Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Res* 11, R47.
- Strickland, K.C., Howitt, B.E., Shukla, S.A., Rodig, S., Ritterhouse, L.L., Liu, J.F., Garber, J.E., Chowdhury, D., Wu, C.J., D'Andrea, A.D., 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, 13587–13598.
- Symmans, W.F., Peintinger, F., Hatzis, C., Rajan, R., Kuerer, H., Valero, V., Assad, L., Poniecka, A., Hennessy, B., Green, M., et al. (2007). Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 25, 4414–4422.
- Symmans, W.F., Wei, C., Gould, R., Yu, X., Zhang, Y., Liu, M., Walls, A., Bousamra, A., Ramineni, M., Sinn, B., et al. (2017). Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype. *J. Clin. Oncol.* 35, 1049–1060.
- Taube, J.M., Anders, R.A., Young, G.D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T.L., Chen, S., Klein, A.P., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., et al. (2012). Colocalization of Inflammatory Response

with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci Transl Med* 4, 127ra37.

Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2008). Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.* 15, 3–12.

Thompson, R.H., Gillett, M.D., Cheville, J.C., Lohse, C.M., Dong, H., Webster, W.S., Krejci, K.G., Lobo, J.R., Sengupta, S., Chen, L., et al. (2004). Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17174–17179.

Tischkowitz, M., Brunet, J.-S., Bégin, L.R., Huntsman, D.G., Cheang, M.C., Akslen, L.A., Nielsen, T.O., and Foulkes, W.D. (2007). Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 7, 134.

Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., et al. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* 366, 2443–2454.

Traina, T.A., Miller, K., Yardley, D.A., Eakle, J., Schwartzberg, L.S., O’Shaughnessy, J., Gradishar, W., Schmid, P., Winer, E., Kelly, C., et al. (2018). Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 36, 884–890.

Wittekind, Ch. (Hrsg.), Meyer, H.-J., and Bootz, F. (2004). *TNM Klassifikation maligner Tumoren* (6. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).

Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Allison, K.H., Harvey, B.E., Mangu, P.B., Bartlett, J.M.S., Bilous, M., Ellis, I.O., Fitzgibbons, P., Hanna, W., et al. (2018). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 142, 1364–1382.

World Health Organisation (2018). Breast cancer, <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/> (abgerufen am 31.12.2018).

Yeong, J., Lim, J.C.T., Lee, B., Li, H., Ong, C.C.H., Thike, A.A., Yeap, W.H., Yang, Y., Lim, A.Y.H., Tay, T.K.Y., et al. (2019). Prognostic value of CD8 + PD-1+ immune infiltrates and PDCD1 gene expression in triple negative breast cancer. *J Immunother Cancer* 7.

Zamarron, B.F., and Chen, W. (2011). Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 651–658.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinen Betreuern Prof. Dr. med. Cornelia Kolberg-Liedtke und PD Dr. med. Lars Hanker für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und exzellenten Unterstützung im weiteren Verlauf. Auf dieser Basis ist mein wissenschaftliches Interesse weit über diese Dissertation hinaus gewachsen.

Weiterhin gilt mein großer Dank Prof. Dr. med. Achim Rody für die uneingeschränkte Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit, sowie für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und Materials und vielen guten Ratschlägen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Christoph Thorns für die Betreuung im Institut für Pathologie bei Vorbereitung und Auswertung der Tumorproben bedanken, sowie bei Annette Aufsess und den MTAs des „Ecklabors“ für die Unterstützung bei der Austestung der Färbungen.

Dr. rer. nat. Karen Bräutigam möchte ich für hilfreiche Diskussionen danken, die diese Dissertation immer voran gebracht haben.

Besonders möchte ich meinen Eltern, Geschwistern und Sebastian Collins danken für den endlosen Rückhalt, mit dem sie mich jeden Tag unterstützen.

8 Lebenslauf

Mascha Pervan, geb. 1989

BERUFLICHER WERDEGANG

Approbation als Ärztin

25.Juli 2016

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck

Wissenschaftliche Mitarbeiterin

seit Dez. 2016

DISSERTATION

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universität zu Lübeck

Verfassen der Dissertationsschrift

Juli 17-Dez.19

Statistische Auswertungen

Aug.16-Okt.17

Erhebung Basisdaten, Austestung der Antikörper, mikroskopische Auswertung

Feb.15-Juli 16

DRITTMITTEL

Forschungsförderung der Werner und Klara Kreitz – Stiftung

2016/2017

Stiftung zur Förderung der Krebsforschung durch Unterstützung von universitären Forschungsvorhaben in Schleswig-Holstein

AUSBILDUNG

Universität zu Lübeck

Studium der Humanmedizin

2009-2016

Ärztliche Prüfung (Staatsexamen)

Juni 2016

Praktisches Jahr – Gynäkologie (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck), Chirurgie (Sultan Qaboos University Hospital Muscat, Oman & Spital Linth, Schweiz), Innere Medizin (Sana Klinik Lübeck)

2015-2016

Wahlfächer – Demopräparation, Institut für Anatomie; Klinische Ultraschalldiagnostik, Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin; Klinische Neurologie, Klinik für Neurologie

2009-2016

ÖFFENTLICHE TÄTIGKEITEN

Fachschaft Medizin, Universität zu Lübeck

2009-2016

Studentische Vertretung Senatsausschuss Medizin sowie in Berufungsverfahren, Organisation zahlreicher Veranstaltungen zu Gesundheitspolitik

Orchester der Universität zu Lübeck – Harfenistin des Orchesters

2009-2016

9 Wissenschaftliche Publikationen

Pervan, M., Bräutigam, K., Thorns, C., Rody, A., und Liedtke, C. (2018). Immune checkpoint marker expression and clinicopathological factors in primary TNBC. *JCO* 36, e13119–e13119.

Pervan, M.: Geladener Vortrag der 62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), Sitzung Immunologie in Gynäkologie und Geburtshilfe (2018). Systematische Analyse immunhistochemischer Expression von Immuncheckpoint-Markern und klinisch-pathologischen Parametern beim tripel-negativen Mammakarzinom.

Pervan, M.: Geladener Vortrag der XXV. Akademische Tagung Deutschsprachiger Hochschullehrer der Gynäkologie und Geburtshilfe (2017). Systematische Analyse immunhistochemischer Expression von Immuncheckpoint-Markern und klinisch-pathologischen Parametern beim tripel-negativen Mammakarzinom.

Pervan, M.: Vortragspreis „Leuchfeuer des Nordens“ der 132. Tagung Norddeutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (NGGG) (2017). Untersuchungen zu immunhistochemischer Expression von Immuncheckpoint-Markern und klinisch-pathologischen Parametern bei tripel-negativen Mammakarzinom.

Pervan, M., Bräutigam, K., Aufsess, A., Thorns, C., Rody, A., und Liedtke, C. 8. Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung der AGO (2016). Untersuchungen zu Korrelationen von PD-L1 und CTLA-4-Expression und Gesamtüberleben beim triple-negativen Mammakarzinom.

Bräutigam, K., Mitzlaff, K., Uebel, L., Köster, F., Polack, S., **Pervan, M.**, Steinert, G., Rody, A., and Liedtke, C. (2016). Subtypes of Triple-negative Breast Cancer Cell Lines React Differently to Eribulin Mesylate. *Anticancer Res.* 36, 2759–2766.