

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med Guido Sauter

Prognostische Relevanz der PD-L1 Expression beim Mammakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Carsten Patrick Marcus
aus Mönchengladbach

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.02.2021**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Volkmar Müller

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

1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	10
2.1. Patienten und Tissue-Microarrays.....	10
2.2. PD-L1 Immunhistochemie.....	12
2.3. Statistik.....	13
3. Ergebnisse	14
3.1. Prognose TMA.....	14
3.1.1. Technische Aspekte	14
3.1.2. PD-L1 Färbung in Tumor und Entzündungszellen	14
3.1.3. Prognoserelevanz	18
3.2. Heterogenitäts TMA.....	20
4. Diskussion	22
5. Zusammenfassung	32
6. Abstract	33
7. Abkürzungsverzeichnis	34
8. Abbildungsverzeichnis	35
9. Tabellenverzeichnis	35
10. Literaturverzeichnis	36
11. Danksagungen	43
12. Lebenslauf	44
13. Eidesstattliche Versicherung	45

1. Einleitung

Das Mammakarzinom ist der häufigste Tumor bei Frauen. Circa 10% aller Frauen erkranken während ihres Lebens an Brustkrebs. In Deutschland kam es 2016 zu circa 69.000 Neuerkrankungen und zu 18.100 Mammakarzinom bedingten Todesfällen (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2016). Mammakarzinome werden heute, zumindest in westlichen Gesellschaften typischerweise früh entdeckt.

Dies geschieht durch die Selbstuntersuchung der Frauen oder aber im Rahmen umfangreicher Mammografie-Screening-Programme, wie sie heute in vielen Ländern existieren. Falls ein verdächtiger Knoten in der Mamma ertastet oder radiologisch erkannt wird erfolgt in der Regel eine diagnostische Biopsie. Wird ein Tumor diagnostiziert, wird dieser chirurgisch entfernt. Die meisten Karzinome lassen sich heute brusterhaltend operieren. Die komplette Mastektomie findet heutzutage nur noch bei ungünstiger oder multizentrischer Lage des Tumors, inflammatorischem Mammakarzinom, inkompletter Resektion oder explizitem Wunsch des Patienten Anwendung (Stauber and Weyerstahl, 2007).

Das weitere Prozedere hängt dann von den Befunden ab, welche der Pathologe am entfernten Mammagewebe erhebt. Falls der Tumor nicht im Gesunden reseziert wurde, erfolgt eine Nachresektion oder gegebenenfalls eine Nachbestrahlung. Wenn der Tumor auf Grund der vom Pathologen erhobenen Befunde als potentiell aggressiv eingeschätzt wird, erfolgt eine adjuvante Therapie, deren Art ebenfalls durch die vom Pathologen erhobenen Befunde bestimmt wird. Die histopathologische Untersuchung von entfernten Mamma Tumoren ist somit für Frauen von entscheidender Bedeutung. Der Pathologe bestimmt nicht nur, ob der chirurgische Resektionsrand tumorfrei ist oder nicht – dieser Befund entscheidet darüber ob eine Nachresektion/Bestrahlung notwendig ist – sondern erhebt auch prognostische relevante Daten. Hierzu gehören das Tumorstadium (pT), der Status der Lymphknoten- sowie Fernmetastasen (pN und pM) und der Differenzierungsgrad nach Bloom, Richardson, Ellis (BRE-Grad). Darüber hinaus werden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt zur Bestimmung des Östrogen- und Progesteronstatus, zur Messung der Tumorstadiumsgeschwindigkeit (Ki-67-Labeling Index) und es wird der HER2 Status bestimmt, entweder immunhistochemisch oder durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Böcker et al., 2008).

Die immunhistochemischen sowie die FISH Befunde haben großen Einfluss auf die Art der adjuvanten Therapie. Ist der Tumor HER2 positiv, wird eine adjuvante Behandlung mit einem Antikörper gegen HER2-Protein durchgeführt (Trastuzumab, Herceptin). Wenn Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren im Tumorgewebe nachweisbar sind, spricht dies für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens auf eine antihormonelle Therapie mit

sogenannten Aromatasehemmern wie Anastrozol oder Östrogenrezeptormodulatoren wie Tamoxifen (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative et al., 2011).

Der Ki-67-Labeling Index ist für die Frage, ob eine Therapie notwendig ist oder nicht von erheblicher Bedeutung. Ein Ki-67 Antikörper markiert ein Protein, welches in allen Zellkernen zu finden ist, die sich in der G1-, S- oder Mitosephase des Zellzyklus befinden (Scholzen and Gerdes, 2000). Der prozentuale Anteil der Ki-67 positiven Zellen erlaubt somit eine Abschätzung der Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors. Ist der prozentuale Anteil der Ki-67 positiven Zellen (Ki-67-Labeling Index) größer als 25% wird von einem prognostisch eher ungünstigen Tumor ausgegangen (Petrelli et al., 2015). Dieser Befund ist dann ein weiteres Argument für eine adjuvante Therapie. Die typischen Kriterien für die Entscheidung bei einer Frau mit Mammakarzinom eine adjuvante Therapie durchzuführen sind in Tabelle 1 dargestellt (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2020):

Tabelle 1: Neoadjuvante Therapieoptionen beim Mammakarzinom

Adjuvante Therapiemöglichkeiten	Indikation	Substanzen (1. Wahl)
Chemotherapie	Inflammatorisches Mammakarzinom, Lokal fortgeschrittenes Stadium, Inoperabilität	Kombination aus Anthracyclin und Taxan
Antikörpertherapie	IHC: Gleichmäßige Membranreaktion in > 10 % der Zellen FISH: Verhältnis der Gene HER2/CEP17 ≥ 2 und mehr als 6 HER2 Signale pro Zelle	Trastuzumab
Antihormontherapie	Immunhistochemische Färbung zeigt >1% Progesteron- oder Östrogenrezeptor exprimierende Zellkerne	Tamoxifen (Prämenopausal) Aromatasehemmer (Postmenopausal)

In den letzten Jahren hat sich als zusätzliches Kriterium für die Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Therapie die Durchführung sogenannter Gen-Panel Untersuchungen etabliert. Bei diesen Verfahren werden Sets von weniger als 100 Genen auf der RNA-Ebene in Tumoren untersucht. Etablierte Gen-Panels zum Zweck der Prognoseabschätzung von Mammakarzinomen sind beispielsweise Oncotype TX (Sparano et al., 2015), Mammaprint (Xin et al., 2017) oder Endopredict (Fitzal et al., 2015).

Durch die oben genannten Therapiekonzepte hat sich die Prognose des Mammakarzinoms in den letzten Jahrzehnten verbessert. Laut des Berichtes zum Krebsgeschehen (Barnes et al.,

2016) in Deutschland ist die Mortalität trotz einer gestiegenen Inzidenz (durch erwähnte Screeningmethoden) rückläufig (Abb. 1).

