

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie
mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

PD-L1 Expression und CD8 positive zytotoxische Lymphozyten in mesenchymalen Tumoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Charlotte Schweiger
aus München

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.12.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Eva Tolosa

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Guido Sauter

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	VI
Einleitung	1
Material und Methoden	15
1.1 Die Tissue Microarray Methode	15
1.2 Herstellung eines Sarkom Tissue Microarrays	19
1.3 Immunhistochemie	22
1.4 Statistik.....	24
Ergebnisse	25
1.5 PD-L1	25
1.6 CD8 Quantifizierung.....	36
1.7 PD-L1 Expression und Lymphozytendichte	43
Diskussion	46
Zusammenfassung.....	60
Abkürzungsverzeichnis	62
Literaturverzeichnis.....	63
Danksagung.....	70
Lebenslauf.....	71
Eidesstattliche Versicherung.....	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomische Verteilung der Sarkome (Guy, Lazar, & Lev, 2008).....	1
Abbildung 2: Dedifferenziertes Liposarkom (Riede, Werner, & Schaefer, 2004)	5
Abbildung 3: Leiomyosarkom des Femurs (Riede, Werner, & Schaefer, 2004).....	6
Abbildung 4: Beispiel eines Angiosarkoms (Riede, Werner, & Schaefer, 2004).....	7
Abbildung 5: Rhabdomyosarkom (Riede, Werner, & Schaefer, 2004).....	8
Abbildung 6: Synovialsarkom (Riede, Werner, & Schaefer, 2004)	9
Abbildung 7: Schematischer Überblick über den Wirkungsmechanismus von Anti-PD-1- und Anti-PD-L1-Antikörpern (Veenstra R. , Kostine, Cleton-Jansen, de Miranda, & Bovée, 2018)	11
Abbildung 8 zeigt die Koordinaten des TMA's SAR 2.2 A zur Auswertung der einzelnen Gewebespots	16
Abbildung 9 zeigt die Koordinaten des TMA's SAR 2.2 B zur Auswertung der einzelnen Gewebespots	16
Abbildung 10: Stanzvorgang mittels eines halbautomatischen Geräts	17
Abbildung 11 zeigt den Sarkom Array 2.2 A mit zugehörigen klinisch pathologischen Parametern.....	18
Abbildung 12 zeigt den Sarkom Array 2.2 B mit zugehörigen klinisch pathologischen Parametern.....	19
Abbildung 13 Herausgesuchte Blöcke und Schnitte aus dem Archiv des Universitätsklinikum Eppendorf	20
Abbildung 14: CD8 Hellfeld Färbung und Detektion der Zellen durch eine künstliche Intelligenz.....	23
Abbildung 15: Kräftige PD-L1 Expression in der Mehrzahl der Tumorzellen eines Angiosarkoms.	27
Abbildung 16: PD-L1 Positivität in ca. 20% der Tumorzellen eines Liposarkoms. Zusätzlich sind PD-L1 positive Makrophagen erkennbar.....	27
Abbildung 17: Diffuse PD-L1 Positivität der Tumorzellen eines Liposarkoms.....	28
Abbildung 18: Schwache bis mäßig starke PD-L1 Positivität der überwiegenden Mehrzahl der Tumorzellen eines malignen Mesothelioms	28
Abbildung 19: Malignes Mesotheliom mit mäßig starker membranöser PD-L1 Positivität bei der Mehrzahl der Tumorzellen.....	29
Abbildung 20: Schwache aber eindeutig erkennbare membranöse PD-L1 Positivität in mindestens 30% der Tumorzellen eines malignen Mesothelioms	29

Abbildung 21: Schwache membranöse PD-L1 Positivität in 100% der Tumorzellen eines Sarkoms NOS.....	30
Abbildung 22: PD-L1 negatives Sarkom NOS	30
Abbildung 23: Sarkomatoides Urothelkarzinom mit schwacher membranöser PD-L1 Positivität von ca. 40% der Tumorzellen	31
Abbildung 24: CD8 Dichte in Weichgewebstumoren,	36
Abbildung 25: Angiosarkom mit einer hohen Beimengung CD8-positiver Lymphozyten	38
Abbildung 26: Myxofibrosarkom mit einer sehr hohen Dichte an CD8-positiven Lymphozyten.....	39
Abbildung 27: Liposarkom mit einer hohen Menge an CD8-positiven Lymphozyten ..	39
Abbildung 28: Malignes Mesotheliom mit einer geringen Dichte an CD8-positiven Zellen im Tumorgewebe. Ein Herd mit vermehrten CD-8 positiven Zellen entspricht einem peritumoralen follikulären Entzündungsinfiltrat.....	40
Abbildung 29: Sarkom NOS mit einer hohen Dichte an CD8-positiven Zellen.....	40
Abbildung 30: Sarkom NOS mit mäßig hohen CD8-positiven tumorinfiltrierenden Lymphozyten.....	41
Abbildung 31: Leiomyosarkom mit CD8-positiven tumorinfiltrierenden Lymphozyten	41
Abbildung 32: Sarkomatoides Urothelkarzinom mit einer hohen Dichte an CD8-positiven Lymphozyten.....	42
Abbildung 33: Sarkomatoides Urothelkarzinom mit einer hohen Dichte an CD8-positiven Zellen.....	42
Abbildung 34: Anzahl der PD-L1 positiven Tumoren mit einem Cutoff Wert von 1% angefärbten Tumorzellen	47
Abbildung 35:Anzahl der PD-L1 positiven Tumoren mit einem Cutoff Wert von 5% angefärbten Tumorzellen	48
Abbildung 36:Anzahl der PD-L1 positiven Tumoren mit einem Cutoff Wert von 10% angefärbten Tumorzellen	48
Abbildung 37: Anzahl der PD-L1 positiven Tumoren mit einem anderen Cutoff Wert angefärbten Tumorzellen	49
Abbildung 38: Anzahl der PD-L1 positiven Tumoren (Zusammenfassung aller Studien mit allen Cutoff Werten)	49
Abbildung 39: Beispiel eines inkompletten TMA Spots	54

Abbildung 40: Beispiel eines unvollständigen TMA Spots.....54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO Klassifikation der malignen Weichgewebstumoren	03
Tabelle 2: Indikation für Checkpoint Inhibitor Therapie (Schildhaus, 2018)	12
Tabelle 3: Studien zum Immuncheckpoint-Inhibitor-Einsatz bei unterschiedlichen Sarkomentitäten	13
Tabelle 4: zeigt die Entitäten mit ihrer entsprechenden Anzahl	21
Tabelle 5: PD-L1 Status in Tumorzellen vs Dignität	25
Tabelle 6: Häufigkeit der PD-L1 Positivität in den Tumorzellen verschiedener Typen von Weichgewebstumoren	26
Tabelle 7: PD-L1 Status in Tumorzellen vs Tumorphänotyp	31
Tabelle 8: PD-L1 in den Entzündungszellen vs Dignität	32
Tabelle 9: PD-L1 Positivität in Entzündungszellen	33
Tabelle 10: PD-L1 Expression in Entzündungszellen vs Tumorphänotyp	34
Tabelle 11: PD-L1 Positivität in Tumor- und/oder Entzündungszellen	34
Tabelle 12: PD-L1 in den Tumor- und/oder Entzündungszellen vs Dignität	35
Tabelle 13: CD8 Dichte vs Dignität	37
Tabelle 14: CD8 Dichte vs Tumorphänotyp	38
Tabelle 15: PD-L1 Status in den Tumorzellen, CD8 in allen Tumoren und ausgewählten Subgruppen	43
Tabelle 16: PD-L1 Status in Entzündungszellen, CD8- Dichte in allen Tumoren und ausgewählten Subgruppen	44
Tabelle 17: PD-L1 Status und CD8-Dichte für die kombinierte Analyse von Tumor- und Entzündungszellen	44
Tabelle 18: Studien der Untersuchung von CD8 positiven Lymphozyten in Tumoren	46

Einleitung

Sarkome sind eine vielfältige Gruppe von bösartigen Tumoren, die sich vor allem aus dem Knochen und aus dem Weichgewebe bilden (Guy, Lazar, & Lev, 2008). Insgesamt machen maligne Weichteiltumoren ca. 1% der malignen Tumoren im Erwachsenenalter aus (Que, et al., 2019) (Guy, Lazar, & Lev, 2008). Bei Kindern hingegen repräsentieren maligne Weichteiltumoren etwa 15% der Malignome (Fenzl, Mehrmann, Kremp, & Schneider, 2017) (Guy, Lazar, & Lev, 2008). Die bei Kindern am häufigsten vorkommenden malignen Weichteiltumoren sind das Rhabdomyosarkom, das Synovialsarkom, das Fibrosarkom und das Ewing Sarkom (Fenzl, Mehrmann, Kremp, & Schneider, 2017). Bei den Erwachsenen dominieren das Liposarkom, das maligne fibröse Histiozytom (heute NOS), das Fibrosarkom, das Synovialsarkom und das Rhabdomyosarkom (Wirbel, Feifel, & Mutschler, 1997). Die topographische Verteilung der Sarkome betrifft hauptsächlich die unteren Extremitäten (32%), den Rumpf (9%), die oberen Extremitäten (13%), das Retroperitoneum (27%), Kopf und Hals (6%) und die Viszera (13%) (Guy, Lazar, & Lev, 2008).

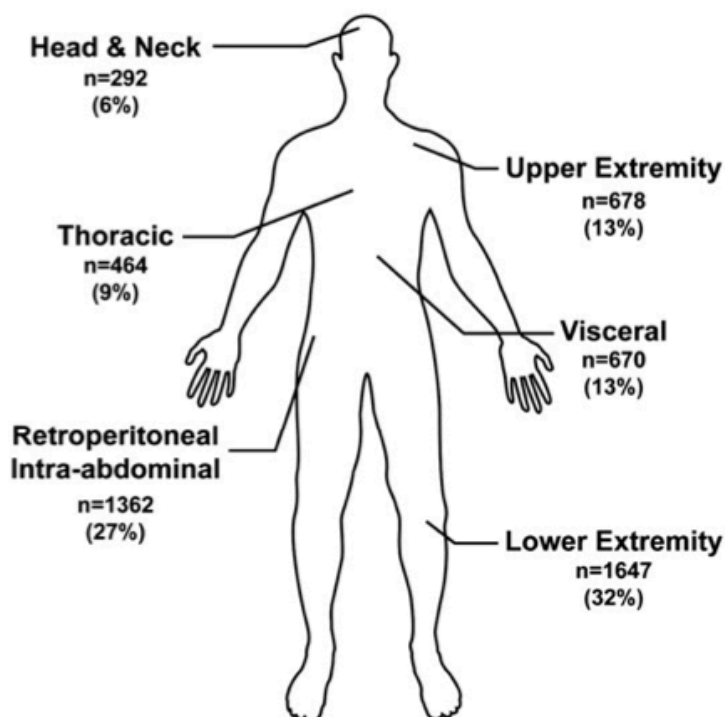


Abbildung 1: Anatomische Verteilung der Sarkome (Guy, Lazar, & Lev, 2008)

Eingeteilt werden die Weichteiltumoren nach der WHO Klassifikation, dessen erste Ausgabe im Jahre 1969 unter der Leitung von Dr. Franz Enzinger entstand.

Es existieren insgesamt vier Ausgaben, wobei die vierte Ausgabe im Jahre 2013 ins Leben gerufen wurde und derzeit die Aktuellste darstellt. Grundsätzlich beinhaltet die Systematik der Weichteiltumoren die folgenden Tumorkategorien: lipomatöse Tumoren, fibroblastische/myofibroblastische Tumoren, fibrohistiozytische Tumoren, glattmuskuläre Tumoren, perizystische (perivaskuläre) Tumoren, vaskuläre Tumoren der Weichteile, chondroossäre Tumoren, Gastrointestinale Stromatumoren (GIST), Nervenscheidentumoren, Tumoren mit ungewisser Differenzierung und undifferenzierte Sarkome (Petersen , 2013).

An der Einteilung der Weichgewebstumoren in der WHO Klassifikation sind die ständig auftretenden Neuerungen hervorzuheben, welche vor allem die Subgruppenkategorisierung beinhaltet. Die wesentlichen Neuerungen in der WHO-Klassifikation von 2013 beinhalten die neuen Subgruppen der undifferenzierten Sarkome, welche die Kategorie „malignes fibröses Histiocytom“ ablöste, die neu aufgenommene Subgruppe der Gastrointestinalen Stromatumoren und die ebenfalls neu hinzugefügte Subgruppe der Nervenscheidentumoren. Alle Weichgewebstumoren werden auch nach ihrer Dignität eingeteilt, wobei Benigne, Intermediäre (lokal aggressiv/selten metastasierend) und Maligne unterschieden wird.

Das hauptsächlich angewandte Graduierungssystem ist das FNCLCC- (Union internationale contre le cancer) System. Dieses basiert auf einem Score, welcher die Parametern Tumordifferenzierung, Mitoserate und Tumornekrose beinhaltet (Fenzl, Mehrmann, Kremp , & Schneider, 2017).

Das Staging von Weichteilsarkomen setzt sich aus histologischer und klinischer Information zusammen. Das Staging System für Weichteilsarkome entstand aus der UICC (Union internationale contre le cancer) und dem AJCC (American Joint Committee on Cancer). Dieses TNM System basiert auf dem histologischen Grad (Grad 1-3), der Tumorgroße T sowie regionalen Lymphknotenmetastasen (N0 oder N1) und Fernmetastasen (M0 oder M1) (Fenzl, Mehrmann, Kremp , & Schneider, 2017).

In der nachfolgenden Abbildung werden die Subgruppen mit ihren malignen Entitäten dargestellt.

Subgruppen	maligne Entitäten
Adipozytäre Tumoren:	Dedifferenziertes Liposarkom
	Myxoides Liposarkom
	Pleomorphes Liposarkom
	Liposarkom (NOS)
Fibroblastische/myofibroblastische Tumoren:	Adultes Fibrosarkom
	Myxofibrosarkom
	Niedrigmalignes fibromyxoides Sarkom
	Sklerosierendes epitheloides Fibrosarkom
Fibrohistiozytische Tumoren (FHT):	Maligner tenosynovialer Riesenzelltumor
Glattmuskuläre Tumoren:	Leiomyosarkom
Perizytische (perivaskuläre) Tumoren:	Maligner Glomustumor
Skelettmuskuläre Tumoren:	Embryonales Rhabdomyosarkom
	Alveoläres Rhabdomyosarkom
	Pleomorphes Rhabdomyosarkom
	Spindelzell-/sklerosierendes Rhabdomyosarkom
Vaskuläre Tumoren der Weichteile:	Epithelioides Hämangioendotheliom
	Angiosarkom der Weichteile
Chondroossäre Tumoren:	Extraskelettales Osteosarkom
Gastrointestinale Stromatumoren (GIST):	Malignes GIST
Nervenscheidentumoren:	Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)
	Epithelioider MPNST
	Maligner Tritontumor
	Maligner Granularzelltumor
Tumoren ungewisser Differenzierung:	Ektomesenchymom
	Synovialsarkom NOS
	Synovialsarkom, spindelzellig
	Synovialsarkom, biphasisch
	Epithelioides Sarkom
	Alveoläres Weichteilsarkom (ASPS)
	Klarzellsarkom der Weichteile
	Extraskelettales myxoides Chondrosarkom
	Extraskelettales Ewing Sarkom
	Desmoplastischer kleinrundzelliger Tumor (DSRCT)
	Extrarenaler Rhabdoidtumor
	Neoplasien mit perivaskulärer epithelioider Zelldifferenzierung (PECom)
	PEComa NOS, benigne
	PEComa NOS, maligne
Intimasarkom	
Undifferenzierte/unklassifizierte Sarkome:	Undifferenziertes Spindelzellsarkom
	Undifferenziertes pleomorphes Sarkom
	Undifferenziertes rundzelliges Sarkom
	Undifferenziertes epithelioides Sarkom
	Undifferenziertes Sarkom NOS

Tabelle 1: WHO Klassifikation der malignen Weichgewebstumore (Petersen, 2013)

Im Folgenden werden die wichtigsten und häufigsten Sarkom-Typen näher betrachtet.

Liposarkome, welche bei Erwachsenen am häufigsten auftreten (20%), gehören zu einer Gruppe maligner Tumoren unterschiedlicher Malignitätsgrade aus Fettzellen verschiedener Reifegrade (Lipoblastom) mit Sitz im tiefen Weichgewebe. Das mittlere Manifestationsalter ist die 5.-7. Lebensdekade und die typischen Prädilektionsstellen sind die Hüfte, der Oberschenkel, der Oberarm und das Retroperitoneum. Molekularpathologisch wird in verschiedene Liposarkomsubtypen unterschieden. Das hochdifferenzierte Liposarkom zeigt Ringchromosomen mit amplifizierten 12q-13-15-Sequenzen auf (Crago, MD, PhD, FACS, & Dickson, 2016). Beim myxoiden Liposarkom finden sich hingegen Translokationen t (12;16) (113; p11) mit Fusion des CHOP-Gens mit dem Gen „translocated in Liposarcoma“. Das so entstandene Fusionstranskript entbindet die Fettvorläuferzelle von adipogenen Stimuli und von der Kontaktinhibition. Makroskopisch überwiegen bei Liposarkomen die festen, gelblich weißen, gelatinösen Tumoren oft mit regressiven Veränderungen. Das hochdifferenzierte Liposarkom, bei dem eine große Ähnlichkeit zu Lipomen erkennbar ist, dominiert mit univaskulären Adipozyten im Verein mit atypischen Stromazellen (hyperchromatische Zellkerne) und oligovakuolären Lipoblasten. Diese Art von Liposarkomen haben einen niedrigen Malignitätsgrad und metastasieren sehr selten. Zu einer weiteren Subgruppe gehört das myxoide Liposarkom, bei dem multivaskuläre Lipoblasten mit fettvaskuolenreichen Zytoplasma herausstechen und die Tumorschnittfläche knotig, weißlich gelatinös durchsetzt ist. Das myxoide Liposarkom ist strahlensensibel, besitzt einen intermediären Malignitätsgrad und metastasiert bei 30% der Patienten. In vielen Fällen wechseln sich die myxoiden Tumorareale mit geringer Zelldichte mit solchen ab, die zu zwei Drittel dicht mit rundzelligen Lipoblasten besetzt sind. Diese Tumoren besitzen eine 50%ige Metastasierungsrate in Leber, Lunge und Skelett. Das entdifferenzierte Liposarkom macht 10% aller Liposarkome aus und ist dadurch gekennzeichnet, dass ein hochdifferenziertes Liposarkom (Primär-oder Rezidivtumor) schlagartig in ein hochmalignes, nicht lipogenes Sarkom übergeht. Beim pleomorphen Liposarkom, welches ebenfalls ein hochmaligner Tumor ist, befinden sich bizarre, teils riesige Tumorzellen mit fettvaskuolenreichen Zytoplasma. Das Stroma setzt sich insgesamt ähnlich zusammen wie beim myxoiden Liposarkom (Riede, Werner, & Schaefer, 2004).



Abbildung 2: Dedifferenziertes Liposarkom (Riede, Werner, & Schaefer, 2004)

Das **Leiomyosarkom** ist laut Definition ein maligner Tumor der glatten Muskulatur, welcher beispielsweise ca. 10% aller Uterustumoren ausmacht und erst nach dem 3. Lebensjahrzehnt vorkommt. Bei der Pathogenese fällt auf, dass Leiomyosarkome meist aus atypischen Leiomyomen hervorgehen. Makroskopisch ist ein Teil der Leiomyosarkome nicht von einem Leiomyom zu unterscheiden. Homogen weiche, gelbliche Tumoren mit Infiltration ins Myometrium, Endometrium oder Parametrium, mit Gefäßinvasion oder mit Nekrose, sind bereits makroskopisch sarkomverdächtig. Im Gegensatz zum Leiomyom findet man histologisch keinen geflechtartigen Aufbau mehr. Die Zellen zeigen polymorphe, hyperchromatische Kerne und bilden teilweise auch Riesenzellen. Zu den relevantesten Malignitätskriterien zählen vor allem die Gefäßinvasion, der Mitosereichtum und die Nekrosen (Marko, MD, & Wolfman, 2018) (Riede, Werner, & Schaefer, 2004).



Abbildung 3: Leiomyosarkom des Femurs (Riede, Werner, & Schaefer, 2004)

Angiosarkome gehören zu den seltensten Formen der Weichteilsarkome (Gaballah, et al., 2017). Dieser Sammelbegriff steht für eindeutig maligne Tumoren, die eine endotheliale Differenzierung vorweisen. Je nach auslösendem Faktor werden bei der Pathogenese in das idiopathische kutane Angiosarkom, das lymphödem-assoziierte Angiosarkom, das postirradiation-Angiosarkom, das Weichteil-Angiosarkom und das Organ-Angiosarkom unterteilt (Gaballah, et al., 2017). Oberflächliche Tumoren zeigen bei der Morphologie rötliche Plaques oder Knoten auf. Ein Angiosarkom imponiert auf der Schnittfläche als unscharfe, oft schwammartige hämorrhagische Läsion mit markig-weißlicher Komponente. Histologisch lassen sich gewucherte Gefäßspalten erkennen, die mit atypischen Endothelzellen austapeziert sind. Der ultrastrukturelle Nachweis von Weibel-Palade-Korpuskeln sowie der immunhistochemische Nachweis von Gerinnungsfaktor VIII, CD34 (=Antigen hämatopoetischer Vorläuferzellen) und CD31 (=Plättchen/Endotheladhäsionsmolekül) sind diagnostisch relevante Faktoren. Das Angiosarkom imitiert sowohl Spindelzellkarzinome als auch maligne Melanome (Riede, Werner, & Schaefer, 2004).

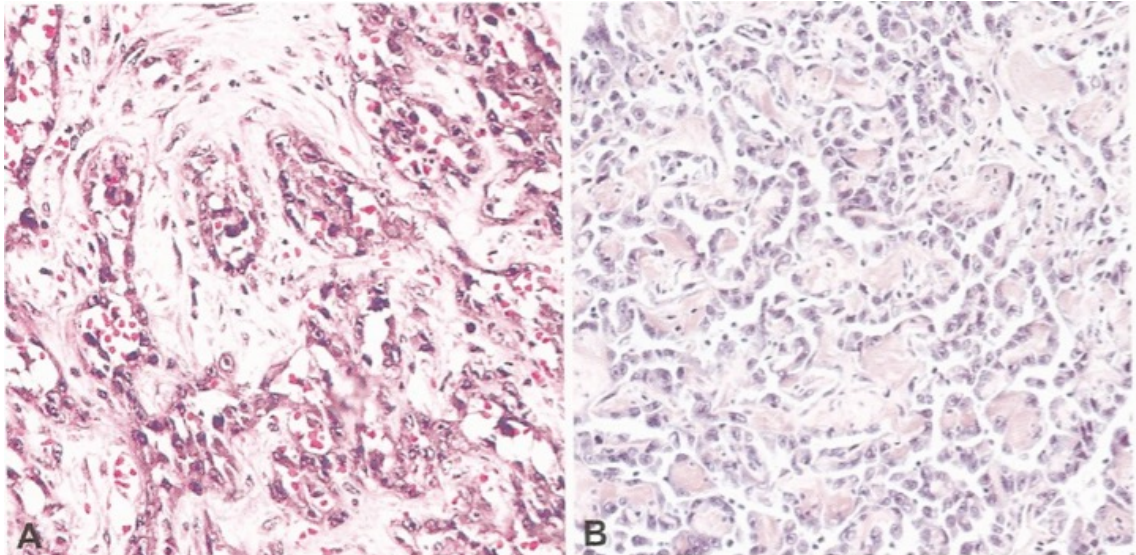


Abbildung 4: Beispiel eines Angiosarkoms (Riede, Werner, & Schaefer, 2004)

Rhabdomyosarkome, welche etwa 15% aller Weichteilsarkome ausmachen und bei Kindern unter 15 Jahren das häufigste Weichteilsarkom darstellen, gehören zu einer Gruppe bösartiger Tumoren, welche von der quergestreiften Muskulatur oder von primitiven, noch pluripotenten Mesenchymzellen abstammen (Fenzl, Mehrmann, Kremp , & Schneider, 2017) . Makroskopisch finden sich unscharf begrenzte Weichteilgeschwülste mit weicher Konsistenz und graurötlicher Schnittfläche, die teilweise nekrotisch verändert sein können. Exophytisch wachsende Tumoren können unabhängig vom histologischen Typ ein traubenförmiges Wachstumsmuster erlangen (genannt Sarcoma botryoides). Eine Expression von Myo-D1, Myogenin und Desmin lässt sich meist immunhistochemisch in den Tumorzellen nachweisen (Skapek, et al., 2019). Je nach histologischer Ausdifferenzierung und Wachstumsmuster werden das embryonale Rhabdomyosarkom, das alveoläre Rhabdomyosarkom und das pleomorphe Rhabdomyosarkom unterteilt (Riede, Werner, & Schaefer, 2004).

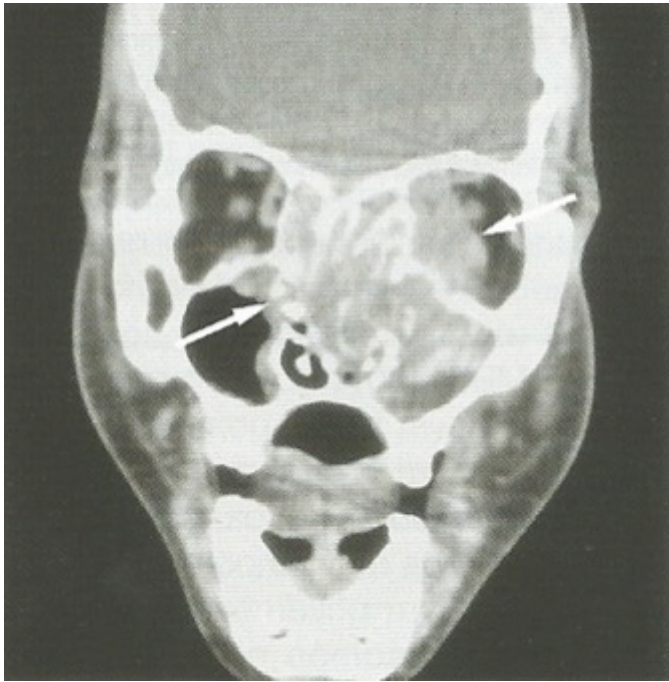


Abbildung 5: Rhabdomyosarkom (Riede, Werner, & Schaefer, 2004)

Das **Synovialsarkom** gehört zu einer Gruppe seltener, maligner Tumoren des paraartikulären und peritendinösen Weichteilgewebes, deren Zellen wie die Mesothelien die Fähigkeit besitzen, sich in epithelartiger und/oder mesenchymaler Richtung auszdifferenzieren und meist eine tumorspezifische Chromosomentranslokation aufweisen. Das Prädilektionsalter beträgt 15-40 Jahre und die Prädilektionsstellen sind die untere Extremität im Knie-, Fuß- und Hüftbereich (60% der Fälle). Über 95% der Synovialsarkome exprimieren das SS18-SSX Gen, welches als diagnostischer Marker für diesen Tumortyp gilt (Mika, et al., 2019). Makroskopisch enthält der Tumor unscharf begrenzte grauweiße Knoten, die bei der seltenen intraartikulären Lokalisation (nur 10% der Fälle) die Innenhaut der Gelenkkapsel durchsetzen. Je nach feingeweblicher Ausdifferenzierung werden insbesondere monophasische Tumorformen mit epithelartiger oder mesenchymaler Prägung und biphasische Tumoren, bei denen beide Gewebekompartimente zugleich das Bild beherrschen, unterschieden. Das Synovialsarkom bildet in seiner biphasischen Form spaltförmige Hohlräume, die von schleimbildenden epithelartigen Zellen bedeckt und von fibrosarkomähnlichem Gewebe auseinandergeschoben werden. Immunhistochemisch kann der Nachweis von Vimentin und herdförmig

Zytokeratin und EMA (epitheliales Membranantigen) erfolgen (Riede, Werner, & Schaefer, 2004).