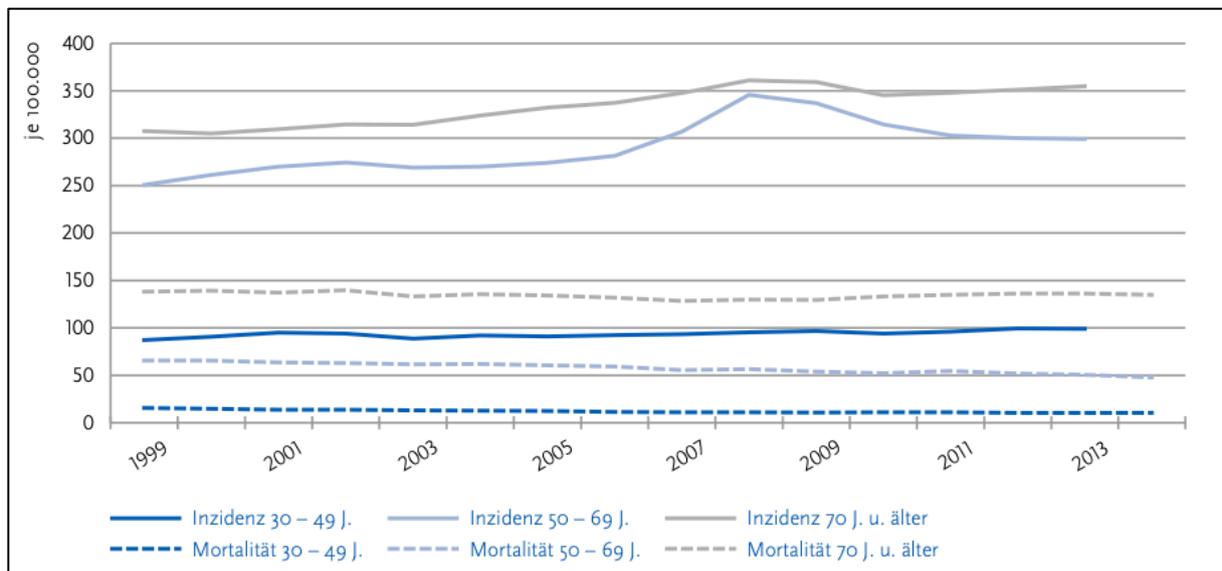


Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität für Mammakarzinom nach Altersgruppe, Deutschland, 1999–2013/2014 (Barnes et al., 2016)

Die medikamentösen Therapien, die heute beim Mammakarzinom etabliert sind, richten sich direkt gegen Tumorzellen, entweder indem sie in den Zellteilungsprozess eingreifen oder aber gegen spezifische, für die Tumorzelle relevante molekulare Mechanismen agieren, wie beispielsweise Östrogen- und Progesteronrezeptor vermittelte Zellvorgänge. Oder sie richten sich gegen Tumorzell-spezifische Strukturproteine wie das HER2-Protein welches in circa 10-15% der Mammakarzinome exprimiert wird (Chan and McGregor, 2012). Neuere Krebsmedikamente verfolgen einen anderen Ansatz, sie unterstützen das körpereigene Immunsystem bei der Bekämpfung des Tumors. Die meisten diesbezüglichen auf dem Markt befindlichen Medikamente richten sich gegen das PD1/PD-L1 System. Die Wirkungsweise des PD1/PD-L1 Systems ist in Abbildung 2 dargestellt (Wu et al., 2019):

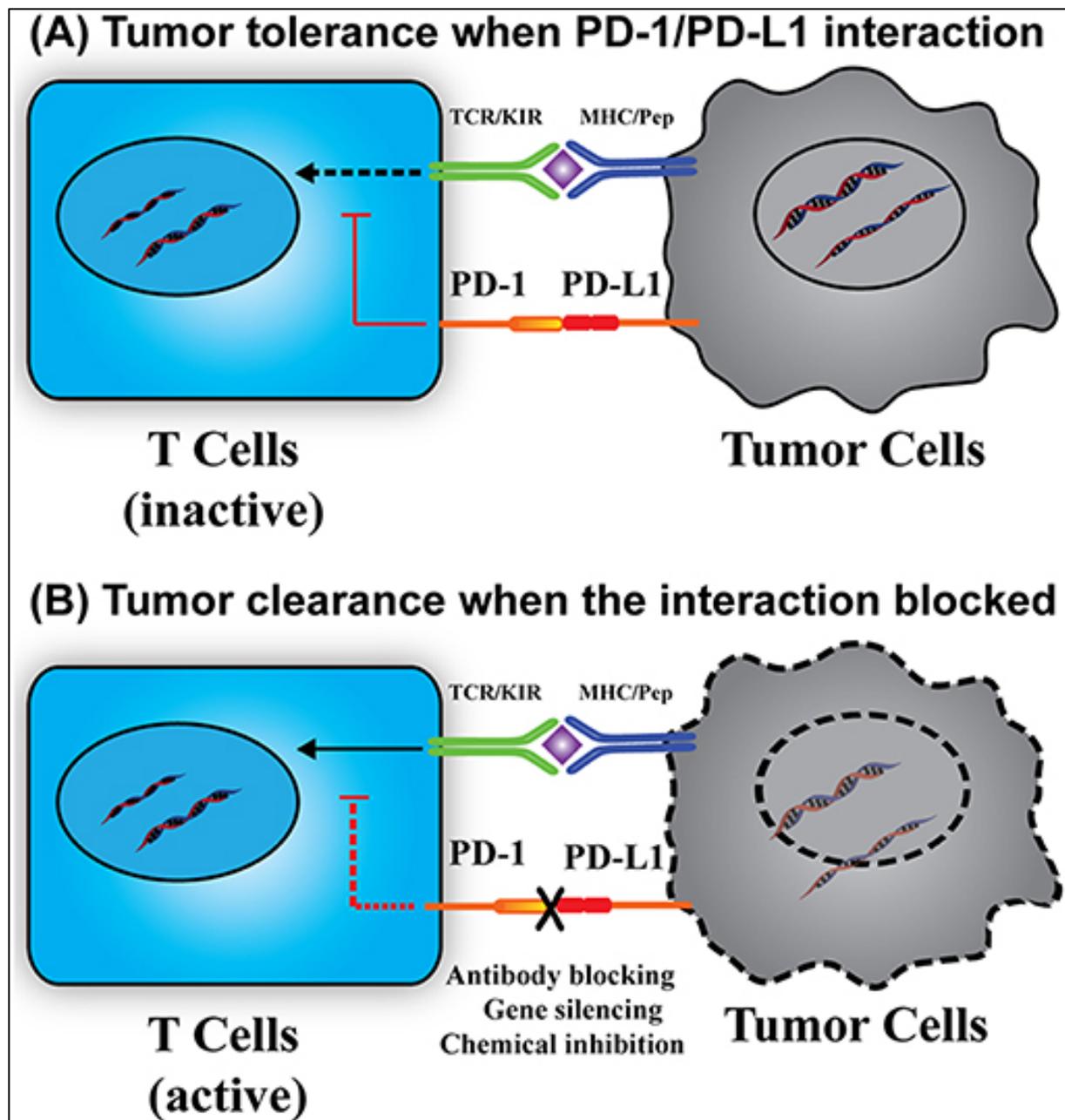


Abbildung 2: Wirkungsweise PD-L1 aus Wu et al.: „PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy-Blockade, Knockdown, or Inhibition“ (Wu et al., 2019)

PD1 (Programmed Cell death protein 1) ist ein Rezeptor, der bei aktiven Entzündungszellen exprimiert wird, mit dem Ziel, dass durch die Interaktion mit dem PD-1 Liganden die Immunantwort physiologisch gebremst wird (Parry et al., 2005). Der Zweck dieses Mechanismus ist es, den Organismus/Menschen vor überschießenden Immunantworten zu schützen. Der PD-1/PD-L1 Mechanismus ist für den Menschen also von vitaler Bedeutung. Allerdings hat sich herausgestellt, dass dieser Mechanismus im Falle einer Tumorerkrankung auch die Immunantwort auf Tumoren kompromittiert. Darüber hinaus sind viele Tumoren offensichtlich dazu in der Lage Liganden von PD-1/PD-L1 selber zu exprimieren, sodass der Tumor selbst die Immunantwort gegen sich hemmen kann (Haanen and Robert, 2015).

Medikamente, die sich gegen PD-1 oder PD-L1 richten, sind Antikörper. Die zugelassenen Medikamente (Stichtag 25.06.2020) sind in Tabelle 2 dargestellt (Heinzerling et al., 2019):

Tabelle 2: Zugelassene PD-L1/PD-1-Antikörper (*Nur USA) Stichtag: 25.06.2020

Medikament	Wirkungsansatz	Indikation
Nivolumab	PD-1	Melanom, NSCLC, klassisches Hodgkin Lymphom, Urothelkarzinom, Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches
Pembrolizumab	PD-1	Melanom, NSCLC, klassisches Hodgkin Lymphom, Urothelkarzinom
Avelumab	PD-L1	Merkelzellkarzinom
Atezolizumab	PD-L1	NSCLC, Urothelkarzinom
Durvalumab*	PD-L1	Lungenkarzinome, Urothelkarzinom
Cemiplimab*	PD-1	Plattenepithelkarzinome

Insbesondere beim Melanom haben diese Medikamente spektakuläre Erfolge erzielt. Metastasierende Melanome waren noch vor wenigen Jahren für betroffene Patienten ein Todesurteil, werden aber heute in circa einem Drittel aller Fälle wahrscheinlich dauerhaft geheilt (Simeone and Ascierto, 2017). Derartige Befunde haben das Interesse an sogenannten Immun-Checkpoint-Inhibitoren bei Pharmafirmen, Ärzten und Patienten geweckt. Ein großer Teil der onkologischen Medikamentenentwicklung in Pharmafirmen beschäftigt sich heute mit Immuntherapien. Medikamente gegen das PD-1/PD-L1 System sind heute zugelassen für das maligne Melanom, Nierenzellkarzinome, Harnblasenkarzinome und nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (s. Tab. 2). Bei vielen anderen Tumorarten laufen derzeit klinische Studien und es ist damit zu rechnen, dass sich die Zahl der durch Immun-Checkpoint-Inhibitoren behandelbaren Tumoren demnächst deutlich erweitert. Trotz der spektakulären Erfolge von Immun-Checkpoint-Inhibitoren bleibt die Tatsache bestehen, dass die Mehrzahl der behandelten Patienten beziehungsweise Tumoren nicht in relevanter Art und Weise auf eine Behandlung anspricht (Yi et al., 2018).

Dies wirft die Frage auf, welche Patienten mit diesen immer noch sehr teuren Medikamenten behandelt werden sollen und welche nicht. Studien haben gezeigt, dass insbesondere der Nachweis einer PD-L1 Expression im Tumorgewebe oder in tumorassoziierten Entzündungszellen mit einem vermehrten Ansprechen auf eine Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren assoziiert ist (Gonzalez-Ericsson et al., 2020). Bei den meisten Medikamenten, beziehungsweise Tumorarten, ist der Nachweis einer PD-L1 Expression

Voraussetzung für eine Therapie. Der Grenzwert, welcher eine Indikation für eine PD-L1 Therapie darstellt, ist von der Art des Tumors abhängig. So konnte zum Beispiel beim Nierenzellkarzinom kein Einfluss einer PD-L1 Expression auf die Wirksamkeit der PD-L1-Inhibitoren festgestellt werden, weshalb die Leitlinie eine Therapie „unabhängig vom PD-L1-Status“ empfiehlt (S3-Leitlinie Nierenzellkarzinom, 2017). Im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom hingegen wird von signifikant besseren Ergebnissen berichtet, je höher der Anteil PD-L1-positiver Tumorzellen ist (Borghaei et al., 2015). Auch die aktuelle S3-Leitlinie des Lungenkarzinoms (2018) empfiehlt beim NSCLC eine anti-PD-L1 Therapie bei einer PD-L1-Expression über 50%, Grundlage dieser Empfehlung ist die KEYNOTE-024 Studie (Reck et al., 2019).

Beim Mammakarzinom sind derzeit einige Medikamente in Erprobung, zu einer Zulassung ist es aber noch nicht gekommen (Stichtag: 01.08.2019). Auffällig ist bei der Durchsicht der Literatur zur PD-L1 Expression in Mammakarzinomen, dass die publizierten Daten außerordentlich divergent sind. So fanden Burugu et al. (2017) in einer Kohorte von 2918 Tumoren an einem Mammakarzinom Tissue-Microarray eine Positivitätsrate von 0,82%. Einen ähnlichen Befund publizierten Ali et al. (2015) mit 1,7% an 3916 Tumoren. Am anderen Ende des Spektrums gibt es Arbeiten, welche mehr oder weniger zeitgleich entstanden sind von Hou et al. (2018), der an einer Serie von 123 Tumoren eine Positivitätsrate von 70,7% oder von Dirix (2017), welcher an 136 Patienten 62,5% positive Fälle fand. Die letztgenannten Studien hatten im Gegensatz zu den Studien von Burugu und Ali nicht Tissue-Microarrays, sondern Großflächenschnitte verwendet, was dafür sprechen könnte, dass eine Heterogenität bei der PD-L1 Expression des Mammakarzinoms besteht, wodurch sie an Tissue-Microarrays nicht adäquat erkannt werden kann. Allerdings gibt es auch TMA-Studien, die ebenfalls sehr hohe Positivitätsraten fanden, wie beispielsweise Baptista et al. (2016) an 56,6% positive Tumoren in 195 Fällen oder Botti (2017), die an 238 Fällen immerhin 32,3% PD-L1 positive Mammakarzinome beschrieben. Angesichts der großen therapeutischen Erfolge von PD1/PD-L1-Hemmern und der Häufigkeit des Mammakarzinoms beziehungsweise von Mammakarzinom bedingten Todesfällen ist es sehr bedeutend, ob nun eine PD-L1 Expression in weniger als 1% oder mehr als 60% der Tumoren vorkommt. Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es daher, die PD-L1 Expression an einem System von Tissue-Microarrays zu untersuchen, das nicht nur dazu geeignet ist, eine große Zahl von Tumoren zu untersuchen, sondern auch eine systematische Untersuchung der Tumorerogenität, durch die Verwendung sogenannter Heterogenitäts Tissue-Microarrays ermöglicht.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und Tissue-Microarrays