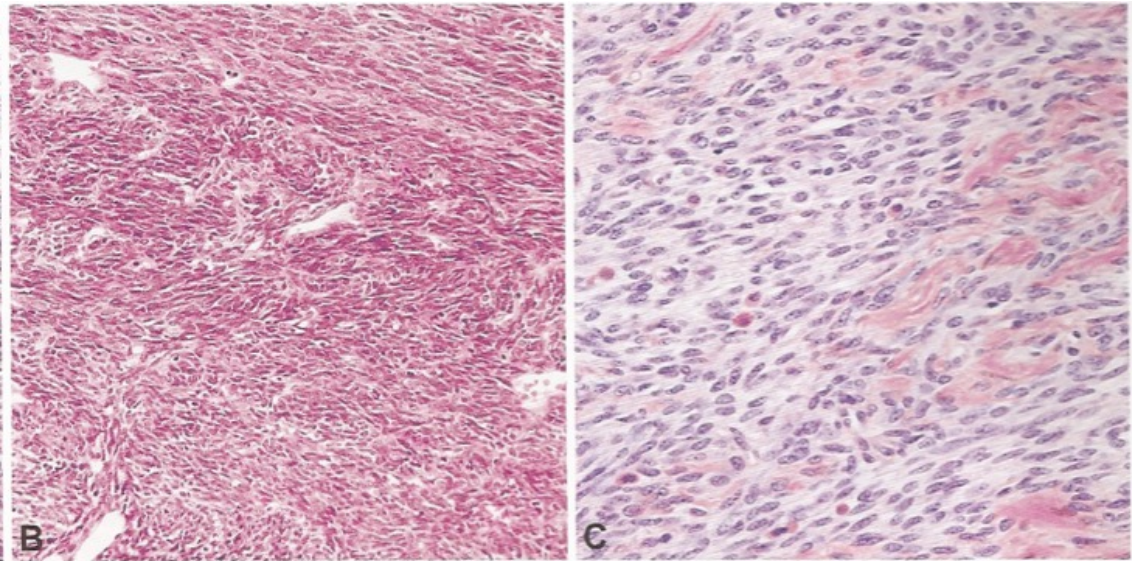


Abbildung 6: Synovialsarkom (Riede, Werner, & Schaefer, 2004)

Durch die niedrige Inzidenz der Sarkome ergibt sich in allen Forschungsbereichen einschließlich Grundlagenforschung und klinischen Studien eine zu geringe Anzahl an Studien mit großen Fallzahlen (Chibon & Aurias, 2007). Somit sind unter anderem auch die Ursachen für das Entstehen von Sarkomen nahezu ungeklärt, wobei in erster Linie Umweltfaktoren, Immunsuppression, AIDS, Transplantation, chronische Entzündung und genetische Alterationen diskutiert werden (Guy, Lazar, & Lev, 2008).

Potenzielle Umweltfaktoren stellen Chemikalien wie Polyvinylchlorid, Thorotrast, das als Schädlingsbekämpfungsmittel verwendete anorganische Arsen, Dioxin, Chlorphenol, Benzophenon und Medikamente wie androgen-anabol wirkende Steroide dar (Guy, Lazar, & Lev, 2008). Sarkome werden darüber hinaus mit dem Li-Fraumeni-Syndrom, Retinoblastom, Werner Syndrom, Bloom Syndrom, Rothmund-Thompson Syndrom und der Neurofibromatosis Typ 1 assoziiert (Guy, Lazar, & Lev, 2008). Patienten mit einer Neurofibromatosis Typ 1 haben ein 10% Risiko einen MPNST (malignant peripheral nerve sheath tumor) zu entwickeln (Shurell, et al., 2016).

Charakteristische Translokation oder Mutation kommen bei 40% aller Sarkome vor. Die restlichen 60% besitzen keine spezifische Translokation/Mutation, wobei

20% auf die undifferenzierten Sarkome (NOS) fallen. Sarkome wie Leiomyosarkome, pleomorphe Rhabdomyosarkome, pleomorphe Liposarkome, Myxofibrosarkome und schlecht differenzierte Sarkome weisen in der Regel ein komplexes genomisches Profil auf, das durch zahlreiche Gewinne oder Verluste von Genen mit einem häufigen Verlust von RB1 und Veränderungen von p53 gekennzeichnet sind (Chibon & Aurias, 2007).

Die Therapie besteht nach wie vor aus den drei Hauptsäulen Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie (Nowicki, et al., 2017) (Boxberg, et al., 2018).

Jedoch liegt das Gesamtüberleben (OS) beim rezidivierten Sarkom bei <12 Monaten (Kim, et al., 2016). Somit sind neuartige Therapien dringend von Nöten (Veenstra R., Kostine, Cleton-Jansen, de Miranda, & Bovée, 2018). Innerhalb der Sarkomtherapie wird sich deswegen auch zunehmend mit der Immuntherapie befasst (Que, et al., 2019) (Boxberg, et al., 2018).

Das Immunsystem übernimmt eine wichtige Kontroll- und Schutzfunktion bei der Bekämpfung von Krebszellen. Dieses erkennt rechtzeitig im gesunden Körper veränderte, krankhaft entstandene Zellen und kann diese eliminieren. Das Wachstum von Krebszellen wird somit eingedämmt. Gewisse Zelloberflächenproteine, wie die sogenannten Immuncheckpoints, sollen eine Über- oder Unteraktivierung unserer Immunzellen vermeiden und stellen dadurch ein natürliches Gleichgewicht des Immunsystems sicher. Es existieren jedoch Krebszellen, welche in der Lage sind, sich vor dem Immunsystem zu „verstecken“ und dadurch eine Reaktion des Immunsystems zu unterdrücken. In der Folge erkennt das Immunsystem diese „versteckten“ Krebszellen nicht und bekämpft diese nicht. Das Krebswachstum kann somit ungehindert vonstattengehen.

Nach der Entdeckung des programmierten Zelltodproteins 1 (PD-1) im Jahr 1992 wurde gezeigt, dass PD-1 und PD-L1 eine besondere Rolle bei der Krebs-Immunüberwachung spielen (Park, et al., 2018). PD-L1 (auch bekannt als B7-H1) ist ein Mitglied der B7-Familie. PD-L1 wird auf immunkompetenten Zellen wie T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen exprimiert (Que, et al., 2017) (D'Angelo, et al., 2015) (Paydas, Bagir, Deveci, & Gonlusen, 2016). Eine Überexpression von PD-L1 in Tumoren hemmt nachweislich die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen und induziert gleichzeitig Apoptose in den T-Effektorzellen, was zu verminderten Immunantworten und zur

Beeinträchtigung der schützenden Immunität gegen Krebs führt (Que, et al., 2017) (Kim, et al., 2013). Die Interaktion von PD-L1 und PD-1 gleicht dem sogenannten Schlüssel-Schloss Prinzip. Die Krebszellen besitzen den Immuncheckpoint-Eiweißstoff PD-L1 auf ihrer Zelloberfläche als „Schlüssel“. Die natürlichen Immunzellen besitzen hingegen den Immuncheckpoint-Eiweißstoff PD-1 auf ihrer Oberfläche, welcher als „Schloss“ fungiert. Durch diese Schlüssel-Schloss-Interaktion wird die Aktivität und Funktion der Immunzelle gehemmt. Es kommt zu einem „Tumorentkommen“ vor dem Immunsystem (D'Angelo, et al., 2015) (Boxberg, et al., 2018) (Sundara, et al., 2017).

Bei Sarkomen wurden in sieben früheren Studien berichtet, dass mehr als 50 % der Sarkome, darunter das Leiomyosarkom, das dedifferenzierte Liposarkom (DDLPS), das undifferenzierte pleomorphe Sarkom (UPS), das Osteosarkom, das Epitheloidsarkom und andere Sarkome, eine PD-L1-Expression in Tumorzellen aufwiesen (Park, et al., 2018). Um die PD-1/PD-L1 Achse therapeutisch zu nutzen, muss erreicht werden, dass die Interaktion von PD-L1 und PD-1 im Tumorgewebe verhindert wird. Dadurch sollte die Effizienz einer antitumoralen Entzündung verstärkt werden. Pembrolizumab stellt den ersten von der amerikanischen FDA zugelassenen Immuncheckpoint-Inhibitor dar.

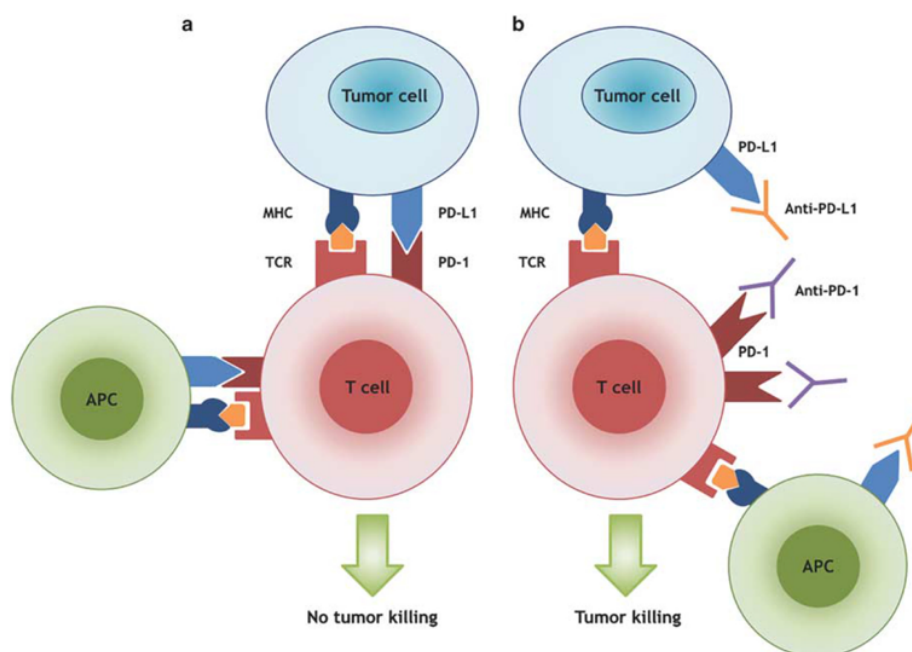


Abbildung 7: Schematischer Überblick über den Wirkungsmechanismus von Anti-PD-1- und Anti-PD-L1-Antikörpern (Veenstra R., Kostine, Cleton-Jansen, de Miranda, & Bovée, 2018)

Immuncheckpoint-Inhibitoren sind bereits bei einigen bösartigen Tumoren zugelassen. In der folgenden Abbildung werden zugelassene immunonkologische Therapien mit Checkpoint-Inhibitoren dargestellt.

Tab. 1 Zugelassene immunonkologische Therapien mit Checkpoint-Inhibitoren						
	Ipilimumab (Anti-CTLA4- Antikörper)	Nivolumab (Anti-PD1- Antikörper)	Pembrolizumab^c (Anti-PD1- Antikörper)	Atezolizumab (Anti-PD-L1- Antikörper)	Durvalumab (Anti-PD-L1- Antikörper)	Avelumab (Anti-PD-L1- Antikörper)
Melanom						
1L	+	+	+			
2L	+ (auch in Kombi- nation mit Nivolu- mab)	+	+			
NSCLC						
1L			+ ^d			
2L		+	+	+	+ ^{a,f}	
Nierenzellkarzinom						
1L	+ (mit Nivolumab) ^a	+ ^a	+ ^a			
2L		+	+			
Urothelkarzinom						
1L			+ ^e	+ ^e		
2L		+	+	+	+ ^a	+ ^a
Kopf-Hals-Tumoren						
2L		+	+			
Klassischer Morbus Hodgkin						
3L		+	+			
Merkelzellkarzinom						
1L						+
Magen-/ÖGJ-Karzinome						
3L			+ ^a			
MSI kolorektales Karzinom						
2L	+ (mit Nivolumab) ^b	+ ^a	+ ^a			
MSI-Karzinome, allgemein						
2L			+ ^a			
Metastasiertes Zervixkarzinom						
2L			+ ^a			
PMLBL						
3L			+ ^a			
Hepatozelluläres Karzinom						
2L		+ ^a				

Zulassungsstatus immunonkologischer Therapeutika (Stand: 7/2018). Die Zulassungen sind hier nur kursiv angegeben und vielfach an weitere Vorbedingungen geknüpft, v.a. bestimmte Vorbehandlungen
1L Erstlinientherapie, **2L** Zweitlinientherapie, **3L** ab Drittlinientherapie, **NSCLC** nichtkleinzelliges Lungenkarzinom, **MSI** mikrosatelliteninstabil, **ÖGJ** ösophago-gastrale Junktion, **CTLA4** „cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4“, **PD-L1** „programmed cell death ligand 1“, **PMLBL** Primär mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom
^aBislang nur FDA-Zulassung (U.S. Food and Drug Administration; Zulassungsbehörde der USA)
^bDerzeit beschleunigtes Zulassungsverfahren der FDA für Low-dose-Ipilimumab in Kombination mit Nivolumab
^cViele Zulassungen für Pembrolizumab basieren auf der PD-L1-Expression als Biomarker; s. **Tab. 2** für weitere Details
^dZulassung durch die FDA auch ohne PD-L1-Testung in Kombination mit Chemotherapie
^eFür Patienten, bei denen eine Cisplatin-Therapie nicht durchgeführt werden kann; PD-L1-Test muss positiv sein
^fErhaltungstherapie für nichtresektable Stadium-III-Tumoren nach Radiochemotherapie
 Quellen: [1, 29]

Tabelle 2 Indikation für Checkpoint Inhibitor Therapie (Schildhaus, 2018)

Jedoch können diese Immuncheckpoint-Inhibitoren autoimmune Nebenwirkungen hervorrufen, welche durch eine Aktivierung von T-Lymphozyten mit einer Infiltration des entsprechenden Organs begünstigt wird. Zu den häufigen Nebenwirkungen gehören die Kolitis, Hepatitis, kutane Nebenwirkungen, Endokrinopathien (Thyreoiditis oder Hypophysitis) und seltener (Kardio-) Myositiden und neurologische Nebenwirkungen. Allerdings kann der frühzeitige Einsatz von Glukokortikoiden autoimmune Nebenwirkungen verkürzen und Komplikationen, wie zum Beispiel die Darmperforationen, verhindern (Heinzerling, de Toni, Schett, Hundorfean, & Zimmer, 2019).

Der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren wird derzeit auch bei Sarkomen evaluiert, wenn auch bisher ohne durchschlagenden Erfolg. Die folgende Darstellung gibt einen Überblick über aktuelle Studien zur Wirkung von Immuncheckpoint-Inhibitoren auf unterschiedliche Sarkom-Typen.

Pubmed	Autor	Entität	Pembrolizumab
31395100	Florou et al.	Angiosarkom	+
31078463	Wilky et al.	Alveoläres Weichteilsarkom	+
28988646	Tawbi et al.	Undifferenziertes pleomorphes Sarkom	++
28988647	Tawbi et al.	Liposarkom	++
28988648	Tawbi et al.	Synovialsarkom	++
28988649	Tawbi et al.	Leiomyosarkom	-
28988650	Tawbi et al.	Osteosarkom	++
28988651	Tawbi et al.	Chondrosarkom	++
31741767	Klein et al.	Ewingsarkom	-
31741768	Klein et al.	Undifferenziertes pleomorphes Sarkom	+++
31348579	Tamura et al.	Liposarkom	-
31348579	Tamura et al.	Leiomyosarkom	-
31348579	Tamura et al.	Myofibrosarkom	-
31348579	Tamura et al.	Undifferenziertes pleomorphes Sarkom	-
31348579	Tamura et al.	Angiosarkom	-
30194084	Galanina et al.	Kaposi Sarkom	+++
30006421	Saller et al.	Kaposi Sarkom	+
28228279	George et al.	Leiomyosarkom	+++
partial response: +			
objective response: ++			
complete response: +++			
no response: -			

Tabelle 3 Studien zum Immuncheckpoint-Inhibitor-Einsatz bei unterschiedlichen Sarkomentitäten

Neue Erkenntnisse brachte die ASCO (American Society of Clinical Oncology) Jahrestagung von 2019 in Bezug auf den Erfolg von Immuncheckpoint-Inhibitoren. Die größte veröffentlichte klinische Phase-II-Studie wurde von der „Sarcoma Alliance for Research through Collaboration“ (SARC) Studiengruppe durchgeführt (Kasper, 2019). Es wurden insgesamt 80 Patienten mit Weichteilsarkomen und Knochensarkomen aus 12 teilnehmenden Zentren mit dem PD1-Inhibitor Pembrolizumab behandelt, bei der die Ansprechrate der primäre Endpunkt war. Hinzugezogen wurden 40 Patienten mit Weichteilsarkomen (je 10 Patienten mit Leiomyosarkom, Liposarkom, Synoviasarkom und undifferenziertem pleomorphem Sarkom) sowie 40 Patienten mit Knochensarkomen (22 Patienten mit Osteosarkom, 13 mit Ewing-Sarkom und 5 mit Chondrosarkom) (Kasper, 2019). Die Gesamtansprechrate der 40 Patienten mit Weichteilsarkomen betrug 18 %. Die Heterogenität der Weichgewebesarkome in Bezug auf die Biologie und das Ansprechen auf die systemische Behandlung gewann erneut an Bedeutung, da die Ansprechraten je nach Sarkom-Subtyp unterschiedlich ausfielen. Eine äußerst gute Ansprechrate von 40 % ergab sich für die Kohorte der undifferenzierten pleomorphen Sarkome (UPS) und eine überdurchschnittlich günstige Ansprechrate von 20 % stellte sich für die Gruppe der Liposarkome dar. Durch die Aufnahme weiterer 30 Patienten in jede dieser beiden Kohorten wurde in der Subgruppe der UPS eine Gesamtansprechrate von 23 % (9/40) und in der Kohorte der Liposarkome eine Gesamtansprechrate von 10 % (4/39) erzielt. Das mediane PFS (progression free survival) betrug bei den UPS drei Monate und bei den Liposarkomen zwei Monate (Kasper 2019). Besonders bedeutsam sind potenziell prädiktive, molekulare Marker für das mögliche Therapieansprechen und die Bewertung der optimalen Behandlungskombinationen von Checkpoint-Inhibitoren mit Chemotherapie, Strahlentherapie oder „targeted therapies“ (Kasper 2019). Die Expression von PD-L1 durch Tumorzellen und Tumor-assoziierte Entzündungszellen gelten als wichtige prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf Checkpoint-Inhibitoren. Weitere potenzielle Biomarker sind die Quantifizierung tumorinfiltrierender Lymphozyten und die sogenannte Mutationslast (mutational burden) (He, et al., 2020) (Grünwald, et al., 2020) (Keung, et al., 2020) (Cohen, Eleyan, Zick, Peretz, & Katz, 2018).

Material und Methoden

1.1 Die Tissue Microarray Methode

Das Tissue Microarray Verfahren wurde 1998 erstmals von Kononen et al. beschrieben (Kononen, et al., 1998). Es handelt sich um eine Methode, welche die gleichzeitige Untersuchung von hunderten Tumoren auf einen einzigen Objektträger erlaubt und damit Gewebeuntersuchungen mittels in situ Methoden massiv beschleunigt und ökonomisiert. Diese Vorteile entfalten allerdings erst dann ihre Wirkung, wenn die Tissue Microarrays physisch vorliegen. Die Herstellung von Tissue Microarrays ist jedoch mit einem erheblichen Aufwand verbunden. Zunächst müssen potenziell für eine Studie in Betracht kommende Gewebe identifiziert werden. Danach müssen die entsprechenden Schnitte aus Archiven geholt werden und von einem Pathologen bezüglich für den Zweck der TMA-Herstellung nutzbarem Tumorgewebe evaluiert werden. Für Tissue Microarrays ist es notwendig, dass zumindest ein Bereich eines Gewebeschnittes eine dichte Tumordurchsetzung aufweist und frei von Nekrosen ist. Die optimalen Tumorareale werden bei jedem Tumor auf dem bestmöglichen Schnitt markiert. Danach werden die entsprechenden Gewebeblöcke herausgesucht (Dancau, Simon, Mirlacher, & Sauter, 2016). Die Organisation eines Tissue Microarrays erfolgt am Universitätsklinikum Eppendorf gemäß einem standardisierten Vorgehen. Ein Gewebeschnitt wird in 6 Sektoren eingeteilt, welche durch Großbuchstaben definiert sind (A-F), wobei die Sektoren aus Gründen der Orientierbarkeit unterschiedlich groß sind. Innerhalb jedes Sektors werden die Zeilen mit Zahlen von 1-9 und die Spalten mit Kleinbuchstaben (a-r) markiert. Der Aufbau eines UKE-Tissue Microarrays ist in Abbildung 8 und 9 dargestellt.

SAR 2.2 A

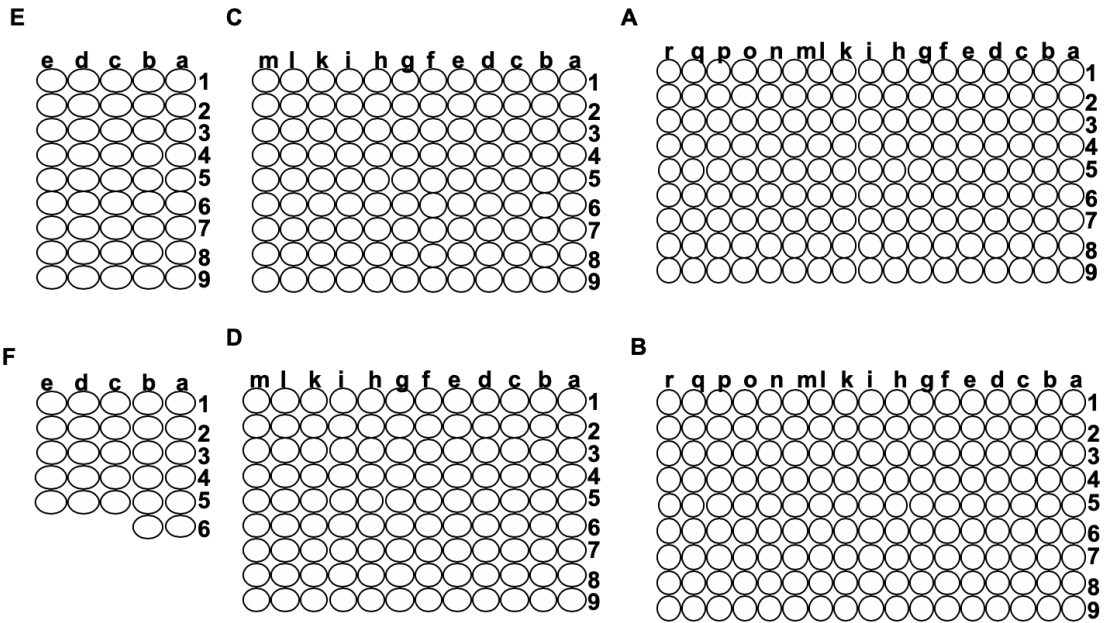


Abbildung 8 zeigt die Koordinaten des TMAs SAR 2.2 A zur Auswertung der einzelnen Gewebesports

SAR 2.2 B

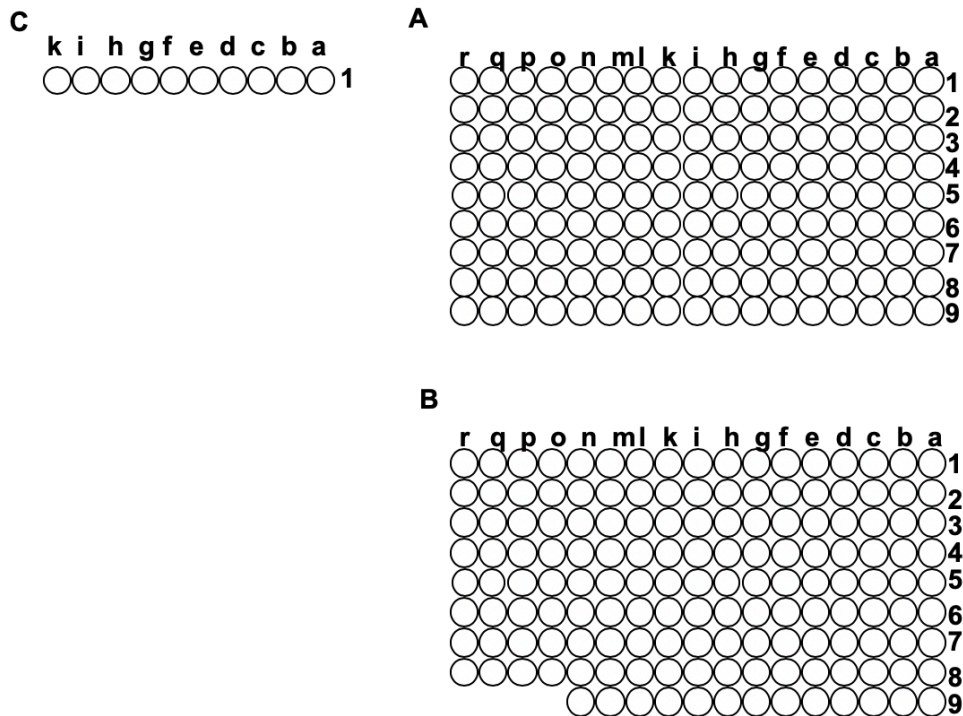


Abbildung 9 zeigt die Koordinaten des TMAs SAR 2.2 B zur Auswertung der einzelnen Gewebesports

An den durch dieses System definierten Positionen eines leeren Paraffinblocks werden mittels eines Bohrers (Durchmesser 0,6mm) Löcher gebohrt. In diese Löcher werden Tumorgewebezyylinder gesetzt, welche vorher mit einer Hohlzylinder aus einem vordefinierten Tumorblock entnommen worden waren (innerer Durchmesser 0,6mm) (Bubendorf, Nocito, Moch, & Sauter, 2001). Die Bohrung von Löchern, die Entnahme und Umsetzung von Tumorgewebszylinder und das automatische Ausschalen der nächsten definierten Koordinaten erfolgt mit einem von UKE Mitarbeitern hergestellten halbautomatischen Gerät (Abbildung 10).