Für die vorliegende Untersuchung standen zwei unterschiedliche Tissue-Microarrays zur Verfügung, ein Prognose Tissue-Microarray und ein sogenannter Heterogenitäts Tissue-Microarray. Der Prognose Tissue-Microarray enthielt Proben von insgesamt 1545 Patientinnen. Das mittlere Patientenalter war 62,4 [±13] Jahre (Median 63 Jahre) . Die Nachbeobachtungszeit war im Durchschnitt 47 [±22] Monate (Median 49 Monate). Alle Tumoren waren am Institut für Pathologie des Klinikums Osnabrück zur Untersuchung gelangt. Operiert wurden die Patientinnen in dem Franziskushospital-Harderberg (Niels-Stensen-Kliniken) Georgsmarienhütte in den Jahren 2007 bis 2010. Die Tumoren wurden alle von erfahrenen Gynäkopathologen am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf nachbeurteilt bezüglich histologischen Typs und BRE-Grad. Die Nachbeurteilungen wurden von PD Dr. Eike Burandt und Frau Professor Annette Lebeau vorgenommen. Die pathologischen Daten zum Tumorkollektiv des Prognosearrays sind in Tab. 3 dargestellt:

Tabelle 3: Tumorkollektiv des Prognose Tissue-Mikroarrays

Prognose Tissue-Mikroarray	n=
Patienten	1499
Histologischer Subtyp	
Invasives Karzinom, kein spezieller Typ (NST)	1265
Invasives lobuläres Karzinom	170
Muzinöses Karzinom	36
Karzinom mit medullären Eigenschaften	11
Tubuläres Karzinom	9
Basalzellkarzinom	5
Invasives papilläres Karzinom	3
pT	
pT1	764
pT2	535
pT3	61
pT4	78
N	
N0	670
N1	455
M	
0	276
1	142
Grading	
1	232
2	805
3	457

Der Heterogenitäts Tissue-Microarray stammt von Patientinnen, welche am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf operiert wurden, beziehungsweise am Institut für Pathologie des UKE zur Untersuchung gelangten. In einer konsekutiven Serie von 530 Mammakarzinomen ließen sich 167 Tumoren identifizieren, welche so ausgedehnt waren, dass mindestens 4 Paraffinblöcke Tumorgewebe enthielten. Von diesen 167 Tumoren wurden 8 Tumorstanzen pro Patientin entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die entnommenen Stanzen von Lokalisationen waren, die möglichst weit voneinander entfernt lagen. Wenn 8 oder mehr Blöcke vorhanden waren, wurden alle 8 Stanzen aus jeweils einem unterschiedlichen Block entnommen. Wenn weniger als 8 Paraffinblöcke pro Patientin vorlagen, mussten von mindestens einem dieser Tumorblöcke zwei Stanzen entnommen werden, wobei darauf geachtet wurde, dass die beiden vom gleichen Block entnommenen Stanzen möglichst weit voneinander entfernt lagen. Die pathologischen Daten zum Tumorkollektiv des Heterogenitätsarray sind in Tab. 4 dargestellt:

Tabelle 4: Tumorkollektiv des Heterogenitäts Tissue-Mikroarrays

Heterogenitäts Tissue-Mikroarray	n=
Patienten	267
Histologischer Subtyp	
Invasives Karzinom, kein spezieller Typ (NST)	204
Invasives lobuläres Karzinom	52
Tubuläres Karzinom	2
Muzinöses Karzinom	2
Invasives papilläres Karzinom	2
Karzinome mit apokriner Differenzierung	1
pT	
pT1	79
pT2	128
pT3	17
pT4	30
N	
N0	103
N1	101
Grading	
1	32
2	148
3	78

2.2. PD-L1 Immunhistochemie

Die für die Studie verwendeten Tissue-Microarray Schnitte wurden alle am gleichen Tag hergestellt, wobei die TMA-Blöcke an einem HM 355s Mikrotom der Firma Thermo Fisher Scientific geschnitten wurden. Die Schnittdicke betrug 3 Mikrometer. Die Färbung der Präparate erfolgte gleichzeitig in einem Dako Färbeautomat. Die Schnitte wurden deparaffiniert und einem Hitze induzierten „Antigen Retriever“ Prozess bei 37°C für 60 Minuten ausgesetzt. Für die Immunfärbung wurde ein PD-L1 Antikörper von Cell Signaling Technology® (Hase, Polyklonal, Klon (E1L3N®)XP®, Referenznummer #13684, Verdünnung 1:200) verwendet. Das Färbeprotokoll ist hier stichpunktartig dargestellt:

I. Vorbereitung

1. 4 µm Schnitte anfertigen
2. 30 Minuten Entparaffinierung im Brutschrank
3. Behandlung mit 98°C bei einem pH-Wert von 9
4. 5 Minuten spülen mit TBST-Puffer

II. Peroxidase Block

1. 5 Minuten Behandlung mit Peroxidase Blocking Reagent von DAKO (Envision Flex-Kit 8002)
2. 2x 5 Minuten Spülen mit TBST-Puffer

III. Antikörper-Inkubation

1. 20 Minuten Behandlung mit PD-L1 1:200 bei Raumtemperatur
2. Spülen mit TBST-Puffer
3. 15 Minuten Behandlung mit Linker rabbit (DAKO K8009) bei Raumtemperatur
4. Spülen mit TBST-Puffer
5. 20 Minuten Behandlung mit Flex HRP (DAKO EnVision Flex-Kit 8002) bei Raumtemperatur
6. 2x Spülen mit TBST-Puffer

IV. Chromogen

1. 10 Minuten Behandlung mit DAB-Chromogen (DAKO EnVision Flex-Kit 8002) bei Raumtemperatur
2. Spülen mit TBST-Puffer
3. 5 Minuten Behandlung mit Hämatoxylin (DAKO K8008) bei Raumtemperatur
4. Spülen mit TBST-Puffer
5. Spülen mit Aqua dest.
6. Waschen in aufsteigende Alkoholreihe (80%, 90%, 96%, 100%, Xylol)
7. Eindeckeln mit Folie

Zur Visualisierung des Antikörpers wurde der Envision KIT (Dako, Glostrup, Ref.: K5005, Dänemark) angewendet. Die Auswertung der PD-L1 Färbung wurde von Frau Dr. med. Sarah Bonk vorgenommen. Diese erfolgte separat für tumorassoziierte Makrophagen und Tumorzellen, wobei der Grenzwert für die Definition eines PD-L1 positiven Karzinoms das Vorliegen von mehr als einem Prozent positiven Tumorzellen oder Entzündungszellen war.