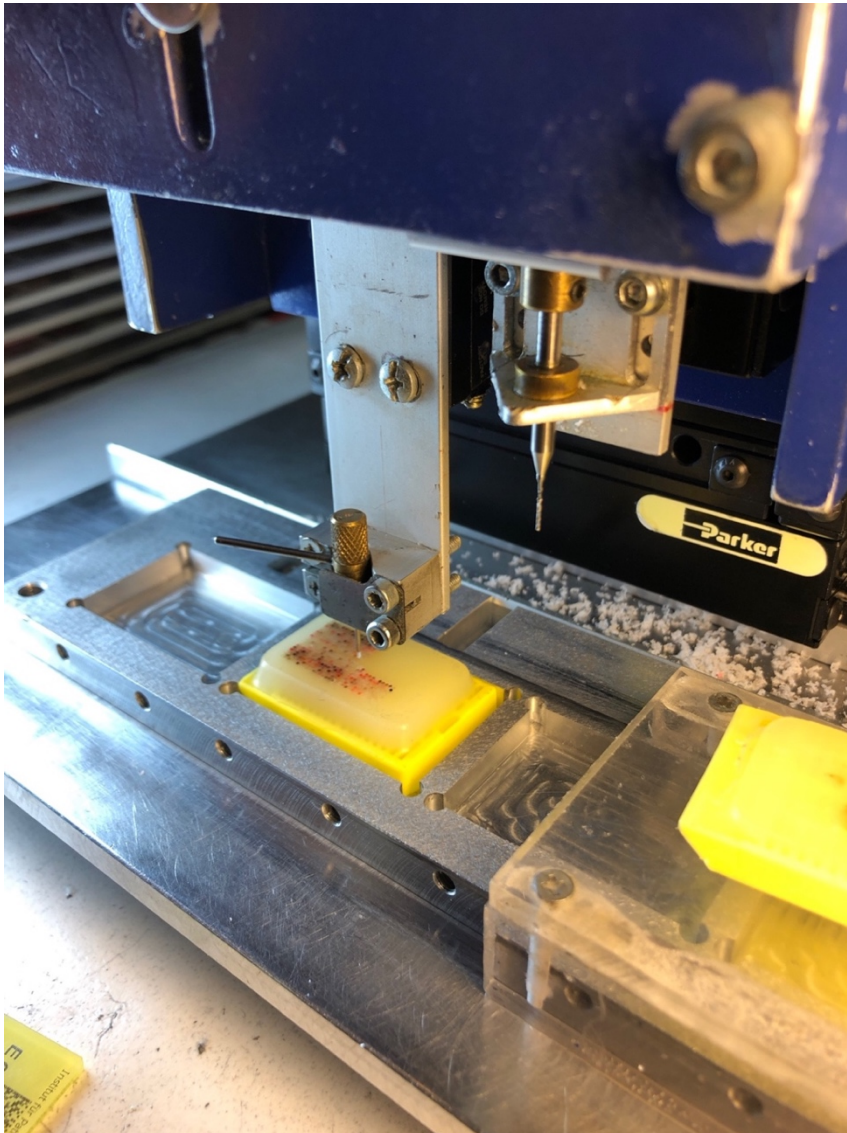


Abbildung 10: Stanzvorgang mittels eines halbautomatischen Geräts

Sind alle Positionen eines Tissue Microarray Blocks durch Tumorzylinder gefüllt, können vom fertigen Tissue Microarray Block 2,5 µm dicke Schnitte hergestellt werden, welche für die immunhistochemische Analysen oder anderen in Situ Methoden verwendet werden können.

Es ist ein wesentlicher Vorteil der Tissue Microarray Methode, dass Vorgaben des Datenschutzes praktisch automatisch erfüllt werden. Potenziell Patienten identifizierende Merkmale, wie die Biopsienummer der Pathologie, sind nur während der Herstellungsphase des Tissue Microarrays erforderlich, in einer Zeit wo die Gewebeblöcke und Schnitte mit den Einsende-Nummern für die Herstellung des TMAs zusammensortiert werden. Ist der Tissue Microarray erst erstellt, sind die klinischen und histopathologischen Parameter mit einer bestimmten Koordinate des TMAs verbunden und die ursprünglich benötigten Patienteninformationen (Biopsienummer) können entweder für ein Forschungsprojekt ausgeblendet werden (Pseudonymisierung) oder permanent gelöscht werden (Anonymisierung) (Bubendorf, Nocito, Moch, & Sauter, 2001). Ein Beispiel eines zu einem Tissue Microarray gehörenden Datenfall mit klinisch pathologischen Parametern ist in Abbildung 11 und 12 dargestellt.

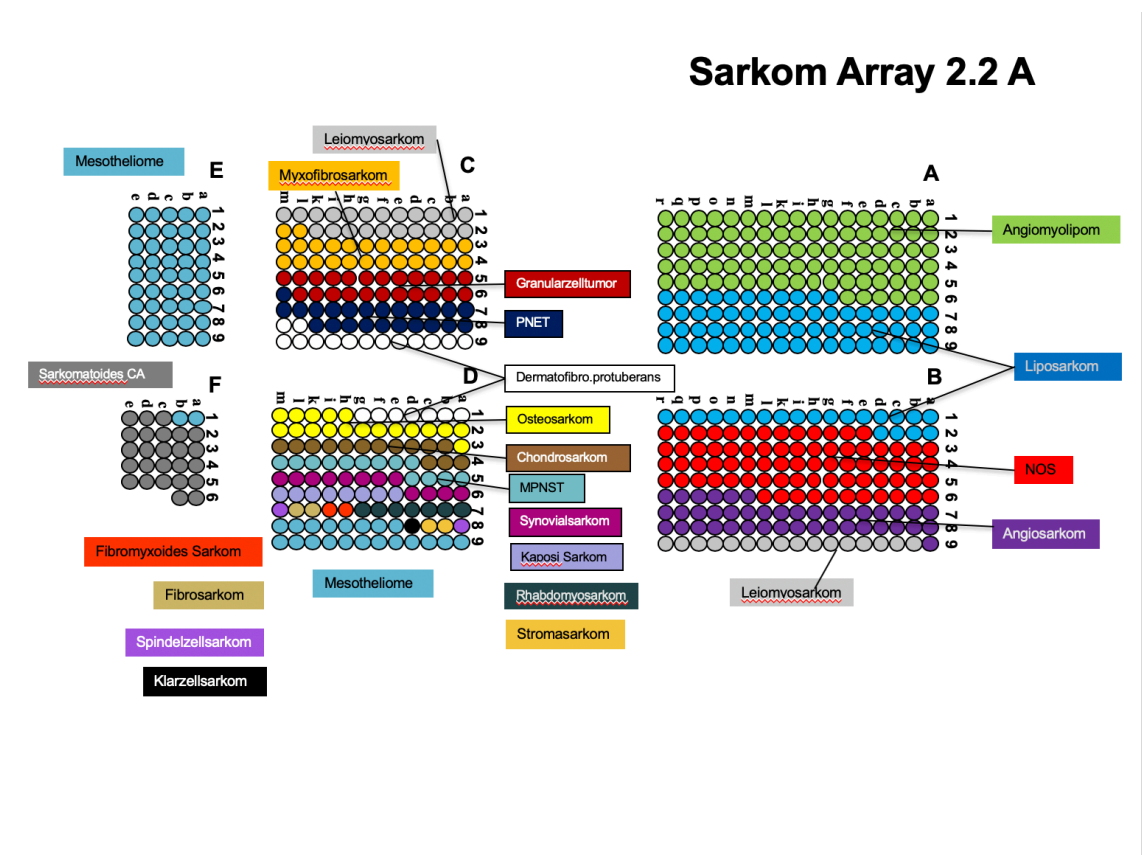


Abbildung 11 zeigt den Sarkom Array 2.2 A mit zugehörigen klinisch pathologischen Parametern

Sarkom Array 2.2 B

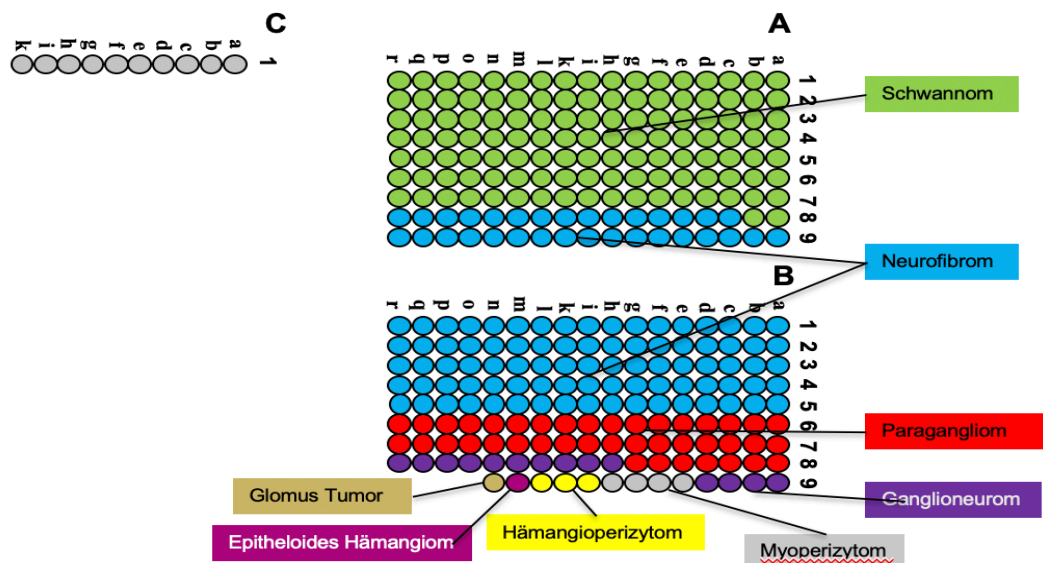


Abbildung 12 zeigt den Sarkom Array 2.2 B mit zugehörigen klinisch pathologischen Parametern

1.2 Herstellung eines Sarkom Tissue Microarrays

Für die Herstellung eines Sarkom Tissue Microarrays wurde zunächst die Nexus Datenbank des Pathologie Informationssystems mit verschiedenen Suchabfragen bedient, welche die Stichworte „Sarkom“ bzw. „Angiomyolipom“, „Angiosarkom“, „Chondrosarkom“, „Dermatofibrosarkoma protuberans“, „Epitheloides Hämangiom“, „Fibromyxoides Sarkom“, „Fibrosarkom“, „Ganglioneurom“, „Glomus Tumor“, „Granularzelltumor“, „Hämangioperizytom“, „Kaposi Sarkom“, „Klarzellsarkom“, „Leiomyosarkom“, „Liposarkom“, „Mesotheliom“ (epitheloid und anderer Typ), „MPNST“, „Myofibrosarkom“, „Myoperizytom“, „Neurofibrom“, „NOS“, „Osteosarkom“, „Paragangliom“, „PNET“, „Rhabdomyosarkom“, „Sarkomatoides Karzinom“, „Schwannom“, „Spindelzellsarkom“, „Stromasarkom“ und „Synovialsarkom“ verwendet. Die Suche ergab ca. 3000 Treffer. Die entsprechenden Befunde wurden ausgedruckt und zunächst aufgrund der Aktenlage auf Nutzbarkeit für einen Tissue Microarray sortiert. Dabei wurden sehr kleine Biopsien oder am Ende nicht eindeutige Diagnosen bzw. sehr kleine Tumoren (<1cm) eliminiert.

Von den verbleibenden 1.062 Tumoren, wurden die Schnitte aus dem Archiv herausgeholt und von Pathologen beurteilt. Bei 823 dieser Tumoren konnte ausreichend großes repräsentatives Tumormaterial identifiziert werden, welches sich für die Herstellung eines TMAs eignete. Von diesen Tumoren wurden die entsprechenden Blöcke herausgesucht (Abbildung 13).



Abbildung 13 Herausgesuchte Blöcke und Schnitte aus dem Archiv des Universitätsklinikum Eppendorf

Die Zusammensetzung der Diagnosen der 823, am Ende als geeignet klassifizierten, Tumoren ist in Tabelle 4 dargestellt.

Die Tumoren wurden nach Diagnosen sortiert, in einem TMA eingebracht, welcher in achtfacher Ausfertigung hergestellt wurde. Wegen einer prinzipiell ähnlichen Morphologie wurden auch 25 sarkomatoide Karzinome der Harnblase

und 51 Mesotheliome der Pleura in das Projekt und damit dem TMA miteingeschlossen.

Entität	n
Angiomyolipom	89
Angiosarkom	37
Chondrosarkom	7
Dermatofibrosarcoma protuberans	20
Epitheloides Hämangiom	1
Fibromyxoides Sarkom	1
Fibrosarkom	2
Ganglioneurom	14
Glomus Tumor	1
Granularzelltumor	18
Hämangioperizytom	3
Kaposi Sarkom	8
Klarzellsarkom	1
Leiomyosarkom	35
Liposarkom	73
Mesotheliom-anderer Typ	22
Mesotheliom-epitheloid	29
MPNST	12
Myxofibrosarkom	26
Myoperizytom	4
Neurofibrom	115
NOS	70
Osteosarkom	13
Paragangliom	41
PNET	20
Referenzgewebe Haut	2
Referenzgewebe Leber	2
Referenzgewebe Lymphknoten	2
Referenzgewebe Niere	2
Referenzgewebe Prostata	2
Rhabdomyosarkom	7
Sarkomatoides Karzinom	25
Schwannom	115
Spindelzellsarkom	2
Stromasarkom	1
Synovialsarkom	11

Tabelle 4 zeigt die Entitäten mit ihrer entsprechenden Anzahl

1.3 Immunhistochemie

Für alle immunhistochemischen Untersuchungen wurden 2,5 µm dicke Schnitte des Sarkom Tissue Microarrays hergestellt, welche innerhalb von wenigen Tagen nach der Herstellung auch immunhistochemisch gefärbt wurden. Zur Vorbereitung wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert (3x für je 5 min) und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70%) rehydriert. Für die PD-L1 Immunhistochemie wurde der Antikörper E1L3N (Kaninchen monoklonal, Kat. Nr. 13684, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Antigendemaskierung und Immunfärbung wurden in einem Färbeautomaten der Firma Invitrogen/Dako (DAKO PT-Link und Link 48) durchgeführt. Die Schnitte wurden in einem speziellen Puffer zur Lösung von Proteinquervernetzungen (Dako Antigen Retrieval Buffer pH9) bei 98°C behandelt, anschließend für 5 Minuten die endogene Peroxidase blockiert (Dako, Envision Flex-Kit 8002) und anschließend mit der Antikörperlösung bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurden ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt (DAKO EnVision Flex-Kit 8002 für 20 Minuten) und als Substrat für die Peroxidase DAB-Chromogen (DAKO EnVision Flex-Kit 8002) für 10 Minuten hinzugegeben. Die Gegenfärbung des Gewebes erfolgte mit Hämatoxylin (DAKO K8008) für 5 Minuten. Die PD-L1 Auswertung erfolgte semiquantitativ durch einen Pathologen (Professor G. Sauter), der von jedem Tumor den prozentuellen Anteil positiver Tumorzellen bestimmte und die Intensität der festgestellten Färbung in einer dreistufigen Skala (0, 1+, 2+, 3+) klassifizierte. Gleichzeitig wurde der prozentuale Anteil der PD-L1 positiven Entzündungszellen festgelegt.

Für die CD8 Immunhistochemie wurde der Antikörper Anti-CD8 (Oncodiano, Maus, Klon TC8) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Die weitere Färbung erfolgte analog zum PD-L1-Protokoll. Antigendemaskierung und Immunfärbung wurden in einem Färbeautomaten der Firma Invitrogen/Dako (DAKO PT-Link und Link 48) durchgeführt. Die Schnitte wurden in einem speziellen Puffer zur Lösung von Proteinquervernetzungen (Dako Antigen Retrieval Buffer pH9) bei 98°C behandelt, anschließend für 5 Minuten die endogene Peroxidase blockiert (Dako, Envision Flex-Kit 8002) und anschließend mit der Antikörperlösung bei

Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurden ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt (DAKO EnVision Flex-Kit 8002 für 20 Minuten) und als Substrat für die Peroxidase DAB-Chromogen (DAKO EnVision Flex-Kit 8002) für 10 Minuten hinzugegeben. Die Gegenfärbung des Gewebes erfolgte mit Hämatoxylin (DAKO K8008) für 5 Minuten. Die Auswertung der CD8 positiven Lymphozyten erfolgte mittels digitaler Bildanalyse. Digitale Bilder von gefärbten Objektträgern wurden mit dem automatischen Mikroskop Aperio VERSA 8 von Leica aufgenommen. TMA-Spots wurden automatisch identifiziert und unter Verwendung der Software HALOTM (Indica Labs, USA) gemäß dem folgenden Verfahren analysiert. Jeder TMA-Objektträger wurde bei 40-facher Vergrößerung gescannt und durch die Software segmentiert, um einzelne Gewebepunkte zu identifizieren. Bei Bedarf wurde die Segmentierung manuell korrigiert. Das HALO-Membran-IHC-Quantifizierungsmodul wurde verwendet, um die Anzahl von CD8 positiven Zellen in jedem Gewebespot zu bestimmen und die exakte Fläche jedes Gewebespots zu messen. Der letztere Schritt wurde durchgeführt, um Fehler durch ungleichmäßige oder unvollständige Gewebespots (Durchschnitt: 0,327 mm²) zu vermeiden. Die Anzahl der gefärbten Zellen und die Fläche in Quadratmillimetern jedes einzelnen Flecks wurden verwendet, um die Dichte der gefärbten Zellen / mm² (Anzahl der Zellen pro Quadratzentimeter) zu berechnen.

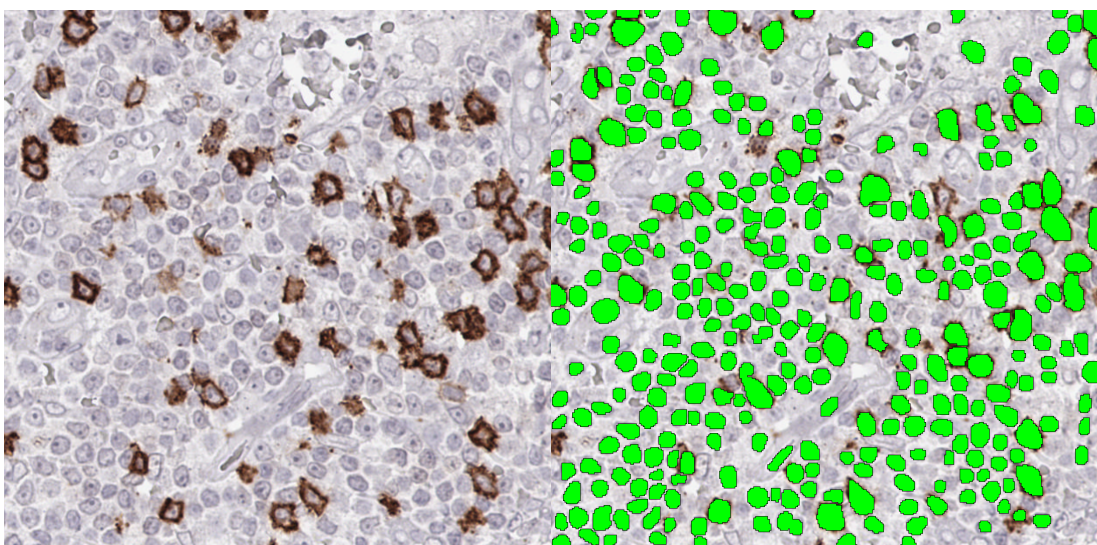


Abbildung 14: CD8 Hellfeld Färbung und Detektion der Zellen durch eine künstliche Intelligenz

1.4 Statistik

Für die Klärung der Beziehung zwischen dem PD-L1 Status (Tumorzellen, Entzündungszellen, kombiniert) und kategorischen Parametern (pT, histologischer Tumortyp, R-Status, N-Status) wurden Chi-Quadrat-Tests oder Mehrfeldertest durchgeführt. Zur Analyse der Beziehung zwischen kategorischen und kontinuierlichen Variablen (CD8-Dichte) wurde ein t-Test durchgeführt. p-Werte von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Ergebnisse

1.5 PD-L1

Eine PD-L1 Anfärbung in Tumorzellen fand sich ausschließlich in malignen Tumoren. Demensprechend war der Unterschied zwischen benignen und malignen Tumoren bei jedem der 4 verwendeten Cutoffs statistisch signifikant (Tabelle 5, $p < 0,005$).

		n	Anteil PD-L1 positive Tumoren							
			cutoff 1%	P	cutoff 5%	P	cutoff 10%	P	cutoff 50%	P
Tumor Typ	benigne	398	0.0	<0.0001	0.0	<0.0001	0.0	<0.0001	0.0	0.0011
	maligne	349	4.3		4.3		3.2		2.0	

Tabelle 5: PD-L1 Status in Tumorzellen vs Dignität

Die Ergebnisse sind aufgeschlüsselt auf die einzelnen Tumortypen in Tabelle 6 für die Cutoffs von 1%, 5%, 10%, und 50% dargestellt.

Entität	n	cutoff $\geq 1\%$	cutoff $\geq 5\%$	cutoff $\geq 10\%$	cutoff $\geq 50\%$
		pos (%)	pos (%)	pos (%)	pos (%)
Angiomyolipom	89	0.0	0.0	0.0	0.0
Angiosarkom	37	8.1	8.1	8.1	2.7
Chondrosarkom	7	14.3	14.3	14.3	0.0
Dermatofibrosarcoma protuberans	20	0.0	0.0	0.0	0.0
Epitheloides Hämangiom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Fibromyoides Sarkom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Fibrosarkom	2	0.0	0.0	0.0	0.0
Ganglioneurom	14	0.0	0.0	0.0	0.0
Glomus Tumor	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Granularzelltumor	18	0.0	0.0	0.0	0.0
Hämangioperizytom	3	0.0	0.0	0.0	0.0
Kaposi Sarkom	8	0.0	0.0	0.0	0.0
Klarzellsarkom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Leiomyosarkom	35	2.9	2.9	0.0	0.0
Liposarkom	73	2.7	2.7	2.7	2.7
Mesotheliom-anderer Typ	22	18.2	18.2	13.6	4.5
Mesotheliom-epitheloid	29	10.3	10.3	10.3	3.4
MPNST	12	0.0	0.0	0.0	0.0
Myofibrosarkom	26	0.0	0.0	0.0	0.0
Myoperizytom	4	0.0	0.0	0.0	0.0
Neurofibrom	115	0.0	0.0	0.0	0.0
NOS	70	10.0	10.0	5.7	4.3
Osteosarkom	13	0.0	0.0	0.0	0.0
Paragangliom	41	0.0	0.0	0.0	0.0
PNET	20	0.0	0.0	0.0	0.0
Rhabdomyosarkom	7	0.0	0.0	0.0	0.0
Sarkomatoides Karzinom	25	48.0	48.0	44.0	16.0
Schwannom	115	0.0	0.0	0.0	0.0
Spindelzellsarkom	2	50.0	50.0	50.0	50.0
Stromasarkom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Synovialsarkom	11	0.0	0.0	0.0	0.0

Tabelle 6: PD-L1 Positivität in Tumorzellen

Diese Darstellung macht deutlich, dass in den meisten PD-L1 positiven Fällen mindestens 5% der Tumorzellen positiv waren. Fälle mit mehr als 50% PD-L1 positiven Tumorzellen fanden sich aber immerhin bei 4 Sarkomtypen (Angiosarkom, Liposarkom, Sarkom NOS, Spindelzellsarkom). Zudem fanden sich auch bei den sarkomatoiden Karzinomen und den Mesotheliomen mehrere Fälle mit einer PD-L1 Positivität in >50% der Fälle. Repräsentative Beispiele einer PD-L1 Positivität in Tumorzellen bei Sarkomen, sarkomatoiden Karzinomen und Mesotheliomen sind in den Abbildungen 15-23 dargestellt.

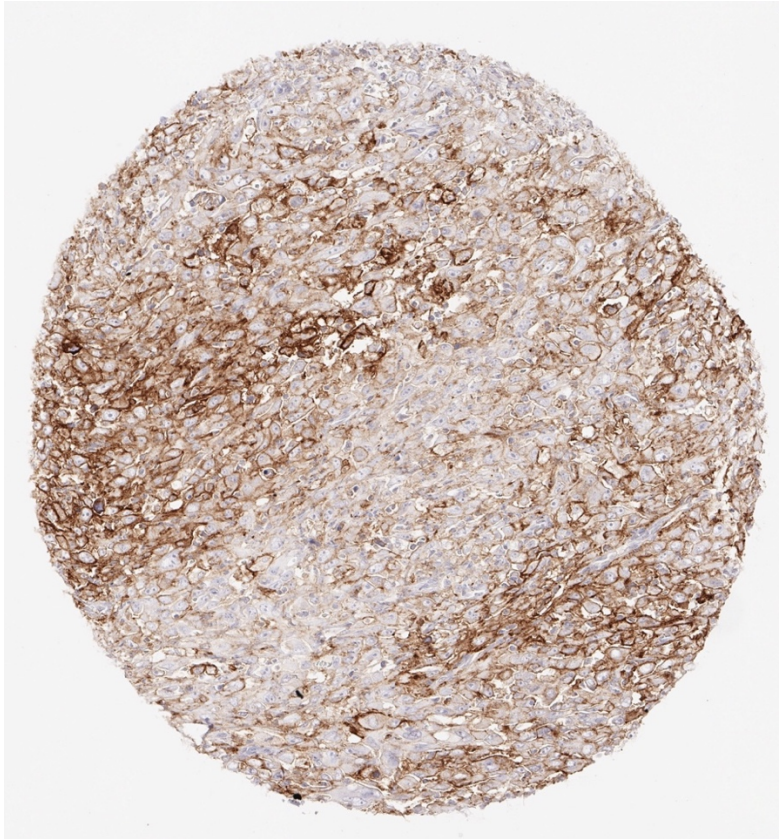


Abbildung 15: Kräftige PD-L1 Expression in der Mehrzahl der Tumorzellen eines Angiosarkoms.

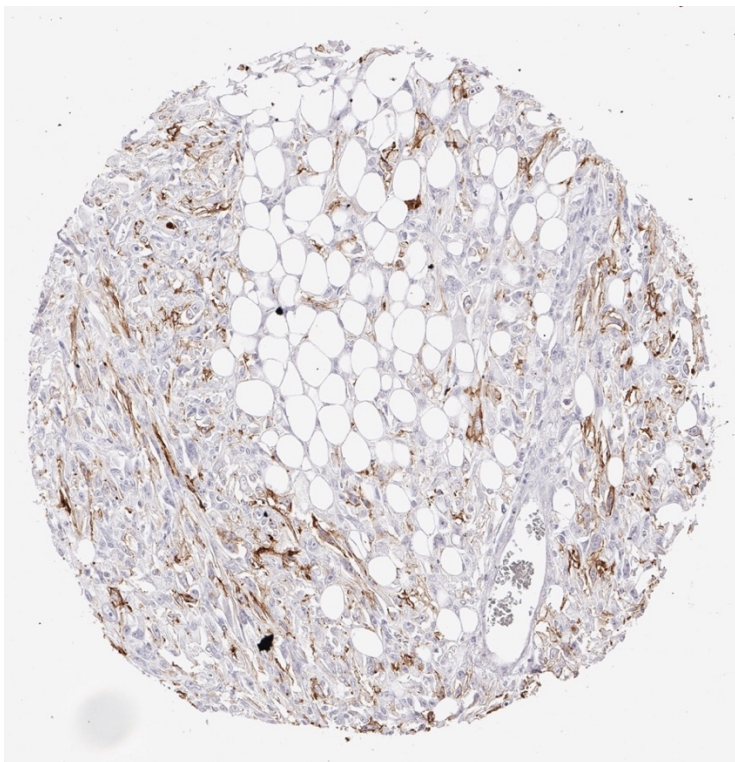


Abbildung 16: PD-L1 Positivität in ca. 20% der Tumorzellen eines Liposarkoms. Zusätzlich sind PD-L1 positive Makrophagen erkennbar

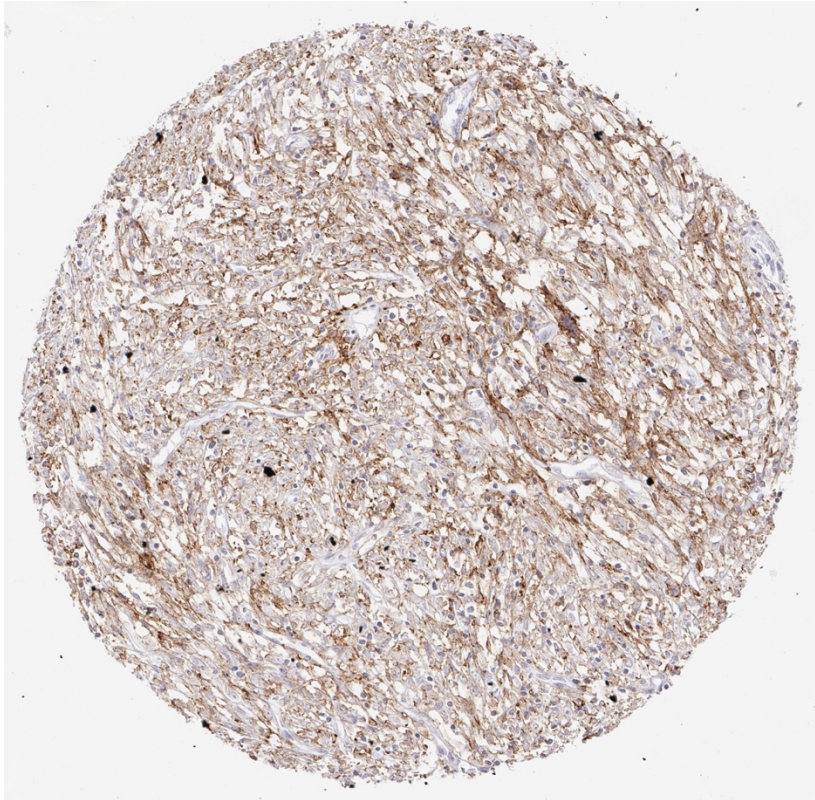


Abbildung 17: Diffuse PD-L1 Positivität der Tumorzellen eines Liposarkoms

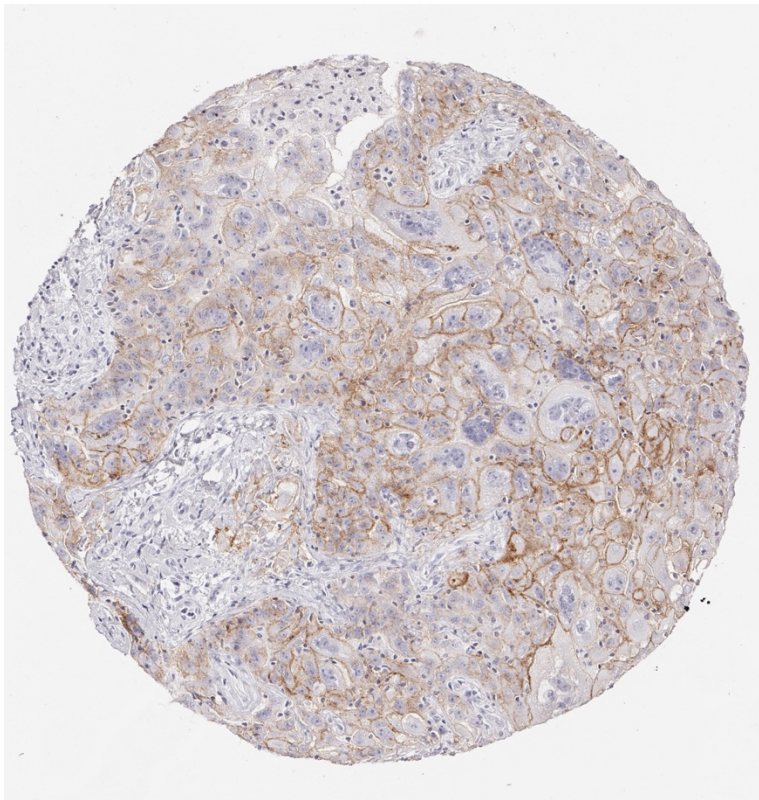


Abbildung 18: Schwache bis mäßig starke PD-L1 Positivität der überwiegenden Mehrzahl der Tumorzellen eines malignen Mesothelioms

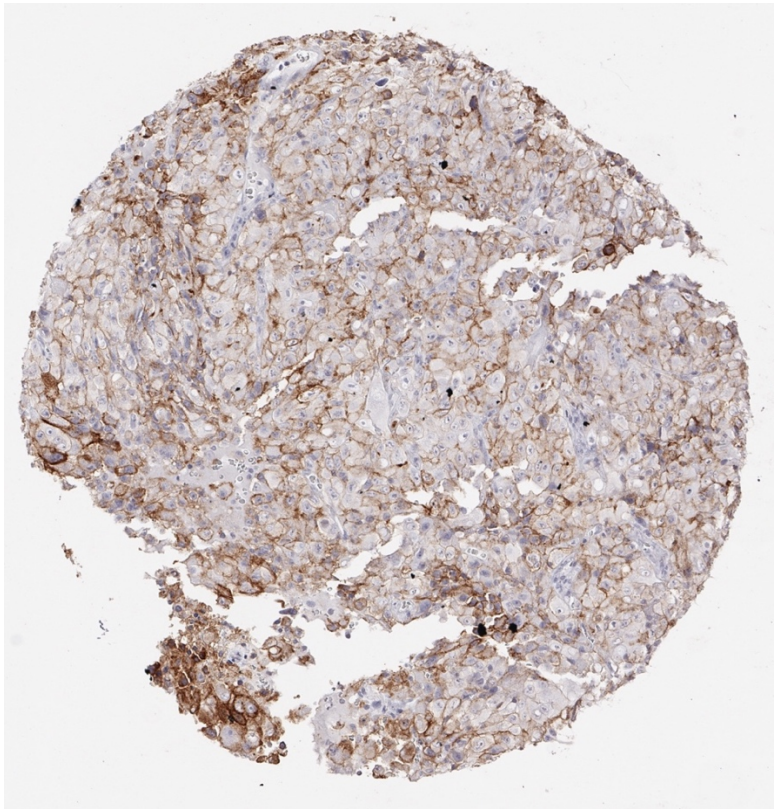


Abbildung 19: Malignes Mesotheliom mit mäßig starker membranöser PD-L1 Positivität bei der Mehrzahl der Tumorzellen

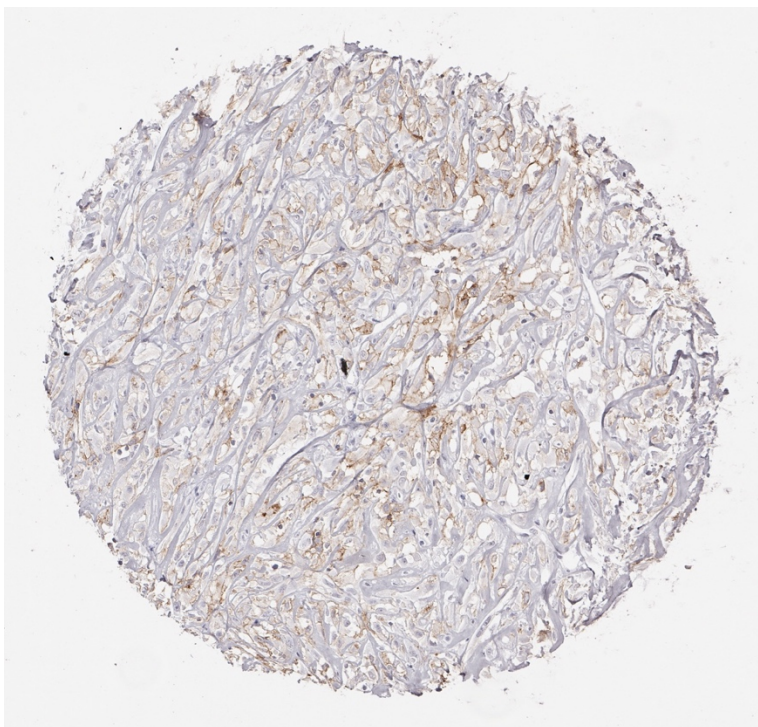


Abbildung 20: Schwache aber eindeutig erkennbare membranöse PD-L1 Positivität in mindestens 30% der Tumorzellen eines malignen Mesothelioms

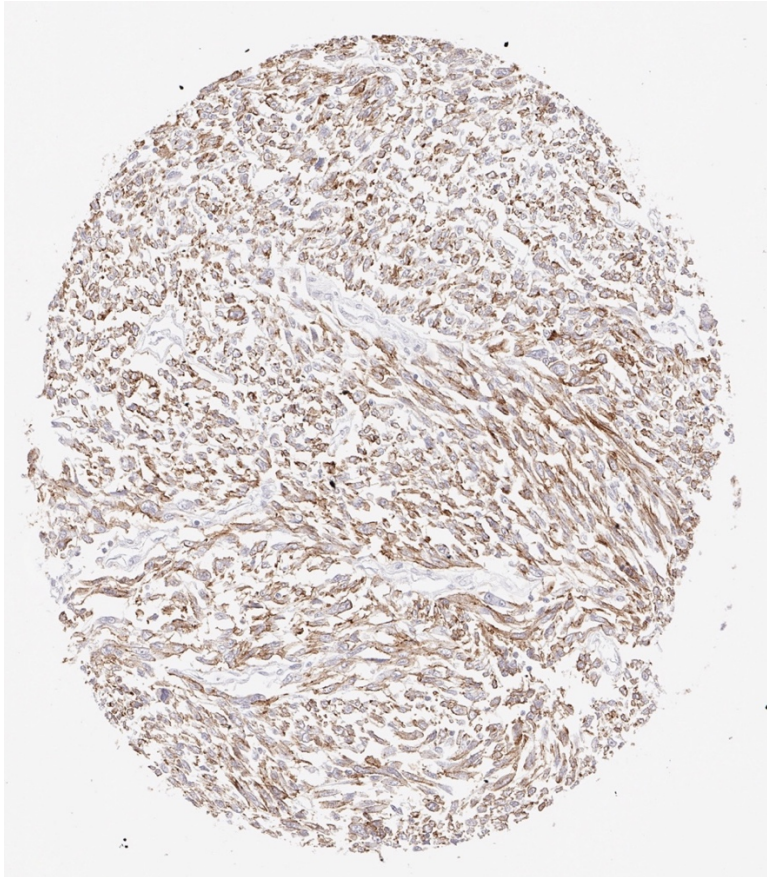


Abbildung 21: Schwache membranöse PD-L1 Positivität in 100% der Tumorzellen eines Sarkoms NOS

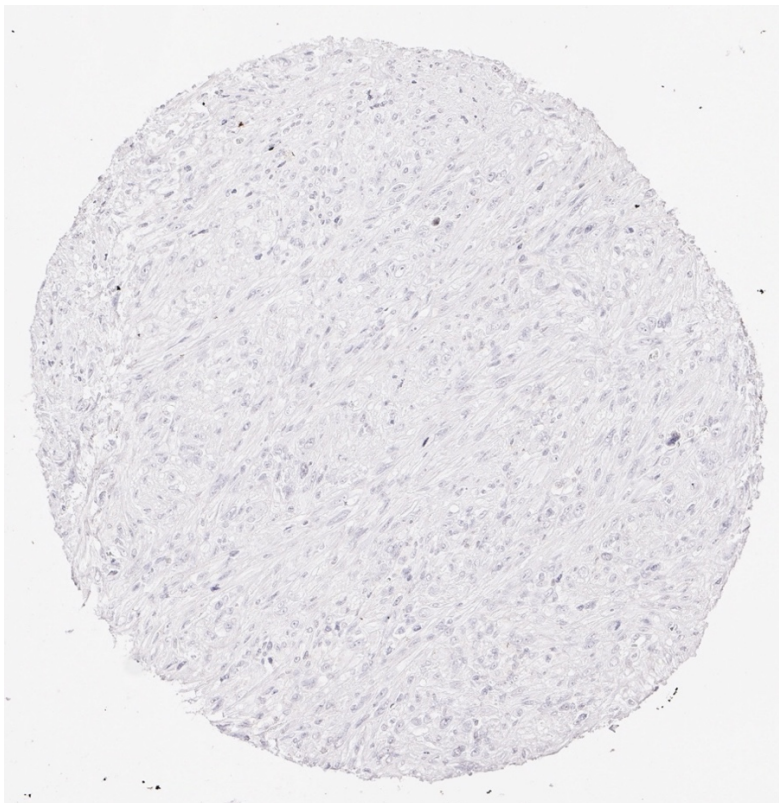


Abbildung 22: PD-L1 negatives Sarkom NOS

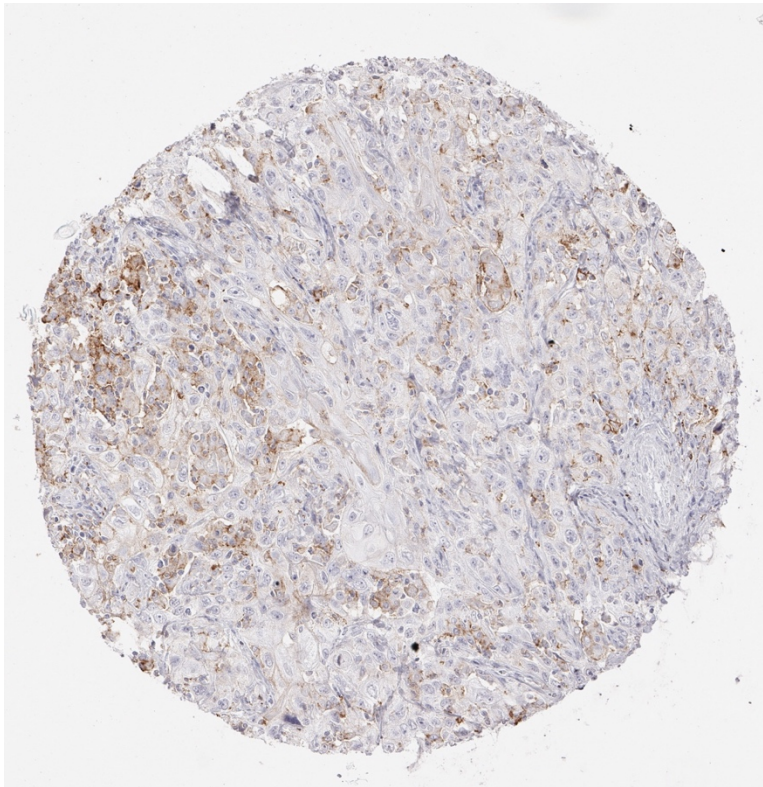


Abbildung 23: Sarkomatoides Urothelkarzinom mit schwacher membranöser PD-L1 Positivität von ca. 40% der Tumorzellen

Der Vergleich von PD-L1 Status (in Tumorzellen) mit pT-Stadium, Differenzierungsgrad, Nodalstatus und Zustand des Resektionsrandes konnte nur bei 3-120 Tumoren durchgeführt werden, von denen diese Angaben vorlagen (Tabelle 7).

	n	PD-L1 Positiv							
		Cutoff 1%		Cutoff 5%		Cutoff 10%		Cutoff 50%	
		% pos	p	% pos	p	% pos	p	% pos	p
alle	747	2.0		2.0		1.5		0.9	
pT1	7	0.0	0.823	0.0	0.823	0.0	0.823	0.0	0.823
pT2	30	3.3		3.3		3.3		3.3	
pT3	5	0.0		0.0		0.0		0.0	
pT4	5	0.0		0.0		0.0		0.0	
Grad 1	16	0.0	0.2579	0.0	0.2579	0.0	0.4568	0.0	0.5888
Grad 2	27	3.7		3.7		3.7		3.7	
Grad 3	120	7.5		7.5		5.0		3.3	
pN0	47	4.3	0.1264	4.3	0.1264	0.0	0	0.0	n.a.
pN+	3	33.3		33.3		33.3		0.0	
R0	32	6.3	0.2089	6.3	0.2089	6.3	0.2089	6.3	0.2089
R+	15	0.0		0.0		0.0		0.0	

Tabelle 7: PD-L1 Status in Tumorzellen vs Tumorphänotyp

Für die einzelnen Tumortypen, war die Zahl der Patienten mit Vorliegen dieser Daten für separate Untersuchungen zu gering. Bei der kombinierten Untersuchung sämtlicher Tumortypen fand sich bei allen, für die Untersuchung evaluierter Cutoff, kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen PD-L1 Expression in Tumorzellen und Parametern, welche auf eine gesteigerte Tumoraggressivität hindeuten.

In Entzündungszellen fand sich in den untersuchten Tumortypen eine PD-L1 Expression noch seltener als eine PD-L1 Expression in Tumorzellen. Auch bei der Beurteilung von Entzündungszellen war eine PD-L1 Expression vor allem in malignen Tumoren zu sehen. Allerdings fand sich auch ein benigner Tumor (Angiomyolipom) mit PD-L1 positiven Entzündungszellen, allerdings nur in <5% der untersuchten Tumorfläche. Daneben fanden sich PD-L1 positive Entzündungszellen nur in zwei Sarkomtypen, dem Liposarkom und dem Sarkom NOS.

Der Unterschied zwischen benignen und malignen Tumoren bezüglich PD-L1 positiven Entzündungszellen war somit statistisch nicht signifikant (Tabelle 8).

	n	Anteil PD-L1 positiver Entzündungszellen							
		cutoff 1%	P	cutoff 5%	P	cutoff 10%	P	cutoff 50%	P
Tumor Typ									
benigne	398	0.3	0.4857	0.0	0.0807	0.0	0.0807	0.0	0.0807
maligne	349	0.6		0.6		0.6		0.6	

Tabelle 8: PD-L1 in den Entzündungszellen vs Dignität

Darüber hinaus waren PD-L1 positive Entzündungszellen in einigen sarkomähnlichen Neoplasien, wie dem sarkomatoiden Karzinom der Harnblase und dem epitheloiden Mesotheliom, nachweisbar. Die Beziehung zwischen der PD-L1 Positivität in Entzündungszellen und dem histologischen Tumortyp ist in Tabelle 9 dargestellt.

Entität	n	cutoff $\geq 1\%$	cutoff $\geq 5\%$	cutoff $\geq 10\%$	cutoff $\geq 50\%$
		pos (%)	pos (%)	pos (%)	pos (%)
Angiomyolipom	89	0.0	0.0	0.0	0.0
Angiosarkom	37	8.1	8.1	8.1	2.7
Chondrosarkom	7	14.3	14.3	14.3	0.0
Dermatofibrosarcoma protuberans	20	0.0	0.0	0.0	0.0
Epitheloides Hämangiom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Fibromyoides Sarkom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Fibrosarkom	2	0.0	0.0	0.0	0.0
Ganglioneurom	14	0.0	0.0	0.0	0.0
Glomus Tumor	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Granularzelltumor	18	0.0	0.0	0.0	0.0
Hämangioperizytom	3	0.0	0.0	0.0	0.0
Kaposi Sarkom	8	0.0	0.0	0.0	0.0
Klarzellsarkom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Leiomyosarkom	35	2.9	2.9	0.0	0.0
Liposarkom	73	2.7	2.7	2.7	2.7
Mesotheliom-anderer Typ	22	18.2	18.2	13.6	4.5
Mesotheliom-epitheloid	29	10.3	10.3	10.3	3.4
MPNST	12	0.0	0.0	0.0	0.0
Myofibrosarkom	26	0.0	0.0	0.0	0.0
Myoperizytom	4	0.0	0.0	0.0	0.0
Neurofibrom	115	0.0	0.0	0.0	0.0
NOS	70	10.0	10.0	5.7	4.3
Osteosarkom	13	0.0	0.0	0.0	0.0
Paragangliom	41	0.0	0.0	0.0	0.0
PNET	20	0.0	0.0	0.0	0.0
Rhabdomyosarkom	7	0.0	0.0	0.0	0.0
Sarkomatoides Karzinom	25	48.0	48.0	44.0	16.0
Schwannom	115	0.0	0.0	0.0	0.0
Spindelzellsarkom	2	50.0	50.0	50.0	50.0
Stromasarkom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Synovialsarkom	11	0.0	0.0	0.0	0.0

Tabelle 9: PD-L1 Positivität in Entzündungszellen

Angesichts der geringen Zahl von Tumoren mit Nachweis von Entzündungszellen mit PD-L1 Expression konnte keine statistisch aussagekräftige Beziehung zu histologischen Malignitätsparametern wie pT, Differenzierungsgrad, pN0 und R-Status gefunden werden (Tabelle 10).

	n	PD-L1 Positiv							
		Cutoff 1%		Cutoff 5%		Cutoff 10%		Cutoff 50%	
		% pos	p	% pos	p	% pos	p	% pos	p
alle	747	0.4		0.3		0.3		0.3	
pT1	7	0.0	n.a.	0.0	n.a.	0.0	n.a.	0.0	n.a.
pT2	30	0.0		0.0		0.0		0.0	
pT3	5	0.0		0.0		0.0		0.0	
pT4	5	0.0		0.0		0.0		0.0	
Grad 1	16	0.0	0.4826	0.0	0.4826	0.0	0.4826	0.0	0.4826
Grad 2	27	3.7		3.7		3.7		3.7	
Grad 3	120	0.8		0.8		0.8		0.8	
pN0	47	0.0	n.a.	0.0	n.a.	0.0	0	0.0	n.a.
pN+	3	0.0		0.0		0.0		0.0	
R0	32	0.0	n.a.	0.0	n.a.	0.0	n.a.	0.0	n.a.
R+	15	0.0		0.0		0.0		0.0	

Tabelle 10: PD-L1 Expression in Entzündungszellen vs Tumorphänotyp

Die Ergebnisse der PD-L1 Untersuchung sind bei Zusammenfassung der Positivitäten in Tumor- und Entzündungszellen für verschiedene Cutoff in Tabelle 11 dargestellt.

Entität	n	cutoff ≥1%	cutoff ≥5%	cutoff ≥10%	cutoff ≥50%
		pos (%)	pos (%)	pos (%)	pos (%)
Angiomyolipom	88	1.1	0.0	0.0	0.0
Angiosarkom	34	8.8	8.8	8.8	2.9
Chondrosarkom	6	16.7	16.7	16.7	0.0
Dermatofibrosarcoma protuberans	20	0.0	0.0	0.0	0.0
Epitheloides Hämangiom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Fibromyoides Sarkom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Fibrosarkom	2	0.0	0.0	0.0	0.0
Ganglioneurom	14	0.0	0.0	0.0	0.0
Glomus Tumor	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Granularzelltumor	18	0.0	0.0	0.0	0.0
Hämangioperizytom	3	0.0	0.0	0.0	0.0
Kaposi Sarkom	8	0.0	0.0	0.0	0.0
Klarzellsarkom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Leiomyosarkom	34	2.9	2.9	0.0	0.0
Liposarkom	71	2.8	2.8	2.8	2.8
Mesotheliom-anderer Typ	18	22.2	22.2	16.7	5.6
Mesotheliom-epitheloid	25	16.0	16.0	16.0	4.0
MPNST	12	0.0	0.0	0.0	0.0
Myofibrosarkom	26	0.0	0.0	0.0	0.0
Myoperizytom	4	0.0	0.0	0.0	0.0
Neurofibrom	115	0.0	0.0	0.0	0.0
NOS	63	11.1	11.1	6.3	4.8
Osteosarkom	13	0.0	0.0	0.0	0.0
Paragangliom	41	0.0	0.0	0.0	0.0
PNET	20	0.0	0.0	0.0	0.0
Rhabdomyosarkom	7	0.0	0.0	0.0	0.0
Sarkomatoides Karzinom	13	92.3	92.3	84.6	30.8
Schwannom	115	0.0	0.0	0.0	0.0
Spindelzellsarkom	1	100.0	100.0	100.0	100.0
Stromasarkom	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Synovialsarkom	11	0.0	0.0	0.0	0.0

Tabelle 11: PD-L1 Positivität in Tumor- und/oder Entzündungszellen

Auch in dieser kombinierten Analyse zeigt sich eine PD-L1 Expression signifikant häufiger in malignen als in benignen Weichteiltumoren, wobei das Signifikanzniveau von mindestens $p < 0,0001$ für alle untersuchten Cutoff erreicht wurde (Tabelle 12).

	n	Anteil PD-L1 positiver Tu/Entz.-Zellen							
		cutoff 1%	P	cutoff 5%	P	cutoff 10%	P	cutoff 50%	P
Tumor Typ									
benigne	398	0.3	<0.0001	0.0	<0.0001	0.0	<0.0001	0.0	0.0011
maligne	349	4.3		4.3		3.2		2.0	

Tabelle 12: PD-L1 in den Tumor- und/oder Entzündungszellen vs Dignität

1.6 CD8 Quantifizierung

Die Ergebnisse der CD8 Quantifizierung ist für die verschiedenen untersuchten Tumortypen in Abbildung 24 dargestellt.