2.3. Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit der JMP 12.0 Software (SAS Institute Inc, NC, USA) vorgenommen. Mehrfelder Tabellen und Chi-Quadrat-Tests wurden durchgeführt, um Assoziationen zwischen kategorischen Variablen zu untersuchen, wie beispielsweise zwischen PD-L1 Expression und dem Tumorstadium oder dem BRE-Grad. Kaplan-Meier-Kurven wurden hergestellt unter Verwendung von 60 Monaten als Endpunkt. Ein Log-Rank-Test wurde angewendet, um zu klären, ob zwischen bestimmten Kategorien signifikante Unterschiede bestehen.

3. Ergebnisse

3.1. Prognose TMA

3.1.1. Technische Aspekte

Von 1488 Proben waren 892 auswertbar (59.54%). Die übrigen Stenzen enthielten entweder keine eindeutigen Tumorzellen oder waren auf dem entsprechenden TMA-Schnitt nicht vorhanden.

3.1.2. PD-L1 Färbung in Tumor und Entzündungszellen

Eine PD-L1 Färbung ließ sich in Tumorzellen bei 57 von 892 Patientinnen (6,39%) nachweisen. Die Färbeintensität war in 0,2% der Fälle als stark, 0,7% als mäßig und in 5,5% der Fälle als schwach interpretiert worden. Beispiele von PD-L1 positiven Mammakarzinomen sind in den Abbildung 3 dargestellt.

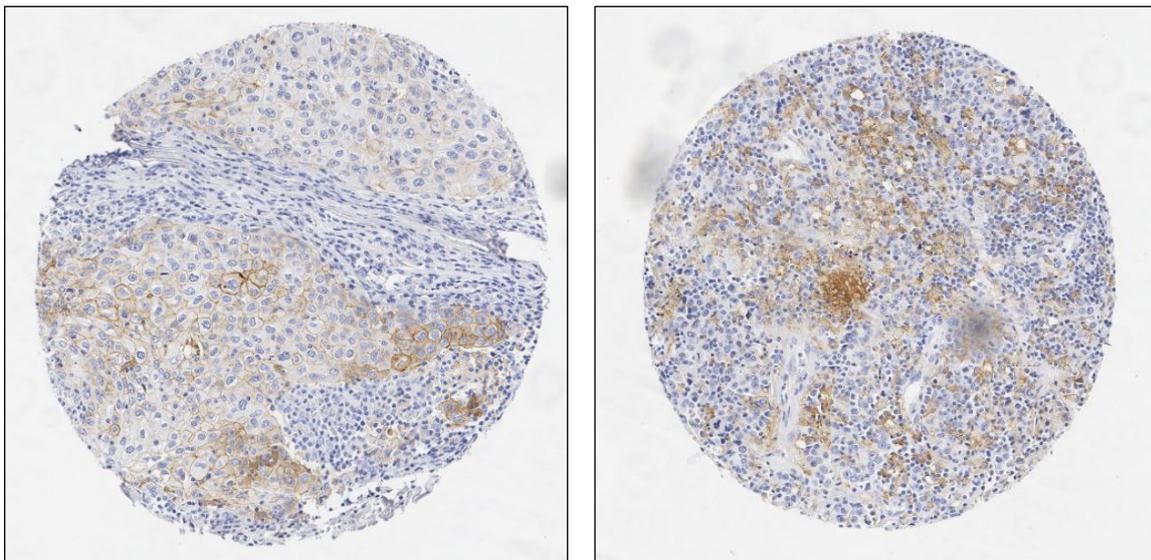


Abbildung 3 a/b: PD-L1 positive Mammakarzinome mit PD-L1 Färbung in 10-30% der Tumorzellen

Eine Anfärbung von Entzündungszellen fand sich in 48 Patientinnen (3,2%). In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle fand sich in den Gewebeproben eine PD-L1 Färbung entweder in Tumor- oder in Entzündungszellen. Eine Anfärbung von beiden konnte in keinem Fall mit Sicherheit diagnostiziert werden. Insgesamt war der prozentuale Anteil PD-L1 positiver Tumoren somit 6,3 %. Die Häufigkeit der PD-L1 Positivität in den verschiedenen Tumorsubtypen ist in Tabelle 5 dargestellt. Dabei fällt auf, dass keines von 77 lobulären Karzinomen eine PD-L1 Positivität in Tumorzellen aufwies.

Tabelle 5: PD-L1 Färbung in Mammakarzinom Subtypen

Entitäten	n	PD-L1 positiv (%)
Invasives Karzinom, kein spezieller Typ (NST)	789	6,59%
Invasives lobuläres Karzinom	77	0%
Muzinöses Karzinom	12	0%
Karzinom mit medullären Eigenschaften	6	16,67%
Basalzellkarzinom	5	60%
Invasives papilläres Karzinom	2	50%
Tubuläres Karzinom	1	0%

Eine PD-L1 Positivität fand sich lediglich in einem Fall eines lobulären Karzinoms in Entzündungszellen. Der Vergleich des PD-L1 Status mit histopathologischen und klinischen Parametern wie pT, pN, M und dem BRE-Grad ergab nur für den BRE-Grad einen signifikanten Zusammenhang (siehe Tab. 6).

Tabelle 6: PD-L1 Anfärbung beim Mammakarzinom und Tumor Phänotyp

PD-L1	n	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p
Alle Entitäten	892	93.6	5.5	0.7	0.2	
Histologische Subtypen						0.021
Invasives Karzinom, kein spezieller Typ (NST)	789	93.4	5.8	0.5	0.3	
Invasives lobuläres Karzinom	77	100.0	0.0	0.0	0.0	
Muzinöses Karzinom	12	100.0	0.0	0.0	0.0	
Karzinom mit medullären Eigenschaften	6	83.3	0.0	16.7	0.0	
Basalzellkarzinom	5	40.0	40.0	20.0	0.0	
Invasives papilläres Karzinom	2	50.0	50.0	0.0	0.0	
Tubuläres Karzinom	1	100.0	0.0	0.0	0.0	
pT						0.1664
pT1	421	94.3	5.0	0.5	0.2	
pT2	351	93.7	5.4	0.9	0.0	
pT3	34	82.4	14.7	0.0	2.9	
pT4	56	96.4	1.8	1.8	0.0	
pN						0.5793
pN0	375	93.9	5.9	0.3	0.0	
pN1	174	95.4	4.0	0.6	0.0	
pN2	104	96.2	2.9	1.0	0.0	
M						0.6636
0	123	92.7	5.7	1.6	0.0	
1	91	95.6	3.3	1.1	0.0	
G						<0.0001
1	124	100.0	0.0	0.0	0.0	
2	447	97.5	2.5	0.0	0.0	
3	319	85.6	11.9	1.9	0.6	

Sowohl bei Betrachtung aller Tumoren (Tab. 6) als auch bei Betrachtung der größten homogenen Subgruppe der Tumoren ohne speziellen Typ (NST= no special type, siehe Tab. 7) bestand allerdings ein markanter statistischer Zusammenhang zwischen einem hohen BRE-Grad und dem Nachweis einer PD-L1 Positivität. Dieser Unterschied war im übrigen sowohl für PD-L1 positive Entzündungszellen sowie auch für PD-L1 positive Tumorzellen signifikant (siehe Tab. 7 und 8).

Tabelle 7: PD-L1 Anfärbung beim Mammakarzinomsubtyp NST und Tumor Phänotyp

PD-L1	n	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p
Invasives Karzinom, kein spezieller Typ (NST)	789	93.4	5.8	0.5	0.3	
pT						0.047
pT1	387	94.6	4.9	0.3	0.3	
pT2	311	93.6	5.8	0.6	0.0	
pT3	22	72.7	22.7	0.0	4.5	
pT4	43	95.3	2.3	2.3	0.0	
pN						0.06359
pN0	331	93.4	6.3	0.3	0.0	
pN1	157	94.9	4.5	0.6	0.0	
pN2	51	96.1	3.9	0.0	0.0	
pN3	38	94.7	2.6	2.6	0.0	
M						0.6834
0	109	91.7	6.4	1.8	0.0	
1	79	94.9	3.8	1.3	0.0	
G						<0.0001
1	117	100.0	0.0	0.0	0.0	
2	376	97.3	2.7	0.0	0.0	
3	295	85.8	12.2	1.4	0.7	

Tabelle 8: PD-L1 Anfärbung in Histozyten bei Mammakarzinom und Tumor Phänotyp

PD-L1	n	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p
Alle Entitäten	892	96.8	3.2	0.0	0.0	
Histologische Subtypen						0.0159
Invasives Karzinom, kein spezieller Typ (NST)	1265	96.5	3.5	0.0	0.0	
Invasives lobuläres Karzinom	170	99.4	0.6	0.0	0.0	
Muzinöses Karzinom	36	100.0	0.0	0.0	0.0	
Karzinom mit medullären Eigenschaften	11	81.8	18.2	0.0	0.0	
Tubuläres Karzinom	9	100.0	0.0	0.0	0.0	
Basalzellkarzinom	5	80.0	20.0	0.0	0.0	
Invasives papilläres Karzinom	3	100.0	0.0	0.0	0.0	
pT						0.4721
pT1	764	97.0	3.0	0.0	0.0	
pT2	535	95.9	4.1	0.0	0.0	
pT3	61	96.7	3.3	0.0	0.0	
pT4	78	98.7	1.3	0.0	0.0	
pN						0.8572
pN0	670	96.4	3.6	0.0	0.0	
pN1	278	97.1	2.9	0.0	0.0	
pN2	177	96.6	3.4	0.0	0.0	
M						0.3239
0	276	97.1	2.9	0.0	0.0	
1	142	98.6	1.4	0.0	0.0	
G						<0.0001
1	232	100.00	0.0	0.0	0.0	
2	805	98.5	1.5	0.0	0.0	
3	457	92.1	7.9	0.0	0.0	

In Tumorzellen fand sich eine PD-L1 Positivität in 0 von 124 G1 Tumoren (0%), in 11 von 447 G2 Tumoren (2,5%) und in 45 von 319 G3 Tumoren (14,4%; $p < 0,0001$). In Entzündungszellen fand sich keine PD-L1 Positivität in 124 G1 Tumoren (0%), aber in 13 von 464 G2 Tumoren (2,8%) und in 38 von 331 G3 Tumoren (11,5%; $p < 0,0001$).

3.1.3. Prognoserelevanz

Die Untersuchung der prognostischen Bedeutung der zur Verfügung stehenden Parameter zeigt, dass sowohl pT-Status, BRE-Grad, pN- und M-Status hochsignifikant mit der Prognose assoziiert sind, wobei dies sowohl bei gleichzeitiger Betrachtung aller Tumortypen (Abbildung 4 a-d) als auch bei isolierter Betrachtung der NST Tumoren (Abbildung 5 a-d) gilt.

Keine Assoziation zur Prognose fand sich allerdings für den PD-L1 Status. Dies galt für alle Tumoren (Abbildung 6a) wie auch für die Subgruppe des NST (Abbildung 6b).