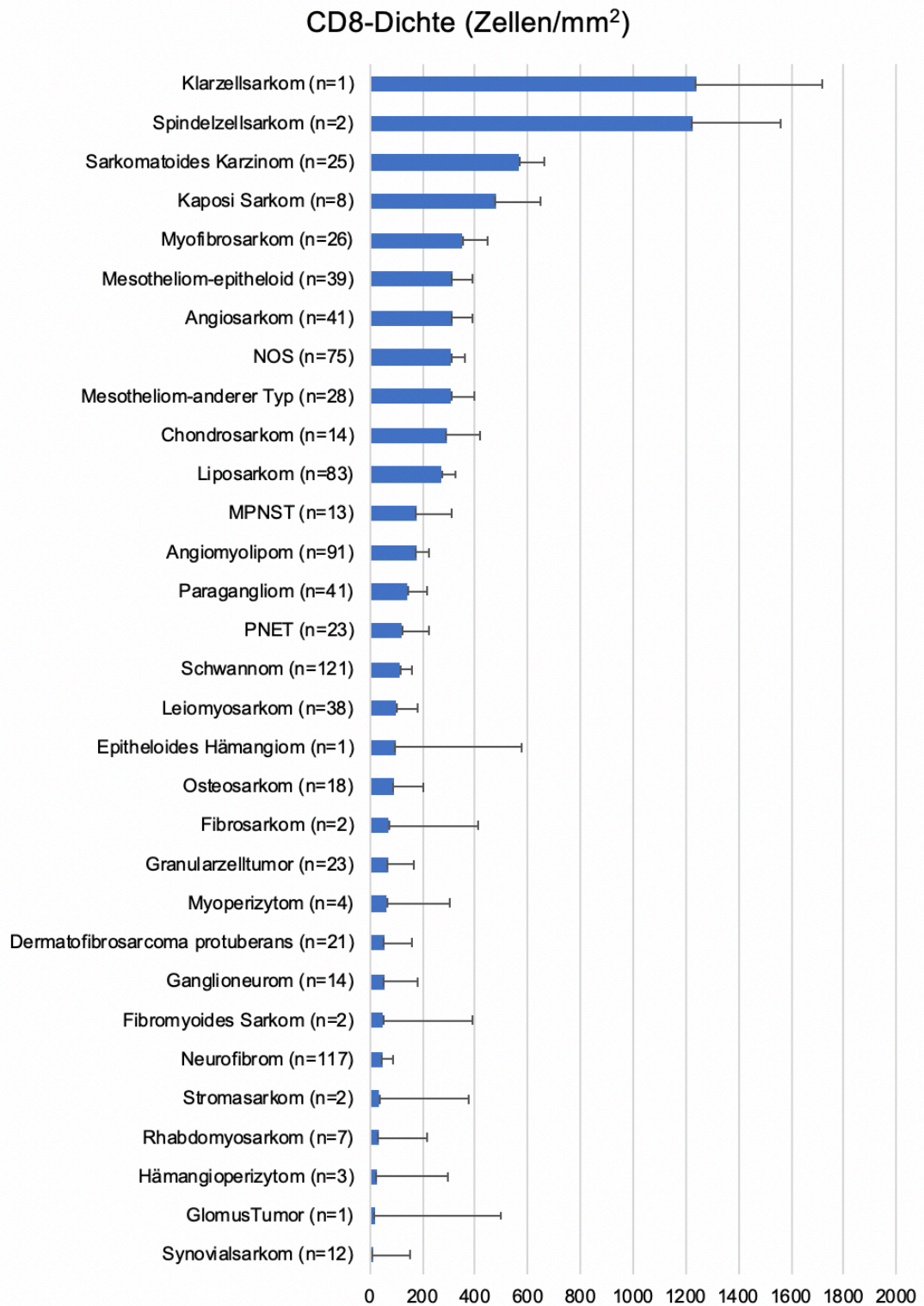


Abbildung 24: CD8 Dichte in Weichgewebstumoren, Balken geben den Mittelwert an Fehlerbalken geben die Standardabweichung an

Bereits aus dieser Abbildung wird deutlich, dass die CD8-Dichte bei malignen Tumoren höher ist als bei Benigen. In der Rangliste der Tumoren nach der CD8-Dichte belegt das Angiomyolipom als am dichtesten CD8 lymphozytär infiltrierter benigner Tumor den 13. Rang hinter 12 malignen Tumorentitäten.

Die zusammengefasste Untersuchung von benignen und malignen Weichteiltumoren ist in Tabelle 13 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die mittlere Dichte CD8 positiver zytotoxischer Lymphozyten unserer Sarkome signifikant höher ist als beim benignen Weichteiltumoren ($p < 0,0001$). Zur Klärung einer möglichen Beziehung zwischen CD8-Dichte und Tumoraggressivität bei Sarkomen wurden wiederum alle Tumoren mit Angaben zu pT, Differenzierungsgrad, pN und R Status gemeinsam analysiert. Diese Untersuchung ergab eine signifikant größere Menge CD8 positiver zytotoxischer Lymphozyten in pT1 Tumoren ($504,9 \pm 126,4$) als in pT2, pT3 und pT4 Tumoren (jeweils < 100 , $p = 0,0261$). Es fanden sich aber keine signifikanten Beziehungen zum Differenzierungsgrad, Nodalstatus und Resektionsstatus (Tabelle 14).

	n	CD8-Dichte (MW)	Std.-Fehler (\pm)	p
benigne	413	106.8	23	<0.0001
maligne	391	235.8	23.7	

Tabelle 13: CD8 Dichte vs Dignität

	n	CD8-Dichte (MW)	Std.-Fehler (\pm)	p
pT1	8	504.9	126.4	0.0261
pT2	33	76.7	62.2	
pT3	5	56.4	159.9	
pT4	5	30	159.9	
Grad 1	27	187.4	129.2	0.6858
Grad 2	32	336.1	118.7	
Grad 3	126	247.7	59.8	
pN0	47	175	39	0.9245
pN+	3	190.2	154.5	
R0	35	137	79.9	0.6655
R+	18	263.2	111.4	

Tabelle 14: CD8 Dichte vs Tumorphänotyp

Repräsentative Beispiele einer CD8-Positivität in Tumorzellen bei Sarkomen, sarkomatoiden Karzinomen und Mesotheliomen sind in den Abbildungen 25-33 dargestellt.

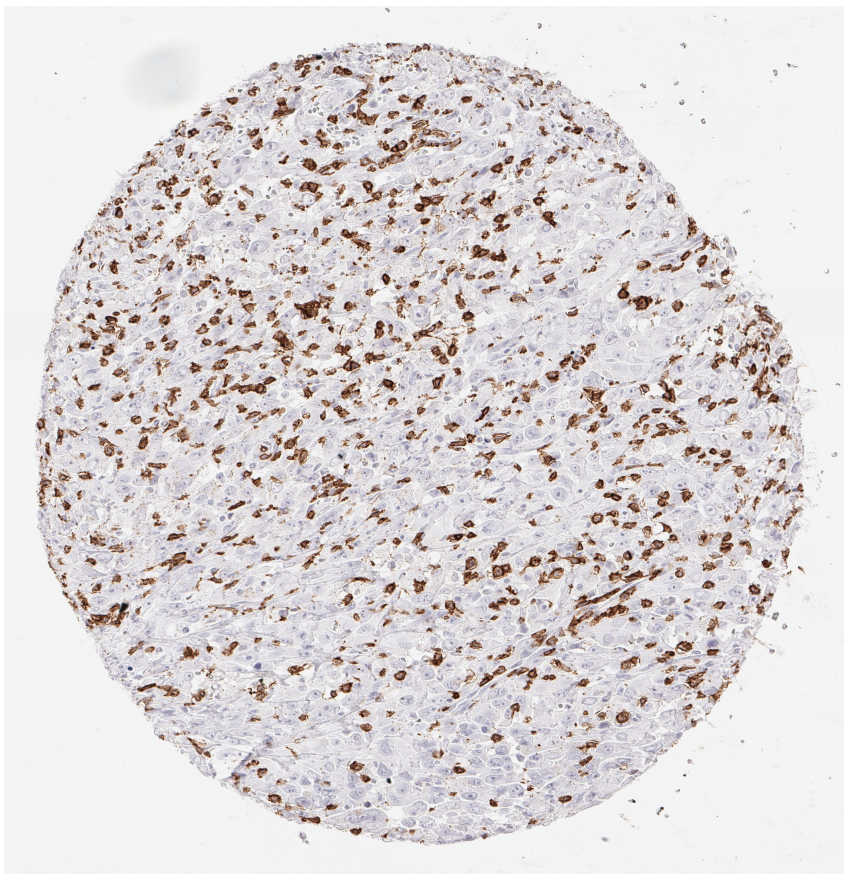


Abbildung 25: Angiosarkom mit einer hohen Beimengung CD8-positiver Lymphozyten

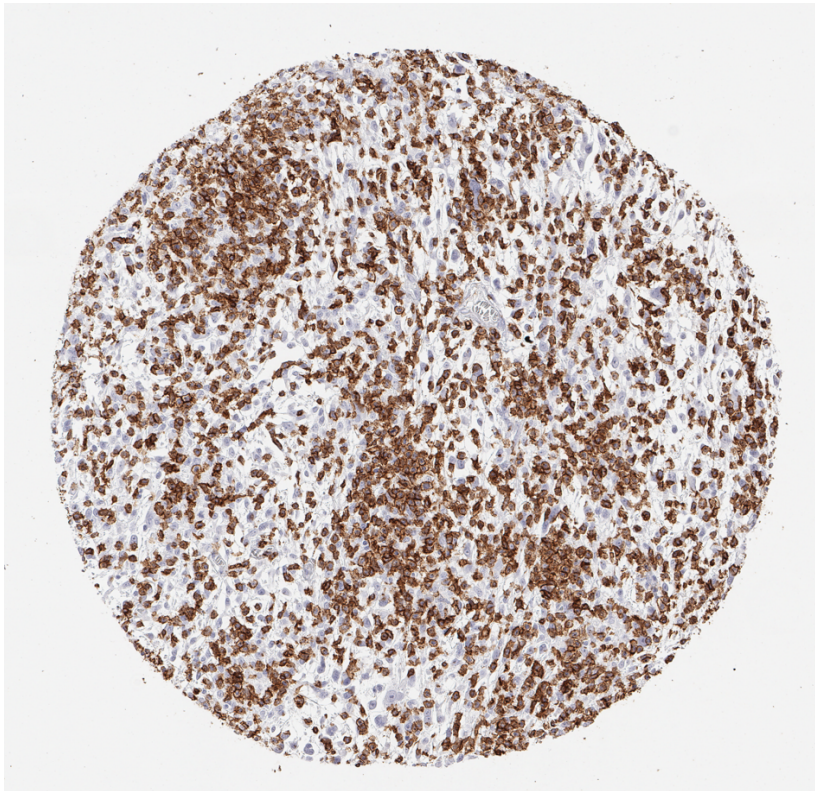


Abbildung 26: Myxofibrosarkom mit einer sehr hohen Dichte an CD8-positiven Lymphozyten

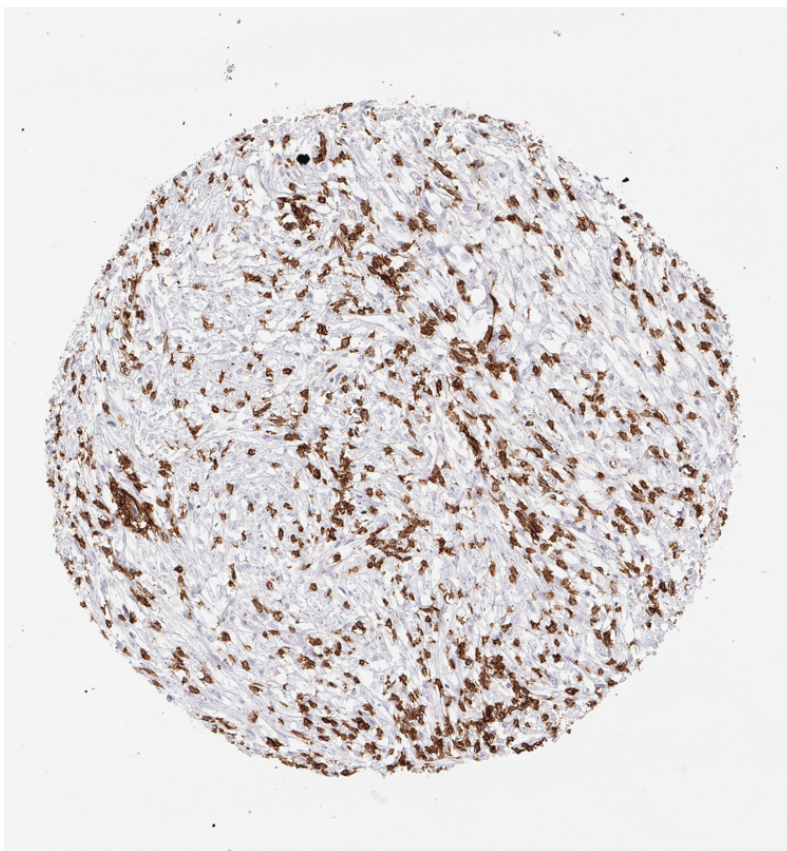


Abbildung 27: Liposarkom mit einer hohen Menge an CD8-positiven Lymphozyten

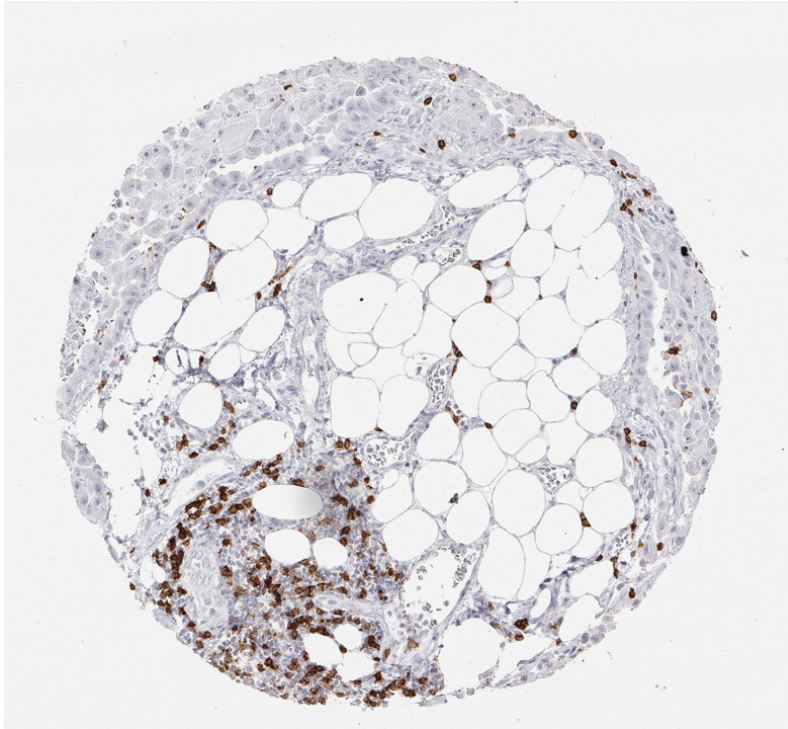


Abbildung 28: Malignes Mesotheliom mit einer geringen Dichte an CD8-positiven Zellen im Tumorgewebe. Ein Herd mit vermehrten CD-8 positiven Zellen entspricht einem peritumoralen folliculären Entzündungsinfiltrat

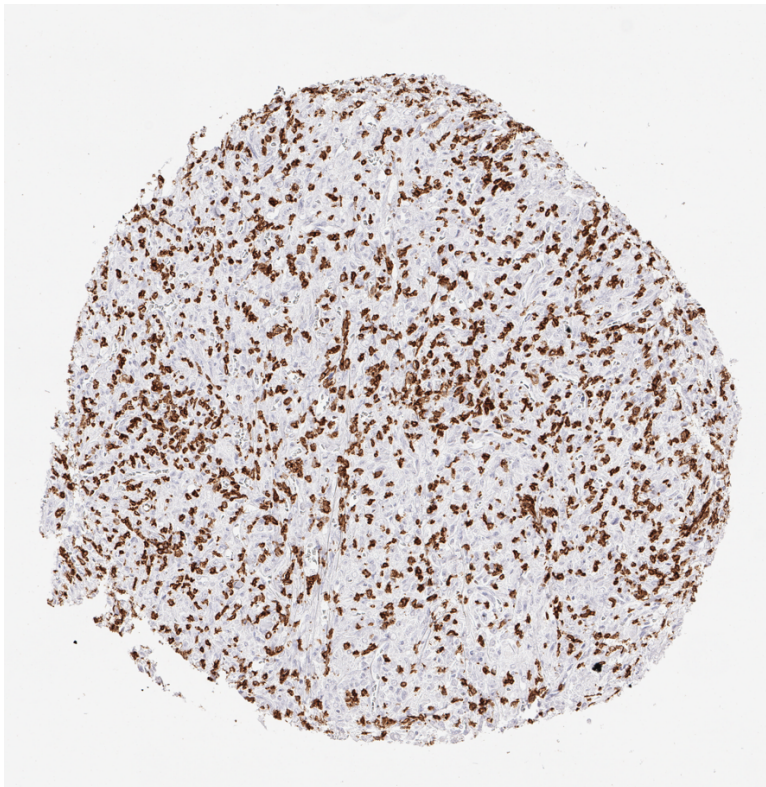


Abbildung 29: Sarkom NOS mit einer hohen Dichte an CD8-positiven Zellen

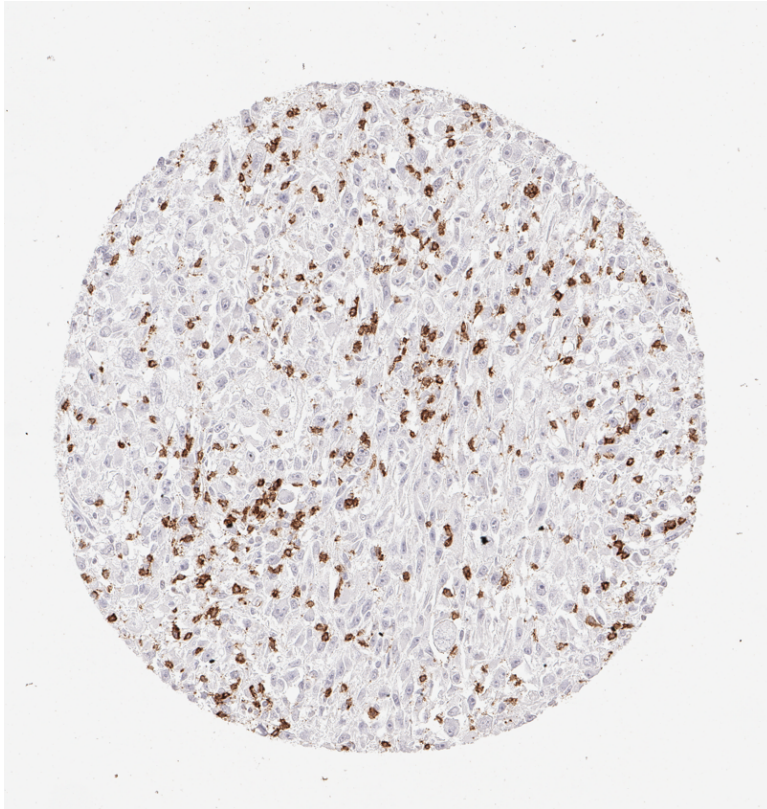


Abbildung 30: Sarkom NOS mit mäßig hohen CD8-positiven tumorinfiltrierenden Lymphozyten

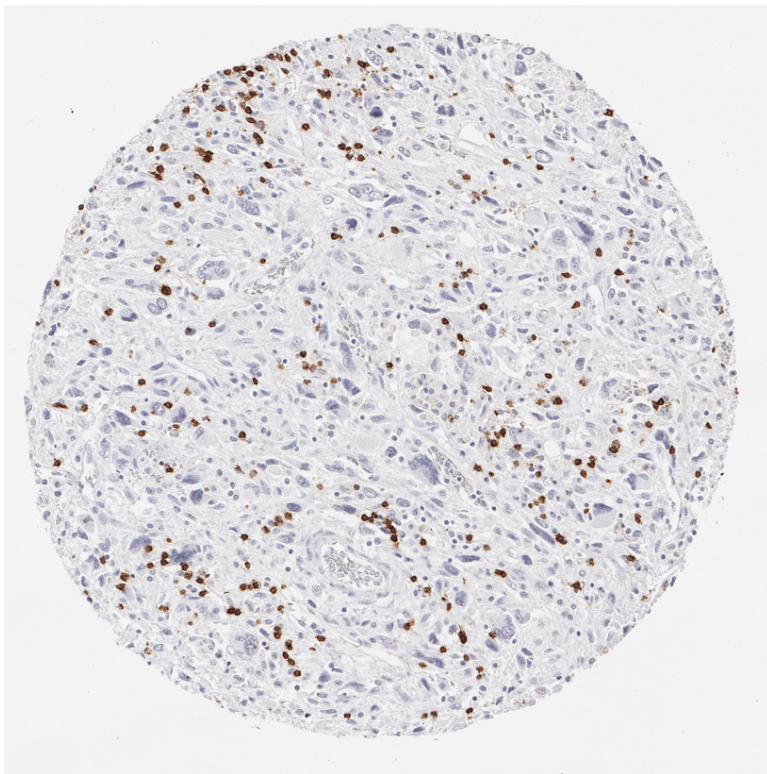


Abbildung 31: Leiomyosarkom mit CD8-positiven tumorinfiltrierenden Lymphozyten

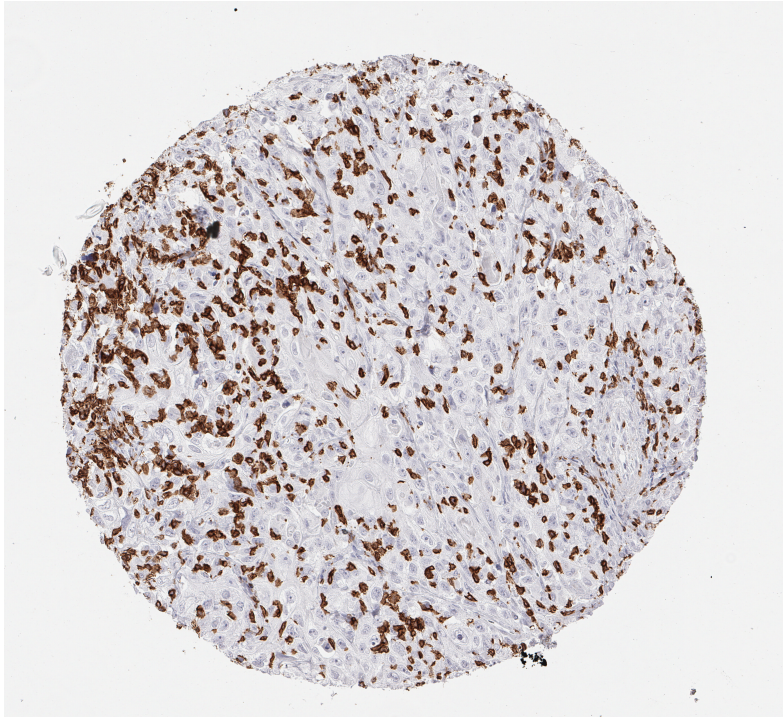


Abbildung 32: Sarkomatoides Urothelkarzinom mit einer hohen Dichte an CD8-positiven Lymphozyten

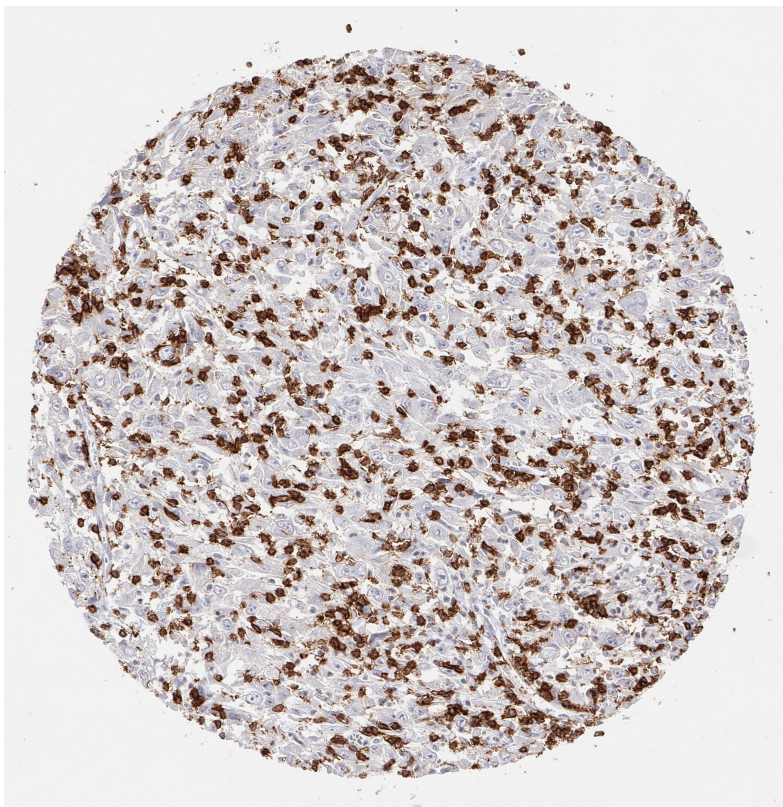


Abbildung 33: Sarkomatoides Urothelkarzinom mit einer hohen Dichte an CD8-positiven Zellen

1.7 PD-L1 Expression und Lymphozytendichte

Der Nachweis einer PD-L1 Expression war unabhängig davon, ob diese im Tumor oder in Entzündungszellen vorlag, in unseren Tumoren mit einer erhöhten Dichte CD8 positiver Lymphozyten assoziiert. Die entsprechenden Daten sind für die Befunde in Tumorzellen in Tabelle 15, die Befunde in Entzündungszellen in Tabelle 16 und für die kombinierte Analyse von Tumor- und Entzündungszellen in Tabelle 17 dargestellt.