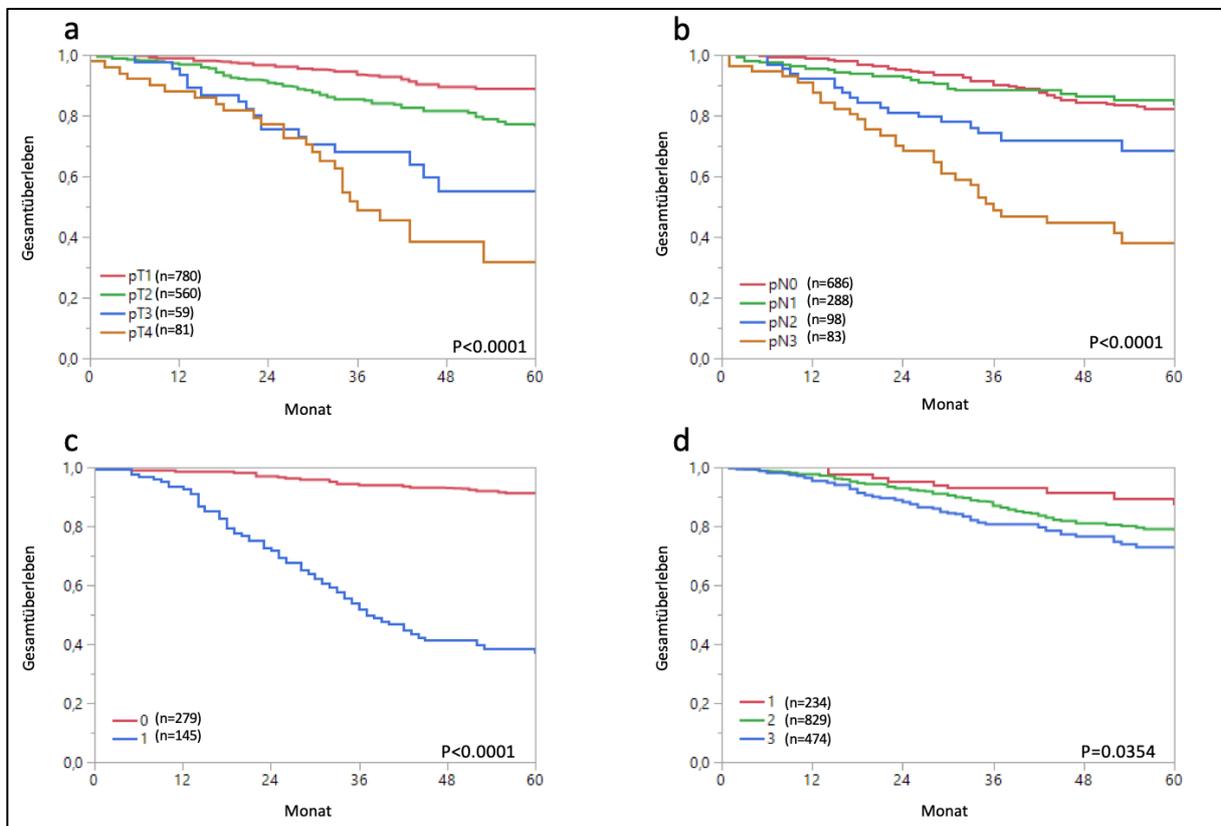


Abbildung 4 a-d: Gesamtüberleben vs (a) pT, (b) pN, (c) M und (d) BRE-Grad

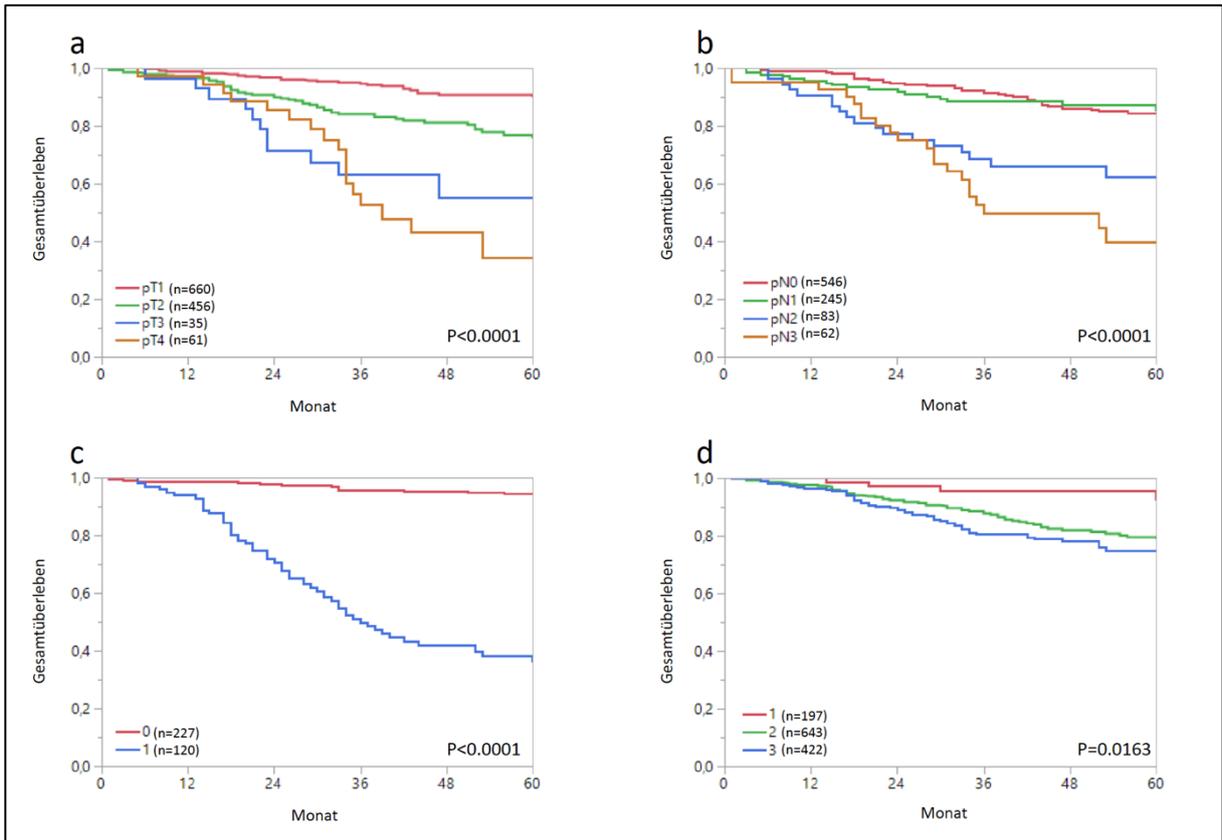


Abbildung 5 a-d: Gesamtüberleben der Subgruppe NST vs (a) pT, (b) pN, (c) M und (d) BRE-Grad

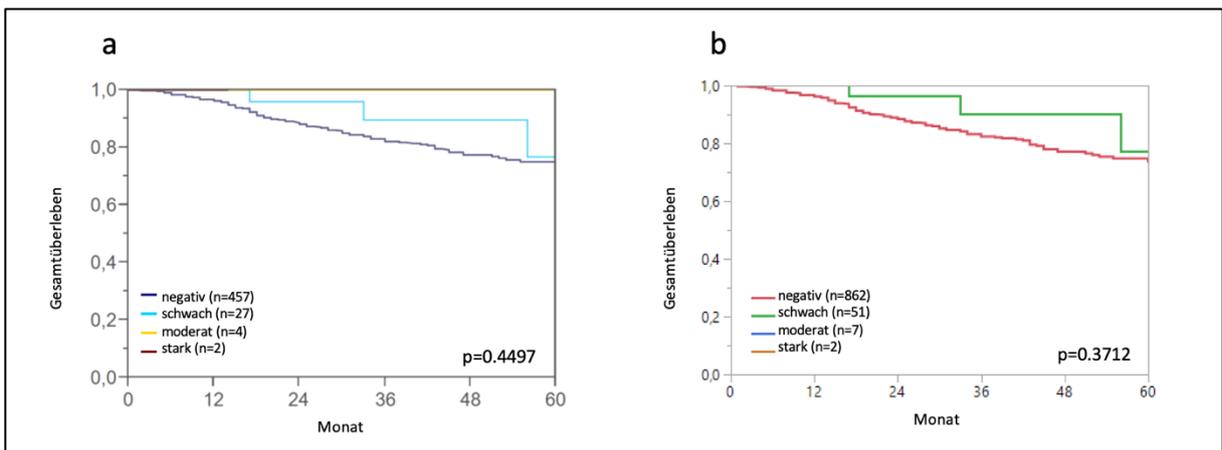


Abbildung 6 a+b: PD-L1 Anfärbung und Gesamtüberleben von (a) allen Tumorentitäten und (b) der Subgruppe NST