PD-L1 Cutoff		Alle Tumoren			Alle Sarkome			Angiosarkome		
		Ergebnis	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)
1%	negative	799	152.08±15.786	<0.0001	732	141.64±15.96	<0.0001	34	224.98±80.61	<0.0001
	pos	34	910.976±76.528		15	1100.66±111.49		3	1497.87±271.37	
5%	negative	799	152.08±15.786	<0.0001	732	141.64±15.96	<0.0001	34	224.98±80.61	<0.0001
	pos	34	910.976±76.528		15	1100.66±111.49		3	1497.87±271.37	
10%	negative	805	159.751±16	<0.0001	736	148.459±16.24	<0.0001	34	224.98±80.61	<0.0001
	pos	28	853.05±85.789		11	993.364±132.87		3	1497.87±271.37	
50%	negative	820	168.22±15.92	<0.0001	740	151.26±16.22	<0.0001	36	275±81.8	<0.0001
	pos	13	1118.59±126.43		7	1180.37±166.79		1	2243.01±490.79	

PD-L1 Cutoff		Liposarkome			Sarkomatoide Ca.			Mesotheliome		
		Ergebnis	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)
1%	negative	71	210.73±56.43	<0.0001	13	211.421±229.46	0.0345	44	246.743±43.39	0.1287
	pos	2	1690.07±336.24		12	955.772±238.83		7	427.717±108.79	
5%	negative	71	210.73±56.43	<0.0001	13	211.421±229.46	0.0345	44	246.743±43.39	0.1287
	pos	2	1690.07±336.24		12	955.772±238.83		7	427.717±108.79	
10%	negative	71	210.73±56.43	<0.0001	14	230.167±219.78	0.0294	45	264.172±43.83	0.6243
	pos	2	1690.07±336.24		11	999.581±247.94		6	327.165±120.04	
50%	negative	71	210.73±56.43	<0.0001	21	417.66±183.17	0.0507	49	265.685±41.89	0.4805
	pos	2	1690.07±336.24		4	1361.72±419.69		2	416.089±207.36	

Tabelle 15: PD-L1 Status in Tumorzellen, CD8 Dichte in allen Tumoren und ausgewählten Subgruppen

PD-L1		Alle Tumoren			Alle Sarkome			Angiosarkome		
Cutoff	Ergebnis	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p
1%	negative	825	174.38±16.1	<0.0001	744	157.15±16.44	0.0003	37	328.186±95.699	-
	pos	8	1077.18±163.54		3	1090.21±258.91		0	±	
5%	negative	826	174.21±16.04	<0.0001	745	156.99±16.34	<0.0001	37	328.186±95.699	-
	pos	7	1226.48±174.22		2	1619.3±315.33		0	±	
10%	negative	827	174.57±16	<0.0001	745	156.99±16.34	<0.0001	37	328.186±95.699	-
	pos	6	1351.92±187.88		2	1619.3±315.33		0	±	
50%	negative	831	179.6±16.15	<0.0001	745	156.99±16.34	<0.0001	37	328.186±95.699	-
	pos	2	1619.3±329.2		2	1619.3±315.33		0	±	

PD-L1		Liposarkome			Sarkomatoide Ca.			Mesotheliome		
Cutoff	Ergebnis	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p
1%	negative	72	210.04±47.18	<0.0001	22	465.73±184.67	0.1211	49	254.602±40.29	0.0384
	pos	1	3219.1±400.36		3	1323.86±500.08		2	687.608±199.41	
5%	negative	72	210.04±47.18	<0.0001	22	465.73±184.67	0.1211	49	254.602±40.29	0.0384
	pos	1	3219.1±400.36		3	1323.86±500.08		2	687.608±199.41	
10%	negative	72	210.04±47.18	<0.0001	23	466.09±174.85	0.0493	49	254.602±40.29	0.0384
	pos	1	3219.1±400.36		2	1748.85±592.93		2	687.608±199.41	
50%	negative	72	210.04±47.18	<0.0001	25	568.709±178.88	-	51	271.583±40.86	-
	pos	1	3219.1±400.36		0	±		0	±	

Tabelle 16: PD-L1 Status in Entzündungszellen, CD8 Dichte in allen Tumoren und ausgewählten Subgruppen

PD-L1		Alle Tumoren			Alle Sarkome			Angiosarkome		
Cutoff	Ergebnis	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p
1%	negative	797	151.308±15.816	<0.0001	731	141.79±16.03	<0.0001	34	224.98±80.61	<0.0001
	pos	36	885.908±74.415		16	1033.87±108.36		3	1497.87±271.37	
5%	negative	798	151.158±15.771	<0.0001	732	141.64±15.96	<0.0001	34	224.98±80.61	<0.0001
	pos	35	910.305±75.303		15	1100.66±111.49		3	1497.87±271.37	
10%	negative	804	158.846±15.985	<0.0001	736	148.459±16.24	<0.0001	34	224.98±80.61	<0.0001
	pos	29	854.237±84.166		11	993.364±132.87		3	1497.87±271.37	
50%	negative	820	168.22±15.92	<0.0001	740	151.26±16.22	<0.0001	36	275±81.8	0.0004
	pos	13	1118.59±126.43		7	1180.37±166.79		1	2243.01±490.79	

PD-L1		Liposarkome			Sarkomatoide Ca.			Mesotheliome		
Cutoff	Ergebnis	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p	n	CD8-Dichte (MW±Stabw)	p
1%	negative	71	210.73±56.43	<0.0001	13	211.421±229.46	0.0345	43	231.842±42.604	0.0226
	pos	2	1690.07±336.24		12	955.772±238.83		8	485.187±98.772	
5%	negative	71	210.73±56.43	<0.0001	13	211.421±229.46	0.0345	43	231.842±42.604	0.0226
	pos	2	1690.07±336.24		12	955.772±238.83		8	485.187±98.772	
10%	negative	71	210.73±56.43	<0.0001	14	230.167±219.78	0.0294	44	250.006±43.65	0.1883
	pos	2	1690.07±336.24		11	999.581±247.94		7	407.21±109.44	
50%	negative	71	210.73±56.43	<0.0001	21	417.66±183.17	0.0254	49	265.685±41.89	0.4805
	pos	2	1690.07±336.24		4	1361.72±419.69		2	416.089±207.36	

Tabelle 17: PD-L1 Status und CD8 Dichte für die kombinierte Analyse von Tumor- und Entzündungszellen

Die, auf die PD-L1 Expression in Tumorzellen (Tabelle 15) beschränkte Analyse, ergab für die kombinierte Betrachtung aller Tumoren, aller Sarkome, der Angiosarkome und der Liposarkome (die Tumorkategorie mit den meisten PD-L1 positiven Fällen), unabhängig vom Cutoff, massiv höhere CD8 Dichten in PD-L1 positiven (jeweils >850) als in PD-L1 negativen Tumoren (jeweils < 250, jeweils $p < 0,0001$). Auch für die sarkomatoiden Karzinome erreichten die Unterschiede zwischen PD-L1 positiven und negativen Tumoren für die Cutoffs 1%, 5% und 10% statistische Signifikanz ($p < 0,05$) und verfehlte das Signifikanzniveau beim Cutoff von 50% bei einem p-Wert von 0,0507 nur knapp. Aber auch bei diesem Tumor waren die absoluten Unterschiede deutlich. Unabhängig vom Cutoff war die Dichte CD8 positiver Lymphozyten in PD-L1 positiven Tumoren immer >950 und bei PD-L1 negativen Tumoren immer <420. Auch bei den Mesotheliomen fanden sich unabhängig vom Cutoff höhere Mengen CD8 positiver Lymphozyten bei PD-L1 positiven als bei PD-L1 negativen Tumoren, doch wurde bei dieser Tumorkategorie das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Bei isolierter Betrachtung der Entzündungszellen (Tabelle 16) ergaben sich, trotz einer insgesamt sehr geringen Zahl von Tumoren mit PD-L1 positiven Entzündungszellen, hoch signifikante Unterschiede für die Kategorien aller Tumoren, aller Sarkome und Liposarkome ($p < 0,0001$). Ebenfalls signifikant waren die Unterschiede bei den malignen Mesotheliomen (p jeweils <0,05). Für sarkomatoide Karzinome wurde der Signifikanzwert nur bei einem Cutoff von 10% erreicht ($p = 0,0493$).

Die kombinierte Analyse von Tumor- und Entzündungszellen (Tabelle 17) ergab analoge Ergebnisse. Auch hier waren die statistischen Unterschiede zwischen PD-L1 negativen und positiven Tumoren in der Regel unabhängig vom Cutoff. Dies war v.a. bei allen Tumoren, Angiosarkomen und Liposarkomen (jeweils $p < 0,0005$) zu sehen. Auch bei sarkomatoiden Karzinomen waren die statistischen Unterschiede unabhängig vom Cutoff statistisch signifikant ($p < 0,05$). Nur bei Mesotheliomen war, trotz fast doppelt so vielen Lymphozyten in PD-L1 positiven Tumoren als in PD-L1 negativen Tumoren, bei einem Cutoff von 1% und 5% eine statistische Signifikanz zu erkennen ($p < 0,05$).

Diskussion

Zahlreiche Studien haben sich in den letzten Jahren mit der PD-L1 Expression von Weichteiltumoren und mit der Bedeutung lymphozytärer Infiltrate in diesen Neoplasien beschäftigt. Studien zur Bedeutung sogenannter tumorinfiltrierender Lymphozyten konzentrierten sich meistens auf die Zahl der CD8 positiven zytotoxischen Lymphozyten. Bei diesem Zelltyp handelt es sich um diejenigen Zellen, welche Tumorzellen durch direkte Interaktion eliminieren können. Die wesentlichsten dieser Studien sind in Tabelle 18 dargestellt.

Pubmed	Autor	Tumortyp	N	Durchschnitt in Zellen/mm ²	Messverfahren
21171080	Berghuis et al.	Ewingsarkom	20	17	Automatisch
31516753	Que et al.	Weichteilsarkom	163	137	Automatisch
30483955	Alves et al.	Osteosarkom	21	25-130	Manuell
29308306	Keung et al.	UPS	17	55 vs 111	Automatisch
30133055	Oike et al.	Synovialsarkom	36	188,3	Manuell
24243586	Fujii et al.	Angiosarkom	55	131,8	Manuell
28039162	Nowicki et al.	Synovialsarkom	29	15	Automatisch

Tabelle 18: Studien der Untersuchung von CD8 positiven Lymphozyten in Tumoren

Die Tabelle enthält die Zahl der untersuchten Tumoren, die Art der untersuchten Tumoren, das Verfahren zur Quantifizierung der CD8 positiven Lymphozyten und die Kriterien für die Klassifizierung der Tumoren in Gruppen (nach der Zahl der tumorinfiltrierenden CD8 positiven Lymphozyten). Die Darstellung macht deutlich, dass es zwar viele Studien gibt, dass die angewendeten Verfahren aber sehr uneinheitlich sind, sodass die Vergleichbarkeit der Studien nicht ohne Weiteres gegeben ist (Berghuis, et al., 2011) (Que, et al., 2019) (Alves, et al., 2019) (Keung, Tsai, & Roland, 2017) (Oike, et al., 2018) (Fujii, et al., 2014) (Nowicki, et al., 2017).

Die Studienlage zum Thema PD-L1 Expression in Sarkomen ist noch komplexer als diejenige zur Zahl tumorinfiltrierender Lymphozyten. Mindestens 37 Studien haben zwischen 2013 und 2019, die Expression von PD-L1 in mesenchymalen Tumoren untersucht. Dabei wurden nicht nur unterschiedliche PD-L1 Antikörper und Färbeprotokolle verwendet, auch die Kriterien für die Definition eines PD-L1 positiven Tumors variierte, wobei die typischerweise verwendeten Cutoff Werte 1%, 5% oder 10% waren. Die früher beobachteten Positivitätsraten zu PD-L1 in mesenchymalen Tumoren ist in der Abbildung 34 für Studien mit einem Cutoff

von 1%, in Abbildung 35 für Studien mit einem Cutoff von 5% und in Abbildung 36 für Studien mit einem Cutoff von 10% dargestellt.

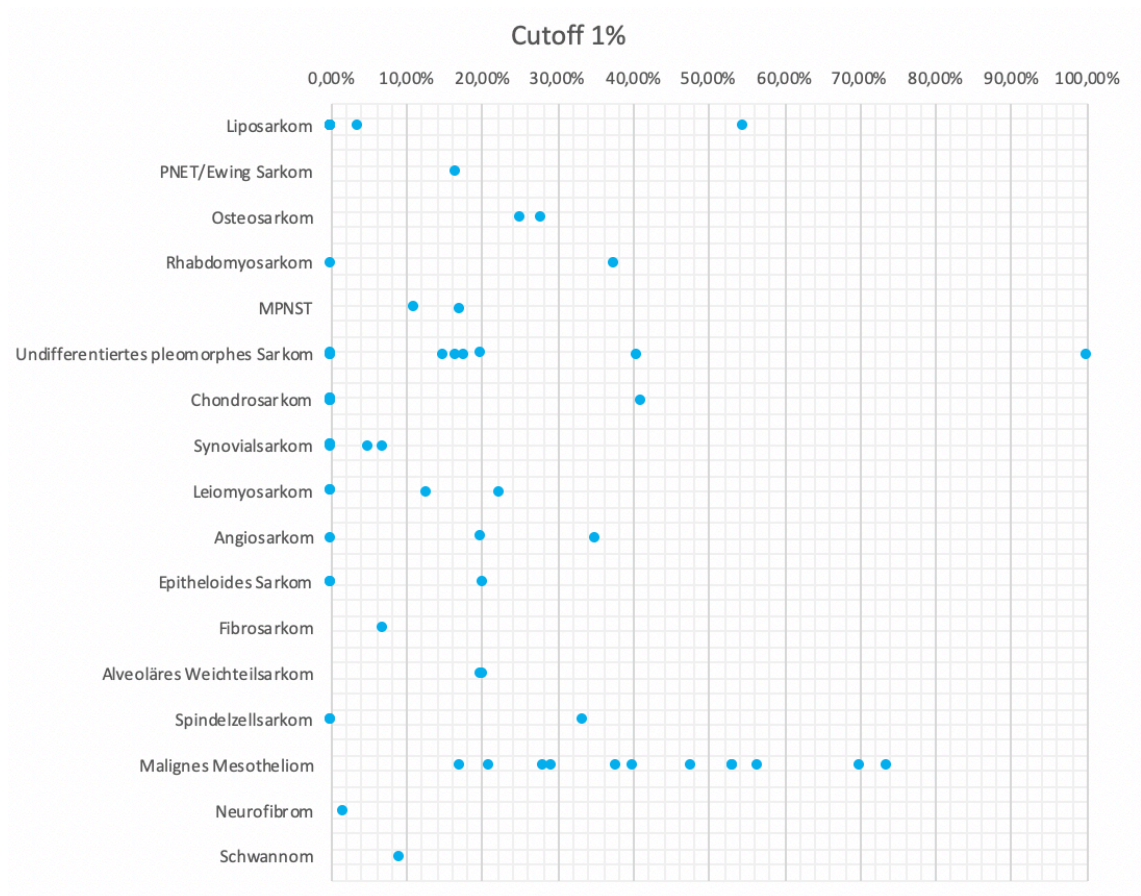


Abbildung 34: Anzahl der PD-L1 positiven Tumoren mit einem Cutoff Wert von 1% angefärbten Tumorzellen
 • Ergebnis einer Studie

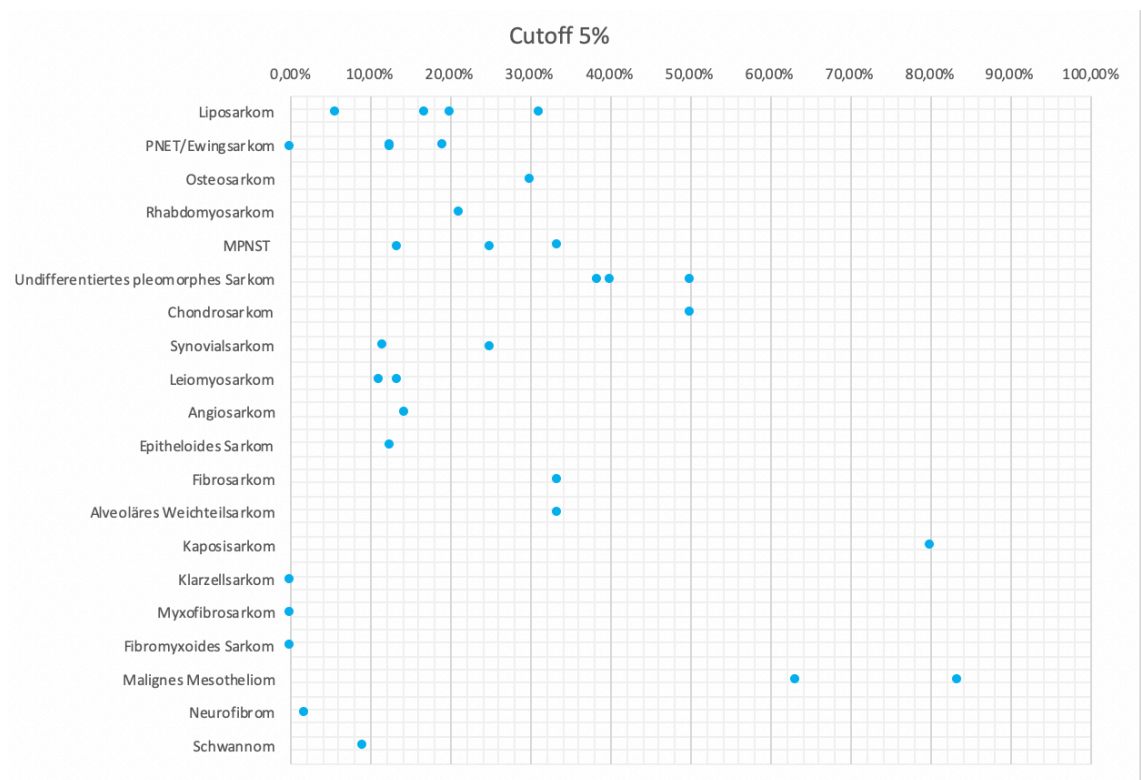


Abbildung 35: Anzahl der PD-L1 positiven Tumoren mit einem Cutoff Wert von 5% angefarbten Tumorzellen
 • Ergebnis einer Studie

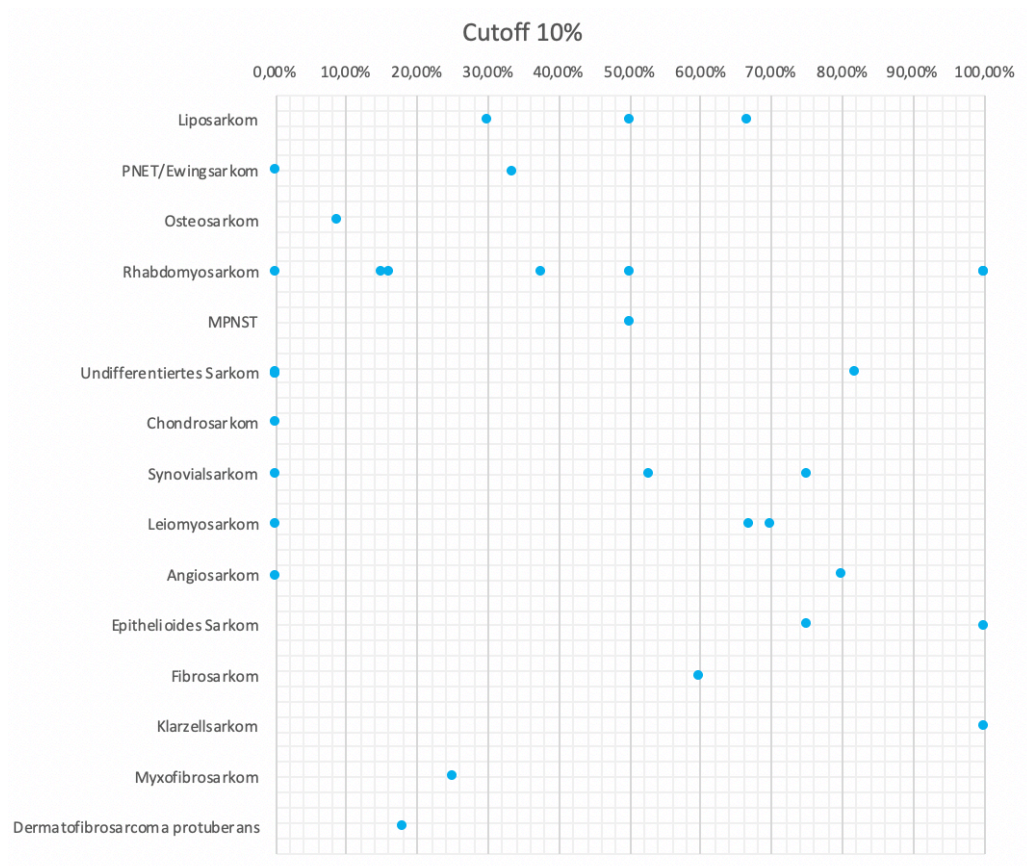


Abbildung 36: Anzahl der PD-L1 positiven Tumoren mit einem Cutoff Wert von 10% angefarbten Tumorzellen
 • Ergebnis einer Studie

Ein Teil der durchgeführten Studien hatten auch andere Cutoff Werte verwendet.

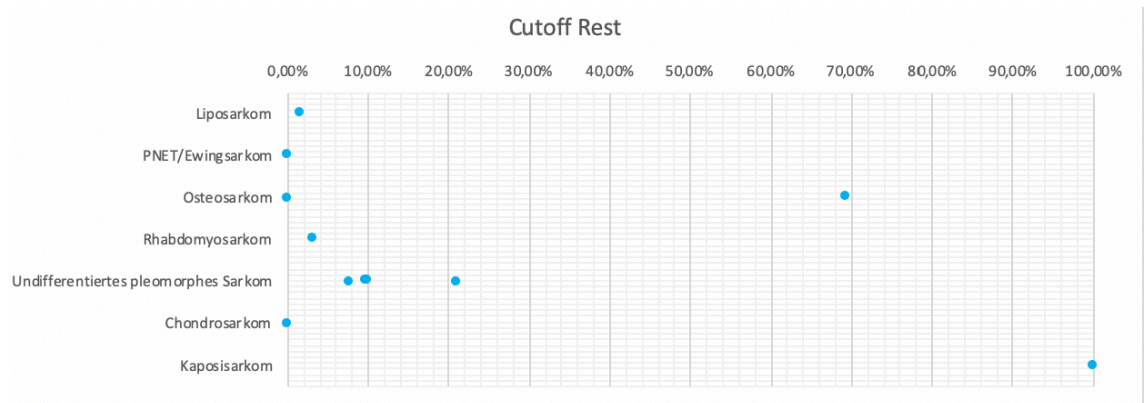


Abbildung 37: Anzahl der PD-L1 positiven Tumoren mit einem anderen Cutoff Wert angefärbten Tumorzellen
• Ergebnis einer Studie

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller Studien zur Frage der „PD-L1 Positivität“ in Weichgewebstumoren ist in Abbildung 38 dargestellt, wobei die Daten unabhängig von Cutoff verwendet wurden.

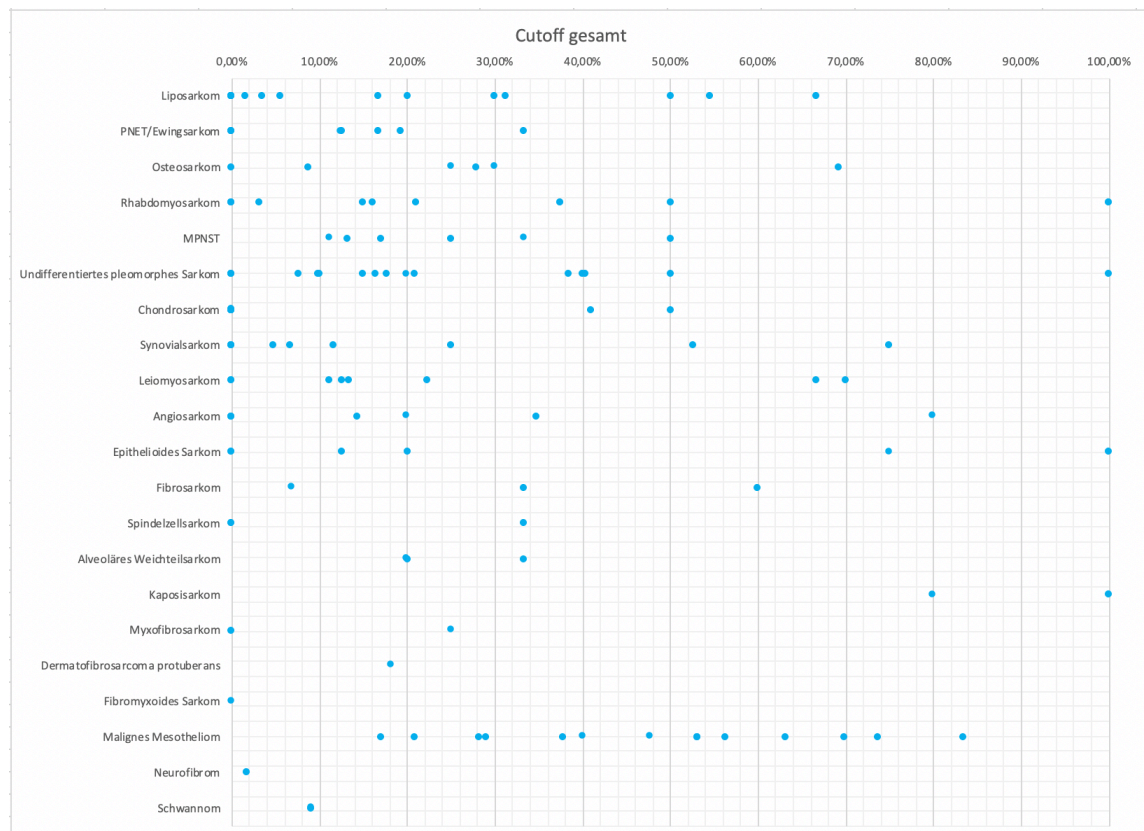


Abbildung 38: Anzahl der PD-L1 positiven Tumoren (Zusammenfassung aller Studien mit allen Cutoff Werten)
• Ergebnis einer Studie

In allen Darstellungen sind die Häufigkeiten von positiven Befunden für die einzelnen Subgruppen von Weichteiltumoren separat dargestellt. Aufgrund der vorliegenden Daten der Literatur, lässt sich für die Bedeutung der PD-L1 Expression in diesen Tumoren, aber auch für die Bedeutung tumorinfiltrierender CD8 positiver Lymphozyten und jedoch nicht für die Interaktion dieser beiden Parameter, ein klares Bild gewinnen. Ziel des vorliegenden Projektes war es dementsprechend, die beiden Parameter PD-L1 Expression und Anzahl der tumorinfiltrierenden CD8 positiven Lymphozyten an einer breiten Palette verschiedener mesenchymaler Tumoren mit standardisierten Methoden zu bestimmen und miteinander zu vergleichen. Eine Vielzahl von Studien hatten bereits früher die PD-L1 Expression und die Zahl der tumorinfiltrierenden CD8 positiven Lymphozyten bei Weichteiltumoren untersucht. Mindestens 37 Studien hatten zwischen 2013 und dem Stichtag 14.09.2019 die PD-L1 Expression in Weichteiltumoren untersucht und dabei zwischen 6 und 448 Tumoren untersucht (im Durchschnitt: 109 Tumoren pro Studie) (Que, et al., 2017) (Koirala, et al., 2016) (Park, et al., 2018) (Kim, et al., 2017) (Paydas, Bagir, Deveci, & Gonlusen, 2016) (Kostine, et al., 2016) (Kösemehmetoglu, Özogul, Babaoglu, Güler Tezel, & Gedikoglu, 2017) (Kim, et al., 2013) (Kim, et al., 2016) (Park, et al., 2018) (Arantes, et al., 2017) (Torabi, Amaya, Wians JR, & Bryan, 2017) (Spurny, et al., 2018) (Chen, et al., 2019). Mindestens 8 Studien hatten zwischen dem Jahr 2010 und 10.12.2018 die Zahl der tumorinfiltrierenden CD8 positiven Lymphozyten quantifiziert und dabei zwischen 8 und 163 Tumoren (Durchschnitt: 43 Tumoren pro Studie) untersucht (Que, et al., 2019) (Tseng, et al., 2015) (Alves, et al., 2019) (Fujii, et al., 2014) (Berghuis, et al., 2011) (Sorbye, et al., 2011). Beide Parameter, die PD-L1 Expression und die Zahl der tumorinfiltrierenden CD8 positiven Lymphozyten hatten bereits 13 Studien untersucht, wobei zwischen 17 und 370 Tumoren zur Untersuchung gelangten (Durchschnitt 98 pro Studie) (Boxberg, et al., 2018) (Cohen, Eleyan, Zick, Peretz, & Katz, 2018) (Patel, et al., 2018) (Sundara, et al., 2017) (D'Angelo, et al., 2015) (Shurell, et al., 2016) (Machado, Lopez-Guerrero, Scotlandi, Picci, & Llombart-Bosch, 2018) (Doyle, et al., 2019) (van Erp, et al., 2017) (Oike, et al., 2018) (Keung, Tsai, & Roland, 2017) (Nowicki, et al., 2017). Die Besonderheiten der jetzt vorliegenden Studie liegen darin, dass eine besonders große Zahl von Tumoren untersucht werden konnten (n=823) und daher eine besonders präzise Analyse der Zahl der CD8 positiven

Lymphozyten ermöglicht wurde, durch eine bereits vorher am Institut für Pathologie etablierte automatisierte digitale Zellquantifizierung.

Die besondere Stärke der Tissue Microarray Methode liegt darin, dass eine sehr große Zahl an Tumoren in kurzer Zeit und zu geringen Kosten untersucht werden können. Die eigentliche Untersuchung unseres Tumorkollektivs dauerte weniger als eine Woche. Die Herstellung der TMA Schnitte, von beiden im Rahmen der Studie erstellten TMA Blöcke, dauerte weniger als eine Stunde (2x2 Schnitte von 2 Blöcken). Die Färbung der Schnitte erfolgte an einem Tag. Die PD-L1 Auswertung durch einen Pathologen dauerte weniger als eine Stunde und die digitale Quantifizierung der CD8 positiven Lymphozyten erforderte ebenfalls weniger als einen Tag Arbeitszeit. Auch die Reagenzienkosten (für die Färbung von 4 Gewebeschnitten) waren minimal (<100Euro). Diese logistischen und ökonomischen Vorteile werden durch die Untersuchung von nur kleinen Gewebefragmenten pro Tumor „erkauft“. Die kleine Menge des pro Patienten untersuchten Gewebes legt die Frage nahe, in wie weit ein so kleiner Tumorbereich für die Gesamttumormasse eines Patienten tatsächlich repräsentativ ist. Zahlreiche Studien haben diese Frage früher untersucht, wobei das verwendete Studiendesign immer gleich war. Von einem Paraffinblock wurden mehrere Stenzen entnommen und es wurde geklärt, ob die Befunde von einer, zwei, drei oder mehr Stenzen die Befunde an einen korrespondierenden Großschnitt, gefärbt mit dem gleichen Antikörper, am besten repräsentieren könnte. Alle diese Studien haben gezeigt, dass mehrere Stenzen pro Gewebeblock die Befunde am korrespondierenden Großschnitt besser repräsentieren, als nur eine Stanze (Al Kuraya, Simon, & Sauter, 2004). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Repräsentativität mit der Zahl der entnommenen und untersuchten Stenzen bis zu einem gewissen Grenzwert ansteigt und dass ab diesem Grenzwert, die Verwendung weiterer Stenzen, keine Verbesserung der Repräsentativität ergibt (Dancau, Simon, Mirlacher, & Sauter, 2016). Am Institut für Pathologie des Universität Klinikum Eppendorfs werden trotz dieser Studienlage nur Tissue Microarrays gebaut, die lediglich eine Probe pro Patienten aufweisen. Dafür gibt es zwei wesentliche Gründe. Das klassische Einstanzenprinzip verhindert, dass ungleiche Gewebemengen pro Tumor zur Untersuchung kommen. Dies ist deswegen wichtig, weil die genannten Studien gezeigt haben, dass die Häufigkeit von positiven Befunden mit der Zahl

der untersuchten Stenzen pro Tumor zunimmt. Da immer ein Teil, der in einem TMA eingebrachten Gewebezylinder, kein beurteilbares Tumorgewebe beinhaltet, gäbe es bei Verwendung mehrerer Stenzen pro Tumor in einem TMA zwangsläufig Patienten, bei denen eine, zwei oder gar mehr als zwei Stenzen auswertbar wären, sodass die Vergleichbarkeit zwischen den Befunden dieser Patienten eingeschränkt wäre. Der zweite und wichtigere Grund, auf mehrere Stenzen zu verzichten, liegt darin, dass mehrere Stenzen pro Tumor den Aufwand für eine Studie und den Gewebeverbrauch pro Studie vervielfachen, ohne dass ein gesicherter Mehrwert entsteht. Die Intention einer Untersuchung molekularer Marker an einem TMA ist es nämlich nicht, Daten zu generieren, die repräsentativ für einen Gewebestück sind, sondern Daten, die repräsentativ für den Tumor sind. Da ein Gewebestück nur eine kleine Teilmenge eines gesamten Tumors beinhaltet, ist es unsicher, ob ein solcher Gewebestück die Gesamtsituation in einem Tumor optimal abbildet. Nur eine einzige der bisher durchgeführten Studie, zur Repräsentativität von TMA Befunden, hat an einem TMA Spot erhobene Daten mit an einem korrespondierenden Großschnitt erhobenen Daten und mit dem klinischen Verlauf der entsprechenden Patienten verglichen. Die Studie von Torhorst et al. an mehr als 500 Mammakarzinomen hatte überraschenderweise gezeigt, dass am Großschnitt zwar doppelt so häufig eine p53 Positivität gefunden wurde, als an den aus dem gleichem TMA Block hergestellten TMA Stanzzylinder, das aber nur der TMA p53 Befund und nicht der Großschnitt p53 Befund prognoserelevant war (Torhorst, et al., 2001). Aus diesen Daten muss man schließen, dass in diesem speziellen Fall am Großschnitt biologisch irrelevante oder artifizielle Befunde erhoben wurden, die an der TMA Stanze nicht sichtbar waren und dass dadurch die Beschränkung auf ein kleineres Gewebestück einen günstigen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie hatte. Ein weiteres schwer zu widerlegendes Argument für die Verwendung einer Stanze pro Tumor ist die Tatsache, dass alle in der Literatur etablierten Zusammenhänge zwischen molekularen Parametern und den klinischen Patientenverlauf an derartigen TMAs reproduziert werden konnten. Studien hatten unter anderem gezeigt, dass die Expression von Östrogen (Ristimäki, et al., 2002) und Progesteronrezeptoren, die HER2 Amplifikation (Shokouh, et al., 2015), ein positiver p53 Status (Torhorst, et al., 2001) und ein hoher Ki67 labeling Index beim Mammakarzinom (Ruiz, et al., 2005) mit einer

ungünstigen Prognose assoziiert sind. Für das Urothelkarzinom konnte sogar der prognostische Einfluss der histologischen Gradierung an 0,6mm messenden Gewebestücken reproduziert werden (Simon, et al., 2001). Beim Prostatakarzinom konnten die etablierten Prognosemarker p53 Alteration (Schlomm, et al., 2008) und PTEN Deletion (Burdelski, et al., 2015) von der Arbeitsgruppe der Universitätsklinikum Eppendorf Pathologie am TMA validiert werden. Darüber hinaus wurden an einem Prostatakarzinom TMA am UKE mehr als 20 verschiedene molekulare Prognosefaktoren identifiziert (Burdelski, et al., 2014). Es ist nicht anzunehmen, dass aufgrund von nicht repräsentativen Befunden am TMA molekulare Befunde „fälschlicherweise“ prognoserelevant werden.

Für die Quantifizierung von CD8 positiven Lymphozyten in Weichteiltumoren waren in der Vergangenheit mehrere verschiedene Methoden verwendet worden. Diese beinhalten das manuelle Auszählen an TMA (Boxberg, et al., 2018), das manuelle Auszählen an Großschnitten (Oike, et al., 2018) (Fujii, et al., 2014), die automatische Auszählung im Rahmen einer digitalen Bildanalyse (Nowicki, et al., 2017), (Sundara, et al., 2017), aber auch einfaches Schätzen der Lymphozytenzahl an Großschnitten (Doyle, et al., 2019). Das in dieser Studie eingesetzte Verfahren war bereits früher auf die spezielle Situation am Tissue Microarray adaptiert worden. Der verwendete Algorithmus zählt nicht nur die Zahl der CD8 markierten Lymphozyten pro Gewebefragment, sondern misst auch die Fläche jedes untersuchten Gewebes, sodass der Wert „Zahl der CD8 positiven Lymphozyten/mm²“ für jeden einzelnen Gewebespot genau berechnet wird. Da im Tumorgewebe Proben manchmal auch Hohlräume enthalten, wie zum Beispiel Gefäße oder Luftblasen, kommt es vor, dass einzelne TMA Spots nicht einer kreisrunden Fläche mit einem Durchmesser von 0,6mm entsprechen, sondern nur eine Teilmenge dieser Fläche darstellen. Repräsentative Bilder für inkomplette TMA Spots sind in Abb. 39 und 40 dargestellt.

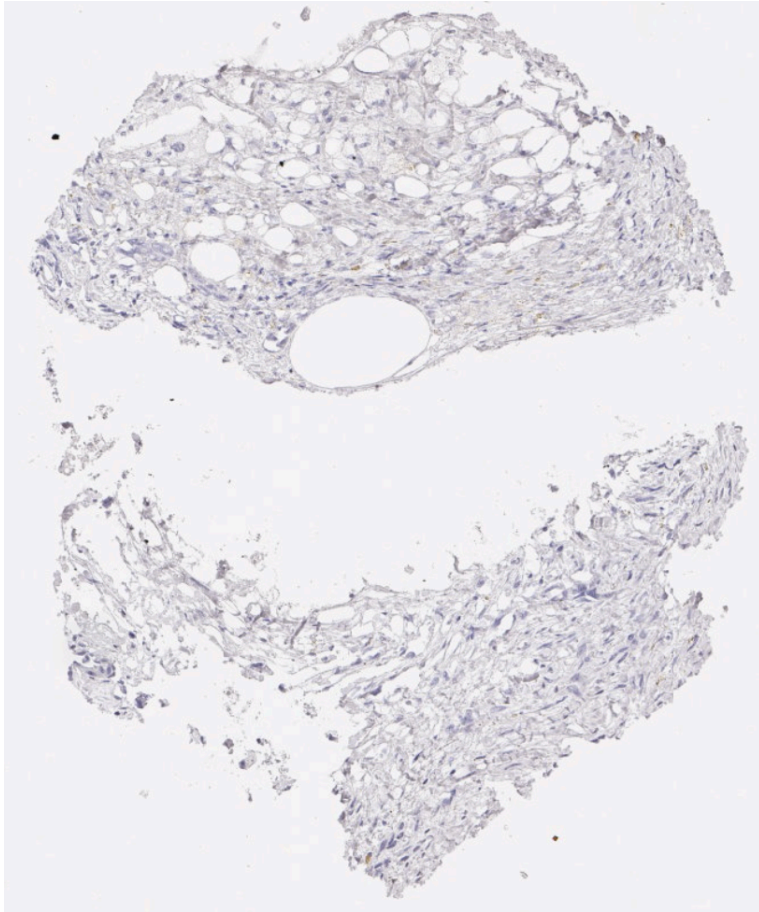


Abbildung 39: Beispiel eines inkompletten TMA Spots

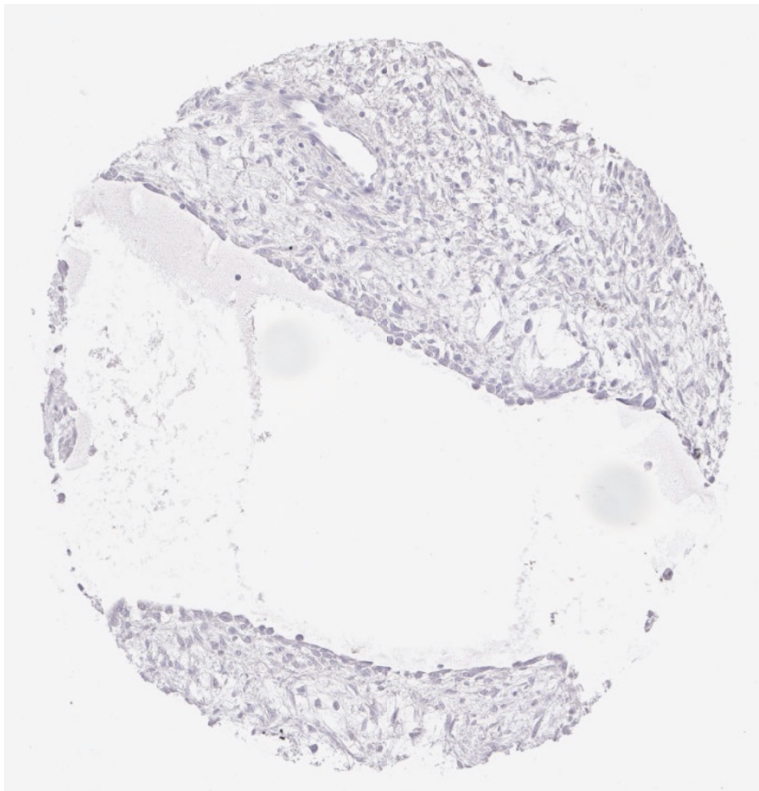


Abbildung 40: Beispiel eines unvollständigen TMA Spots

Die immunhistochemische Untersuchung von PD-L1 zeigte zunächst, dass in Weichteiltumoren die PD-L1 Expression fast ausschließlich Tumorzellen vorbehalten ist. Dies passt zu Daten von Kim et al., Boxberg et al. und Que et al., welche auch die PD-L1 Expression in Tumorzellen und Entzündungszellen separat untersucht hatten und deutlich mehr PD-L1 Positivität in Tumorzellen als in Entzündungszellen gefunden hatten (Kim, et al., 2013) (Boxberg, et al., 2018) (Que, et al., 2017). Allerdings hatten andere Untersucher, zumindest in 44 Sarkomen von 50 Tumoren eine prädominante PD-L1 Färbung in Entzündungszellen und wenig in Tumorzellen (6 von 50 Tumoren) gefunden (D'Angelo, et al., 2015). Es wäre denkbar, dass die Diskrepanz zwischen Studien bezüglich der Frage Tumorzell- versus Entzündungszellpositivität für PD-L1 daher rührt, dass PD-L1 positive Tumorzellen und PD-L1 positive Makrophagen in der Realität teilweise schwierig voneinander zu unterscheiden sind. Es ist davon auszugehen, dass Untersucher sich in ihrer Herangehensweise, bei fraglicher Zuordnung einer PD-L1 positiven Zelle zu Entzündungs- oder Tumorzellen, unterscheiden. Im Institut für Pathologie des UKEs werden fragliche Einzelzellen allerdings eher zu den Entzündungszellen, als zu den Tumorzellen gruppiert. Anzumerken ist auf jeden Fall, dass es Tumoren gibt, bei denen die PD-L1 Expression, wenn sie auftritt, fast ausschließlich in Entzündungszellen vorkommt (Chovanec, et al., 2017). Ein Beispiel hierfür ist das Seminom, bei dem die Tumorzellen praktisch nie PD-L1 exprimieren (Dissertation Pierre Zimmermann, Manuskript in Vorbereitung). Die Daten dieser Studie zeigen, dass Weichteiltumoren definitiv nicht in diese Kategorie von Tumoren gehören.

Maligne Tumoren zeigten deutlich häufiger eine PD-L1 Positivität in Tumorzellen, als benigne Tumoren, bei denen sich in unserer Untersuchung von 398 benignen Neoplasien kein einziger PD-L1 positiver Fall zeigte. Auch andere Autoren hatten mehr PD-L1 Positivität in malignen, als in benignen Tumoren gefunden (Kostine, et al., 2016). Für Weichteiltumoren fand sich zum Beispiel eine PD-L1 Positivität in benignen Tumoren (Neurofibrom und Schwannom) in 2,9%, aber bei malignen Tumoren (MPNST) in 16,9% der Fälle (Shurell, et al., 2016). Auch, dass eine PD-L1 Expression beim Kolonkarzinom (Chen, et al., 2018) oder beispielsweise beim Nierenzellkarzinom (Lu, et al., 2020) mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist, passte zu einer Rolle der PD-L1 Positivität für die Tumoraggressivität. Auch

das besonders häufige Vorkommen von PD-L1 positiven Tumorzellen in malignen Mesotheliomen und sarkomatoiden Karzinomen, zwei besonders aggressiven Tumorentitäten, welche nicht zu den Weichteiltumoren zu rechnen sind, passt zum Konzept einer erhöhten Tumoraggressivität bei PD-L1 positiven Neoplasien.

PD-L1 positive Entzündungszellen fanden sich in unserem Tumorkollektiv nur in einer kleinen Zahl von Fällen, wobei lediglich 5 von 31 Tumortypen betroffen waren. Zu den Tumortypen mit besonders hoher Häufigkeit von PD-L1 positiven Entzündungszellen gehörten neben dem Mesotheliom und dem sarkomatoiden Karzinom, die beiden Tumortypen, welche wegen der weichteiltumorähnlichen Morphologie in die Studie eingeschlossen wurden, das Spindelzellsarkom, eine Entität, bei der 2 Tumoren zur Untersuchung gelangten. Zu den am häufigsten von PD-L1 positiven Tumorzellen betroffenen Weichteiltumoren gehörten wiederum maligne Neoplasien, insbesondere das Sarkom NOS (11,1%) mit PD-L1 positiven Entzündungszellen und das Chondrosarkom (16,7%). Andere Untersuchungen hatten mehr PD-L1 positive Entzündungszellen gefunden. So fanden Paydas et al. bei 20 Sarkomen in 30% der Tumoren PD-L1 positive Entzündungszellen (Paydas, Bagir, Deveci, & Gonlusen, 2016). D' Angelo et al. fanden bei 15 Sarkomen in 30% der Tumoren PD-L1 positive Lymphozyten (D'Angelo, et al., 2015). Boxberg et al. fanden bei 10 Tumoren in 27,8% von 36 untersuchten Fällen PD-L1 positive Entzündungszellen (Boxberg, et al., 2018). Es wäre denkbar, dass die Art der verwendeten Antikörper bzw. das Immunhistochemieprotokoll für Diskrepanzen zwischen verschiedenen Studien verantwortlich sein könnten. Allerdings verwendeten wir in dieser Studie den Antikörper E1L3N von Cell Signaling Technology. Dieser Antikörper gilt generell besonders sensitiv für den PD-L1 Nachweis an formalinfixierten Gewebe (Kostine, et al., 2016) (Doyle, et al., 2019) (Arantes, et al., 2017) (van Erp, et al., 2017) (Patel, et al., 2018) (Sundara, et al., 2017) (Que, et al., 2017) (Spurny, et al., 2018) (Kösemehtoglu, Özogul, Babaoglu, Güler Tezel, & Gedikoglu, 2017).

Die Quantifizierung CD8 positiver tumorinfiltrierender Lymphozyten ergab eine deutliche Abhängigkeit der Lymphozytenzahl vom Tumortyp. Eine besonders hohe Zahl tumorinfiltrierender Lymphozyten fand sich bei malignen Tumoren, wo die durchschnittliche Zahl CD8 positiver Zellen mit 235,8 mehr als doppelt so

hoch war als in benignen Tumoren (106,8 Zellen/mm²). Andere Studien hatten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Zahl tumorinfiltrierender Lymphozyten zwischen benignen und malignen Tumoren gefunden (Shurell, et al., 2016). Die besondere Bedeutung der lymphozytären Infiltrate für maligne Tumoren lässt sich auch in der Rangliste der Tumoren nach ihrer durchschnittlichen CD8 Dichte erkennen (Abb. 24, Seite 37). Dabei befindet sich der lymphozytäreichste benigne Tumor, das Angiomyolipom mit durchschnittlich 176 CD8 positiven Lymphozyten/mm² auf Rang 13. Dieser Befund passt zum Konzept, dass eine lymphozytäre Reaktion auf einem Tumor insbesondere dann auftritt, wenn eine Neoplasie durch eine aggressive lokoregionale Expansion zu Irritationen des umliegenden Gewebes führt. Dies dürfte bei langsam wachsenden, scharf begrenzten Tumoren weniger der Fall sein als bei invasiv wachsenden Neoplasien.

Der herausragende Befund unserer Untersuchung war die hochsignifikante Beziehung zwischen dem Vorliegen einer tumoralen PD-L1 Expression und einer hohen Zahl intratumoraler CD8 positiver Lymphozyten. Dass sich diese Beziehung nicht nur bei Untersuchung aller Tumoren, sondern auch in histologisch homogenen Unterkollektiven von Angiosarkomen, Liposarkomen, sarkomatoiden Karzinomen und Mesotheliomen fand, und dass diese Beziehung unabhängig vom gewählten Cutoff war, spricht dafür, dass es sich bei diesem Befund um eine wichtige, allgemeingültige biologische Beziehung handelt. Für eine prinzipielle Bedeutung dieses Befundes passt es auch, dass identische Zusammenhänge kürzlich von Tumorforschern der UKE Pathologie für das Nierenzellkarzinom und das Kolonkarzinom gefunden werden konnten (Mandelkow, et al., 2019). Dabei waren die Ergebnisse beim Kolonkarzinom und beim Nierenzellkarzinom ähnlich deutlich wie bei Sarkomen mit einer mindestens doppelt, meist aber drei bis viermal höheren Lymphozytenzahlen in PD-L1 positiven als in PD-L1 negativen Tumoren. Die Gesamtheit dieser Befunde spricht dafür, dass die PD-L1 Expression in Tumoren eine direkte Reaktion auf die lymphozytäre Attacke durch das Tumormicroenvironment darstellt. Angesichts der bekannten Beziehung eines hohen Lymphozytengehaltes in Tumoren mit einer gesteigerten Immunogenität von Tumoren wie beispielsweise im Falle einer hohen Mutationslast oder einer Mikrosatelliteninstabilität, könnte folgendes Szenario postuliert werden: Hoch immunogene Tumore provozieren

eine starke lymphozytäre antitumorale Reaktion. Unter diesen Bedingungen besitzen Tumorzellen, mit der Fähigkeit zur PD-L1 Überexpression, einen Selektionsvorteil, sodass PD-L1 exprimierende Tumore selektioniert werden. Die PD-L1 Expression von Tumorzellen wäre somit einer der möglichen Schutzmechanismen gegen einen Angriff durch mobilisierte zytotoxische T-Zellen. Dementsprechend müssten PD-L1 positive Weichteiltumoren auf eine Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren, welche sich gegen die PD-1/PD-L1 Achse richten, ansprechen. Bisherige Studien haben allerdings diesbezüglich gemischte Ergebnisse erzielt. Tawbi et al. fanden in einer Studie an 40 Tumoren nur eine geringe Ansprechrate auf Pembrolizumab (gegen PD-1 gerichtet) (Tawbi, et al., 2017). Studien, welche gleichzeitig das Ausmaß der infiltrierenden zytotoxischen T-Zellen und die PD-L1 Expression auf ihre prädiktive Rolle untersucht haben, fehlen bisher. Unsere Daten deuten darauf hin, dass es aber Sinn machen könnte, diese beiden hochkorrelierten Parameter gleichzeitig zu analysieren.

Die gleichzeitige Untersuchung vieler Tumortypen mit einem einheitlichen immunhistochemischen Protokoll für die PD-L1 Anfärbung und einer identischen Auswertungsmethode erlaubt es, die relative Bedeutung der PD-L1 Expression in Weichteiltumoren zu bestimmen und eine Rangliste zu definieren nach der Häufigkeit der PD-L1 Positivität. Die von uns erhobenen Befunde sind in Abbildung 38 im Kontext der früheren Literatur dargestellt. Dabei machen die grafisch dargestellten kontroversen Befunde aus der Literatur deutlich, wie wichtig es ist, vergleichende Untersuchung verschiedener Tumorarten mit einheitlicher Methodologie durchzuführen. Unsere Daten zeigen, dass eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, welche sich gegen die PD1/PD-L1 Achse richten, insbesondere bei den Tumortypen Sarkomatoides Karzinom, Mesotheliom, Chondrosarkom, NOS, Angiosarkom, Angiomyolipom, Leiomyosarkom und Liposarkom erfolgreich sein könnte. Die Ursachen für die diskrepanten Literaturbefunde sind schwer zu ergründen, da viele Studien gezeigt haben, dass die Detektionsrate unterschiedlicher Antikörper sich nicht wesentlich unterscheidet (Cohen, Eleyan , Zick, Peretz, & Katz, 2018) (Chen, et al., 2019) und dass sich selbst laborspezifische, selbst etablierte PD-L1 Immunhistochemieprotokolle, unter Verwendung nicht FDA zugelassener Antikörper, vergleichbare PD-L1 Resultate erbringen, wie FDA zugelassene

Antikörper (Arantes, et al., 2017) (Kostine, et al., 2016) (van Erp, et al., 2017) (Que, et al., 2017) (Sundara, et al., 2017) (Patel, et al., 2018) (Kösemehtmetoglu, Özogul, Babaoglu, Güler Tezel, & Gedikoglu, 2017) (Spurny, et al., 2018) (Doyle, et al., 2019). Es müsste eigentlich angenommen werden, dass den Auswertekriterien für die Diskrepanzen in der Literatur eine besondere Rolle zukommt. Allerdings zeigen die Daten unserer Studie auch, dass unterschiedliche Cutoffs (mit Ausnahme eines extremen Cutoff von 50%) zu keinen erheblichen Unterschieden in der Zahl der als PD-L1 positiv identifizierten Tumoren führen, sodass die Ursache für die divergente Literatur letztlich unklar bleibt.

Zusammenfassung

Das PD-L1/PD-1 Regelsystem spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der T-Zell vermittelten Immunantwort und verhindert insbesondere überschießende Immunreaktionen. Die Blockade des PD-L1/PD-1 Regelsystems durch blockierende Antikörper (sogenannte Immuncheckpoint-Inhibitoren) spielt heute in der medikamentösen Tumorthherapie eine zentrale Rolle. Da aber nicht alle malignen Tumoren auf eine derartige Behandlung ansprechen, werden heute viele Tumoren regelmäßig auf mögliche prädiktive Parameter für das Ansprechen auf Checkpoint-Inhibitoren untersucht. Zu den wesentlichen prädiktiven Parametern gehört in erster Linie die Expression von PD-L1 in Tumor- und/oder Entzündungszellen. Ein anderer, viel diskutierter Parameter ist die Zahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten, speziell der zytotoxischen (CD8 positiven) T-Lymphozyten. Frühere Untersuchungen hatten, sowohl zur PD-L1 Expression wie auch zur Dichte tumorinfiltrierender Lymphozyten, bei Weichteiltumoren, wahrscheinlich in erster Linie wegen Verwendung unterschiedlicher Methoden, divergente Ergebnisse erzielt. Um eine umfassende Übersicht über die PD-L1 Expression, die Zahl CD8 positiver Lymphozyten und den Zusammenhang dieser beiden Parameter in Weichteiltumoren zu gewinnen, wurde für diese Untersuchung ein Tissue Microarray bestehend aus 823 Tumoren von 31 unterschiedlichen Tumortypen hergestellt. Der Array umfasste 398 verschiedene benigne Weichgewebstumoren, 349 verschiedene maligne Weichgewebstumoren, sowie die Kategorien maligne Mesotheliome (n=51) und sarkomatoide Karzinome (der Harnblase) (n=25), welche als Sarkom ähnliche Tumoren in die Studie inkludiert wurden. Der Tissue Microarray wurde immunhistochemisch mit Antikörper gegen PD-L1 und CD8 untersucht, wobei die PD-L1 Expression manuell evaluiert wurde und die Zahl der CD8 positiven Lymphozyten durch eine automatisierte digitale Bildanalyse. Eine PD-L1 Expression in Tumorzellen fand sich ausschließlich bei malignen Tumoren und zwar in 1 von 2 Spindelzellsarkomen, 48% von 25 sarkomatoiden Karzinomen, 18,2% der 22 nicht epitheloiden Mesotheliome, 14,3% von 7 Chondrosarkomen, 10,3% von 29 epitheloiden Mesotheliomen, 8,1% von 37 Angiosarkomen, 10% von 70 Sarkomen NOS, 2,9% von 35 Leiomyosarkomen und 2,7% von 73 Liposarkomen. PD-L1 positive Entzündungszellen fanden sich ebenfalls überwiegend in malignen Tumortypen nämlich in 13,6% von 22 sarkomatoiden

Karzinomen, 7,4% von 27 epitheloiden Mesotheliomen, 1,4% von 72 Liposarkomen, 1,4% von 69 Sarkomen NOS. Unter den benignen Tumoren fand sich eine PD-L1 Expression in Entzündungszellen nur in einem Tumor, einem Angiomyolipom (1,1%, 1/88). Die PD-L1 Expression zeigte weder für Tumorzellen, noch für Entzündungszellen, noch die Kombination, einen Zusammenhang zu pT, Differenzierungsgrad, pN und R-Status. Die CD8-Dichte (CD8 positive Zellen -mm²) war bei malignen Weichteiltumoren deutlich höher (235,8±23,7) als in benignen Weichteiltumoren (106,8±23, p<0,0001). Der Vergleich mit histologischen Parametern für Tumoraggressivität ergab für die Sarkome eine statistisch signifikante Abnahme der Dichte CD8 positiver Lymphozyten von pT1 (n=8, 504,9 Zellen / mm²) über pT2 (n=33, 76,7) und pT3 (n=5, 56,4) zu pT4 (n=5, 30,0, p=0,0261) aber keinen signifikanten Zusammenhang zu Differenzierungsgrad, Nodalstatus oder R-Status. Der Vergleich von PD-L1 Expression und CD8-Dichte ergab in PD-L1 positiven Tumoren deutlich höhere Lymphozytenzahlen als in PD-L1 negativen Tumoren. Unabhängig davon, ob der PD-L1 Status von Tumorzellen, Entzündungszellen oder die Kombination beider Parameter berücksichtigt wurde, war die Korrelation mit der CD8 Dichte für alle Cutoffs (1%, 5%, 10%, 50%) für die Kategorien aller Tumoren aller Sarkome, Angiosarkome und Liposarkome jeweils hoch signifikant (p<0,0001). Auch numerisch waren die Unterschiede eklatant. Für alle Sarkome fanden sich bei einem Cutoff von 5% bei 732 PD-L1 negativen Tumoren im Durchschnitt 141,64 (±15,96) CD8-positive Lymphozyten, während die entsprechende Zahl bei 15 PD-L1 positiven Tumoren 1100,66 (±111,49) war. Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Studie, dass die PD-L1 Expression bei Sarkomen generell ein seltenes Ereignis ist, aber hochsignifikant mit einer erhöhten Lymphozytendichte einhergeht. Der enge Zusammenhang zwischen PD-L1 Expression und hoher CD8-Lymphozytendichte spricht für einen direkten funktionellen Zusammenhang zwischen diesen Befunden und somit dafür, dass die PD-L1 Expression eine Folge der lymphozytären „Immun-Attacke“ darstellt. Die Entwicklung der Fähigkeit zur PD-L1 Expression in Tumorzellen ist somit ein adaptiver Mechanismus, zur Vermeidung einer Tumor-Eliminierung durch die Immunantwort.

Abkürzungsverzeichnis

WHO	World Health Organization
CHOP-Gen	C/EBP homologous protein
PD-1	Programmed death protein 1
PD-L1	Programmed death ligand 1
TMA	Tissue Microarray
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
NOS	Not otherwise specified
PNET	Primitiv neuroektodermaler Tumor
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
pT	Pathologische Einteilung des Primärtumors
R	Resektionsstatus
pN	Pathologische Einteilung des Nodalstatus
CD8	Cluster of differentiation 8
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
FDA	Food and Drug Administration
UPS	undifferenziertes pleomorphes Sarkom
vs	versus

Literaturverzeichnis

- Al Kuraya, K., Simon, R., & Sauter, G. (2004). Tissue microarrays for high-throughput molecular pathology. *Ann Saudi Med.*, 169-74.
- Alves, P. M., de Arruda, J. A., Arrantes, D. A., Costa, S. F., Souza, L. L., Pontes, H. A., . . . Nonaka, C. F. (2019). Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in osteosarcomas of the jaws: a multicenter study. *Virchows Archiv*, 201-207.
- Arantes, D., DDS, MS, Goncalves, A., DDS, MS, . . . Jham, B. (2017). Evaluation of HLA-G, HLA-E, and PD-L1 proteins in oral osteosarcomas. *Oral and Maxillofacial Pathology*, 188-196.
- Baretton, G. (2016). *PD-L1 als neuer Biomarker*. Universitätsklinik Dresden.
- Berghuis, D., Santos, S., Baelde, H., Taminiu, A., Egeler, M., Schilham, M., . . . Lankester, A. (2011). Pro-inflammatory chemokine-chemokine receptor interactions within the Ewing sarcoma microenvironment determine CD8(+) T-lymphocyte infiltration and affect tumour progression. *Journal of Pathology*, 347-57.
- Boxberg, M., Steiger, K., Lenze, U., Rechl, H., von Eisenhart-Rothe, R., Wörtler, K., . . . Specht, K. (2018). PD-L1 and PD-1 and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes in high grade sarcomas of soft tissue-prognostic implications and rationale for immunotherapy. *Oncoimmunology*, 1389366.
- Burdelski, C., Matuzewska, A., Kluth, M., Koop, C., Grupp, K., Steurer, S., . . . Simon, R. (2014). Qualitative and Quantitative Requirements for Assessing Prognostic Markers in Prostate Cancer. *Microarrays (Basel)*, 137-58.
- Bubendorf, L., Nocito, A., Moch, H., & Sauter, G. (2001). Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *Journal of Pathology*, 72-9.
- Burdelski, C., Menan, D., Tsourlakis, M. C., Kluth, M., Hube-Magg, C., Melling, N., . . . Steu. (2015). The prognostic value of SUMO1/Sentrin specific peptidase 1 (SEN1) in prostate cancer is limited to ERG-fusion positive tumors lacking PTEN deletion. *BMC Cancer*.
- Chen, J., Valle, L., Lin, H.-Y., Plaisance-Bonstaff, K., Forrest, J., Post, S., & Qin, Z. (2019). Expression of PD-1 and PD-Ls in Kaposi's sarcoma and regulation by oncogenic herpesvirus lytic reactivation. *Virology*, 16-19.

- Chen, X.-Y., Hou, L.-D., Zhang, R., Chen, W., Fan, H.-N., Huang, Y.-X., . . . Zhu, J.-S. (2018). Upregulation of PD-L1 predicts poor prognosis and is associated with miR-191-5p dysregulation in colon adenocarcinoma. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*.
- Chibon, F., & Aurias, A. (2007). Molecular biology of soft tissue sarcoma. *Oncologie* 9, 88-96.
- Chovanec, M., Cierna, Z., Miskovska, V., Machalekova, K., Svetlovska, D., Kalavska, K., . . . Mego, M. (2017). Prognostic role of programmed-death ligand 1 (PD-L1) expressing tumor infiltrating lymphocytes in testicular germ cell tumors. *Oncotarget*, 21794-21805.
- Cohen, J., Eleyan, F., Zick, A., Peretz, T., & Katz, D. (2018). Intratumoral immune-biomarkers and mismatch repair status in leiomyosarcoma-potential predictive markers for adjuvant treatment: a pilot study. *Oncotarget*, 30847-30854.
- Crago, A., MD, PhD, FACS, & Dickson, M. (2016). Liposarcoma: multimodality management and future targeted therapies. *Surg Oncol Clin*, 761-73.
- Dancau, A.-M., Simon, R., Mirlacher, M., & Sauter, G. (2016). Tissue Microarrays. *Methods Mol Biology*, 49-60.
- D'Angelo, S., MD, Shoushtari, A., MD, Agaram, N., Kuk, D., . . . Carvajal, R. (2015). Prevalence of tumor infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in the soft tissue sarcoma microenvironment. *HHS*, S. 357-365.
- Doyle, L., Nowak, J., Nathenson, M., Thornton, K., Wagner, A., Johnson, J., . . . Sholl, L. (2019). Characteristics of mismatch repair deficiency in sarcomas. *Modern Pathology*, 977-987.
- Fenzl, L., Mehrmann, M., Kremp, K., & Schneider, G. (2017). Weichteiltumoren: Epidemiologie, Klassifikation und Stadieneinteilung. *Radiologe*, 973-986.
- Fujii, H., Arakawa, A., Utsumi, S., Yamamoto, Y., Kitoh, A., Ono, M., . . . Kato, M. (2014). CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes at primary sites as a possible prognostic factor of cutaneous angiosarcoma. *International Journal of Cancer*, 2393-2402.
- Gaballah, A., Jensen, C., Palmquist, S., Pickhardt, P., Duran, A., Broering, G., & Elsayes, K. (2017). Angiosarcoma: clinical and imaging features from head to toe. *Br J Radiol*, 20170039.

- Gong, C., Anders, R., Zhu, Q., Taube, J., Green, B., Cheng, W., . . . Popel, A. (2018). Quantitative Characterization of CD8+ T Cell Clustering and Spatial Heterogeneity in Solid Tumors. *frontiers in Oncology*, 649.
- Grünewald, T., Alonso, M., Avnet, S., Banito, A., Burdach, S., Cidre-Aranaz, F., . . . Gonzalez-Gonzalez, L. (2020). Sarcoma treatment in the era of molecular medicine. *EMBO Molecular Medicine*, 11131.
- Guy, L., Lazar, A., & Lev, D. (2008). Sarcoma Epidemiology and Etiology: Potential Environmental and Genetic Factors. *Surgical Clinics of North America*, 451-481.
- He, M., Abro, B., Kaushal, M., Chen, L., Chen, T., Gondim, M., . . . Pfeifer, J. (2020). Tumor mutation burden and checkpoint immunotherapy markers in primary and metastatic synovial sarcoma. *Human pathology*, 15-23.
- Heinzerling, L., de Toni, E., Schett, G., Hundorfean, G., & Zimmer, L. (2019). Checkpoint-Inhibitoren Diagnostik und Therapie von Nebenwirkungen. *Deutsches Ärzteblatt*, 119-26.
- Hinsch, A., Blessin, N. C., Simon, R., Kluth, M., Fischer, K., Hube-Magg, C., . . . I. (2019). Expression of the immune checkpoint receptor TIGIT in seminoma. *ONCOLOGY LETTERS*, 1497-1502.
- Kösemehmetoglu, K., Özogul, E., Babaoglu, B., Güler Tezel, G., & Gedikoglu, G. (2017). Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in malignant mesenchymal tumors. *Turk Patoloji Derg*, 192-197.
- Kasper, B. (2019). *Behandlung von Weichgewebssarkomen, Knochensarkomen und GIST: Aktueller Stand und neueste Informationen vom ASCO 2019* . Sarcoma Patients EuroNet.
- Keung, E., Burgess, M., Salazar, R., Cuentas, E., Rodrigues-Canales, J., Bolejack, V., . . . Okuno, S. (2020). Correlative Analyses of the SARCO28 Trial Reveal an Association Between Sarcoma-Associated Immune Infiltrate and Response to Pembrolizumab. *Clin Cancer Res.*, 1258-1266.
- Keung, E., Tsai, J.-W., & Roland, C. (2017). Analysis of the immune infiltrate in undifferentiated pleomorphic sarcoma of the extremity and trunk in response to radiotherapy: Rationale for combination neoadjuvant immune checkpoint inhibition and radiotherapy. *Oncoimmunology*, 1385689.
- Kim, C., Kim, E., Jung, H., Chon, H., Han, J., Shin, K.-H., . . . Ahn, J. (2016). Prognostic implications of PD-L1 expression in patients with soft tissue sarcoma. *BMC Cancer*, 434.

- Kim, R., Moon, Y., Kwon, K., Bae, J., Wagle, S., Kim, K., & Park, H. (2013). Tumor Infiltrating PD1-Positive Lymphocytes and the Expression of PD-L1 Predict Poor Prognosis of Soft Tissue Sarcomas. *PLOS One*, 82870.
- Kim, S., Klempner, S., Park, S., Park, J., Park, Y., Lim, H., . . . Lee, J. (2017). Correlating programmed death ligand 1 (PD-L1) expression, mismatch repair deficiency, and outcomes across tumor types: implications for immunotherapy. *Oncotarget*, 77415-77423.
- Koirala, P., Roth, M., Gill, J., Piperdi, S., Chinai, J., Geller, D., . . . Gorlick, R. (2016). Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma. *Scientific Reports*, 30093.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Bärland, M., Schraml, P., Leighton, S., . . . Kallioniemi, O. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. (S. 844-847). *Nat Med*.
- Kostine, M., Cleven, A., de Miranda, N., Italiano, A., Cleton-Jansen, A.-M., & Bovée, J. (2016). Analysis of PD-L1, T-cell infiltrate and HLA expression in chondrosarcoma indicates potential for response to immunotherapy specifically in the dedifferentiated subtype. *Modern Pathology*, 1028-1037.
- Lu, Y., Song, Y., Xu, Y., Ou, N., Liang, Z., Hu, R., . . . Liu, X. (2020). The prevalence and prognostic and clinicopathological value of PD-L1 and PD-L2 in renal cell carcinoma patients: a systematic review and meta-analysis involving 3,389 patients. *Translational Andrology and Urology*, 367-381.
- Machado, I., Lopez-Guerrero, J., Scotlandi, K., Picci, P., & Liombart-Bosch, A. (2018). Immunohistochemical analysis and prognostic significance of PD-L1, PD-1, and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT). *Virchows Archiv*, 815-824.
- Mandelkow, T., Blessin, N. C., Lueerss, E., Pott, L., Simon, R., Li, W., . . . Lutz, F. (2019). Immune Exclusion Is Frequent in Small-Cell Carcinoma of the Bladder. *Hindawi*, 2532518.
- Marko, J., MD, & Wolfman, D. (2018). Retroperitoneal Leiomyosarcoma From the Radiologic Pathology Archives. *Radiographics*, 1403-1420.
- Mika, A., Luelling, S., Pavek, A., Nartker, C., Heyneman, A., Jones, K., & Barrott, J. (2019). Epigenetic Changes at the Birc5 Promoter Induced by YM155 in Synovial Sarcoma. *Clinical Medicine*, 408.

- Nowicki, T., Akiyama, R., Huang, R., Shintaku, I., Wang, X., & Tumei, P. (2017). Infiltration of CD8 T cells and expression of PD-1 and PD-L1 in synovial sarcoma. *Cancer Immunol Res.* , 118-126.
- Oike, N., Kawashima, H., Ogose, A., Hotta, T., Hatano, H., Ariizumi, T., . . . Endo, N. (2018). Prognostic impact of the tumor microenvironment in synovial sarcoma. *Wiley Cancer Science*, 3043-3054.
- Park, H. K., Kim, M., Sung, M., Lee, S. E., Kim, Y. J., & Choi, Y.-L. (2018). Status of programmed death-ligand 1 expression in sarcomas. *Journal of Translational Medicine*, 303.
- Park, S., Cho, S., Kim, M., Park, J., Jeong, E., Choi, E., . . . Chang, M. (2018). Dermatofibrosarcoma protuberans: A retrospective study of clinicopathologic features and related Akt/mTOR, STAT3, ERK, cyclin D1, and PD-L1 expression. *American Academy of Dermatology*, 843-852.
- Patel, K., MD, Martinez, A., MD, Stahl, J., MD, . . . Chowdhary, M. (2018). Increase in PD-L1 expression after pre-operative radiotherapy for soft tissue sarcoma. *Oncoimmunology*, 1442168.
- Paydas, S., Bagir, E., Deveci, M., & Gonlusen, G. (2016). Clinical and prognostic significance of PD-1 and PD-L1 expression in sarcomas. *Med Oncol*, 93.
- Petersen, I. (2013). The new WHO classification and recent results in soft tissue tumor pathology. *Pathologie*, 436-48.
- Que, Y., Fang, Z., Guan, Y., Xiao, W., Xu, B., Zhao, J., . . . Zhang, X. (2019). LAG-3 expression on tumor-infiltrating T cells in soft tissue sarcoma correlates with poor survival. *Cancer Biol Med*, 331-340.
- Que, Y., Xiao, W., Guan, Y.-x., Liang, Y., Yan, S.-m., Chen, H.-y., . . . Zhang, X. (2017). PD-L1 Expression Is Associated with FOXP2+ Regulatory T-Cell Infiltration of Soft Tissue Sarcoma and Poor Patient Prognosis. *Journal of Cancer*, 2018-2025.
- Riede, U.-N., Werner, M., & Schaefer, H.-E. (2004). *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Thieme.
- Riede, U.-N., Werner, M., & Schaefer, H.-E. (2004). *Allgemeine und spezielle Pathologie* (5. Ausg.). Stuttgart: Thieme.
- Ristimäki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., . . . Isola, J. (2002). Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.*, 632-5.

- Ruiz, C., Seibt, S., Al Kuraya, K., Siraj, A., Mirlacher, M., Schraml, P., . . . Sauter, G. (2005). Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 2190-2194.
- Schildhaus, H. (2018). Predictive value of PD-L1 diagnostics. *Pathologe*, 498-519.
- Schlomm, T., Iwers, L., Kirstein, P., Jessen, B., Köllermann, J., Minner, S., . . . Sauter. (2008). Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod. Pathol.*, 1371-8.
- Schneider, K., Cost, N., Schultz, K., Svihovec, S., & Suttman, A. (2020). Germline predisposition to genitourinary rhabdomyosarcoma. *Translational Andrology and Urology*, 2430-2440.
- Shokouh, T., MD, Ezatollah, A., MSc, Barand, P., & GP. (2015). Interrelationships Between Ki67, HER2/neu, p53, ER, and PR Status and Their Associations With Tumor Grade and Lymph Node Involvement in Breast Carcinoma Subtypes. *Medicine*, 1359.
- Shurell, E., Singh, A., Crompton, J., Jensen, S., Li, Y., Dry, S., . . . Eilber, F. (2016). Characterizing the immune microenvironment of malignant peripheral nerve sheath tumor by PD-L1 expression and presence of CD8+ tumor infiltrating lymphocytes. *Impactjournals/Oncotarget*, 64300-64308.
- Simon, R., Richter, J., Wagner, U., Fijan, A., Bruderer, J., Schmid, U., . . . Mihatsch. (2001). High-throughput tissue microarray analysis of 3p25 (RAF1) and 8p12 (FGFR1) copy number alterations in urinary bladder cancer. *Cancer Res.*, 4514-9.
- Skapek, S., Ferrari, A., Gupta, A., Lupo, P., Butler, E., Shipley, J., . . . Hawkins, D. (2019). Rhabdomyosarcoma. *Nat Rev Dis Primers*, 1.
- Sorbye, S., Kilvaer, T., Valkov, A., Donnem, T., Smeland, E., Al-Shibli, K., & Bremnes, R. (2011). Prognostic Impact of Lymphocytes in Soft Tissue Sarcomas. *PLOS One*, 14611.
- Spurny, C., Kailayangiri, S., Jamitzky, S., Alvater, B., Wardelmann, E., Dirksen, U., . . . Rossig, C. (2018). Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression is not a predominant feature in Ewing sarcomas. *Pediatr Blood Cancer*.
- Sundara, Y., Kostine, M., Cleven, A., Bovee, J., Schilham, M., & Cleton-Jansen, A.-M. (2017). Increased PD-L1 and T-cell infiltration in the presence of HLA class 1 Expression in metastatic high-grade osteosarcoma:a rationale for T-cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 119-128.

- Tawbi, H., Burgess, M., Bolejack, v., Van Tine, B., Schuetze, S., Hu, J., . . . Reed , D. (2017). Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 1493-1501.
- Torabi, A., Amaya, C., Wians JR, F., & Bryan, B. (2017). PD-1 and PD-L1 expression in bone and soft tissue sarcomas. *Pathology*, 506-513.
- Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., Köchli, O., . . . Sauter, G. (Dezember 2001). Tissue Microarrays for Rapid Linking of Molecular Changes to Clinical Endpoints. *American Journal of Pathology*, Vol. 159(6), 2249-2256.
- Tseng, W., Malu, S., Zhang, M., Chen, J., Sim, G., Wei, W., . . . Hwu, P. (2015). Analysis of the intratumoral adaptive immune response in well differentiated and dedifferentiated retroperitoneal liposarcoma. *Sarcoma*, 547460.
- van Erp, A. E., Versleijen-Jonkers, Y. M., Hillebrandt-Roeffen, M. H., van Houdt, L., Gorris, M. A., van Dan, L. S., . . . Noese, v. (2017). Expression and clinical association of programmed cell death-1, programmed death-ligand-1 and CD8+ lymphocytes in primary sarcomas is subtype dependent. *Impactjournals*, 71371-71384.
- Veenstra, R., Kostine, M., Cleton-Jansen, A., de Miranda, N., & Bovée, J. (2017). Immune checkpoint inhibitors in sarcomas: in quest of predictive biomarkers. *Laboratory Investigation*, 41-50.
- Veenstra, R., Kostine, M., Cleton-Jansen, A.-M., de Miranda, N., & Bovée, J. (2018). Immune checkpoint inhibitors in sarcomas: in quest of predictive biomarkers. *Laboratory Investigation*, 41-50.
- Wirbel, R., Feifel, G., & Mutschler, W. (1997). Weichteiltumore Teil 1 Epidemiologie, Klassifikation und Diagnostik. *Der Unfallchirurg*, 970-978.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Guido Sauter, für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Meiner Familie und Freunde danke ich für ihre Geduld, Ermutigungen und positiven Zusprüche während des Medizinstudiums und der Arbeit an dieser Dissertation.

Insbesondere danke ich meinem Vater für die großartige Unterstützung während der Durchführung dieser Dissertation und Ermöglichung des Medizinstudiums.

Lebenslauf

Name: Charlotte Schweiger

Anschrift: Schweigerstraße 2, 85445 Oberding

E-Mail: charlotteschweiger@web.de

Mobil: 01624573955

Geb. 13.10.1995

Berufliche Laufbahn:

Juli 2022-heute: Klinikum Landkreis Erding

Assistenzärztin der Unfallchirurgie/Orthopädie

Dezember 2021-April 2022: Rotkreuzklinikum München

Praktisches Jahr in der Abteilung Orthopädie

September 2021-Dezember 2021: Klinikum Landkreis Erding

Praktisches Jahr in der Abteilung Innere Medizin

Mai 2021-September 2021: Klinikum Landkreis Erding

Praktisches Jahr in der Abteilung Chirurgie

März 2020-April 2020: Orthopädisches Klinikum Bad Bramstedt

Famulatur

September 2019-Oktober 2019: Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf- Institut für

Pathologie

Famulatur

August 2019-September 2019: Hausarztpraxis Holger Lachmann

Famulatur

August 2018-September 2018: Praxis Dr. Robert Schweiger

Famulatur

Ausbildung:

2022: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf- Institut für Pathologie

Dissertation

Dezember 2020-Dezember 2021: Technische Universität München

Studium Humanmedizin

Dezember 2015-Dezember 2020: Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Studium Humanmedizin

2006- Juni 2014: Korbinian Aigner Gymnasium Erding

Hochschulreife

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorstehende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, dass sie noch an keiner anderen Hochschule, in keinem anderen Studiengang oder sonst als Prüfungsleistung eingereicht wurde und dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

An Stellen der Arbeit, die ich wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder dergleichen übernommen habe, sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich die vorgenannten Angaben nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und die Angaben der Wahrheit entsprechen.

Die Strafbarkeit einer falschen, eidesstattlichen Versicherung ist mir bekannt, selbst bei bloßer Fahrlässigkeit.

Charlotte Schweiger