3.2. Heterogenitäts TMA

Der untersuchte Heterogenitäts TMA enthielt 2133 Tumorgewebeproben (bis zu 8 pro Patient) von 267 Patienten. 1238 Gewebeproben (58%) von 241 Patienten (90,2%) waren auswertbar. Nicht Auswertbarkeit war wiederum bedingt durch entweder Fehlen von eindeutigen Tumorzellen im Gewebe oder komplettes Fehlen von Gewebe an dem entsprechenden TMA Spot. Eine Positivität für PD-L1 fand sich auf Tumorzellen in 15 von den 978 interpretierbaren Spots (1,21%). Auf Entzündungszellen der TMA Spots fand sich keine Anfärbung. Insgesamt belief sich die Positivitätsrate des Heterogenitäts Tissue-Microarrays bezogen auf Patienten auf 2,48%, bei 6 von 241 auswertbaren Fällen.

Die Untersuchung mehrerer Proben pro Patient führte zu einer Erhöhung der Positivitätsrate. Bei Patienten mit 1 bis 3 auswertbaren TMA Spots war die Positivitätsrate 0,91%, bei Patienten mit 4 bis 5 auswertbaren Gewebeslots war die Positivitätsrate 1,64%, bei Patienten mit mehr als 6 auswertbaren Gewebeslots lag die Rate bei 2,43%. Eine bekannte hämatogene Metastasierung lag in unserem Tumorkollektiv nicht vor.

Die PD-L1 Befunde sind für die sechs Patienten mit mindestens einem PD-L1 positivem Spot in Abbildung 20 dargestellt. Die Darstellung macht deutlich, dass die PD-L1 Expression regelhaft heterogen ist. Bei einem der Patienten fand sich eine PD-L1 Positivität in allen Stenzen, allerdings war bei diesem nur eine Stanze auszuwerten, sodass eine mögliche Homogenität oder Heterogenität nicht zu beurteilen war. Tatsächlich waren nur bei 4 von 6 Patientinnen mit nachweisbarer PD-L1 Expression im Tumor mehr als ein Gewebeslot positiv. Die histopathologischen Befunde des Heterogenitäts Tissue-Microarray sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 9: PD-L1 positive Fälle und Anzahl der untersuchten Stenzen

Heterogenitäts TMA	Positive Stenzen (Untersuchte Stenzen)	Gesamtanzahl untersuchter Stenzen
Pat. A	3	7
Pat. B	3	8
Pat. C	4	5
Pat. D	1	1
Pat. E	1	7
Pat. F	4	7

Tabelle 10: PD-L1 Anfärbung im Heterogenitäts TMA und Tumor Phänotyp

Heterogenitäts TMA		n	negativ (%)	positiv (%)
Alle Entitäten		267	97.8	2.2
Histologischer Subtyp				
Invasives Karzinom, kein spezieller Typ (NST)		204	97.5	2.5
Invasives lobuläres Karzinom		52	100.0	0.0
Tubuläres Karzinom		2	100.0	0.0
Muzinöses Karzinom		2	100.0	0.0
Invasives papilläres Karzinom		2	100.0	0.0
Karzinome mit apokriner Differenzierung		1	0.0	100.0
pT				
	pT1	79	98.7	1.3
	pT2	128	96.9	3.1
	pT3	17	94.1	5.9
	pT4	30	100.0	0.0
N				
	N0	103	97.1	2.9
	N1	101	97.0	3.0
Grading				
	1	32	100.0	0.0
	2	148	100.0	0.0
	3	78	96.2	3.8

4. Diskussion

Die zentrale Methode dieser Doktorarbeit war die Tissue-Microarray Technik. Das Verfahren wurde vor 20 Jahren zum ersten Mal von Kononen et al. (1998) publiziert und hat sich seither zu einer vielfach genutzten Methode zur Untersuchung großer Patientenkollektive entwickelt. Tatsächlich sind heute immunhistochemische Untersuchungen größerer Patientenserien, welche nicht an Tissue-Microarrays durchgeführt wurden, selten geworden. Die Tissue-Microarray Methode führt zu einer massiven Effizienzsteigerung derartiger Untersuchungen (Simon and Sauter, 2002). Das Verfahren ist recht simpel. Von tumorenhaltenden Gewebeblöcken werden kleine, meist 0,6 mm im Durchmesser messende Stanzen entnommen und dann in einen leeren Paraffinblock eingebracht, in den vorher entsprechende Löcher gestanzt wurden. Die exakte Deponierung der Gewebeproben bestimmter Patienten an einem genau definierten Ort im TMA (mithilfe eines Koordinatensystems) erlaubt die Zuordnung jedes einzelnen Gewebeelements zu einem bestimmten Patienten. Typischerweise enthalten Tissue-Microarray Blöcke zwischen 500 und 700 Patientenproben. Diese 700 Patientenproben können nun mit der gleichen Reagenzienmenge und Arbeitskraft immunhistochemisch untersucht werden, wie es bei konventionellen Untersuchungen für einen einzigen Tumor nötig wäre. Arbeitskraft und Reagenzienmengen werden somit um einen Faktor 500-700 reduziert (Simon and Sauter, 2003). Neben Kosteneinsparungen und Geschwindigkeitssteigerung der Untersuchungen bestehen weitere Vorteile, welche im Wesentlichen zu einer maximal möglichen Standardisierung der immunhistochemischen Untersuchung führen (Al Kuraya et al., 2004). Alle Proben einer Studie werden nämlich unter unübertreffbar identischen Bedingungen untersucht. Dazu gehören die allgemein bekannten relevanten Parameter wie Reagenzienkonzentrationen, Reagenzientemperaturen oder Inkubationszeiten, aber auch „weiche“ Parameter, welche ebenfalls die Färbeintensität beeinflussen wie die Schnittdicke und die Zeitspanne zwischen Herstellung des Schnittes und der immunhistochemischen Färbung. Wahrscheinlich ist auch die Auswertung von Tissue-Microarrays einfacher zu standardisieren als die Auswertung von Großschnitten, denn die untersuchbare Gewebemenge ist in Studien bei denen Großschnitte untersucht werden zwischen Patienten sehr unterschiedlich. Manche Präparate enthalten nur wenig Tumor, andere enthalten reichlich Tumor. Gerade bei heterogenen Befunden ist die Wahrscheinlichkeit einer Positivität bei größeren Tumorproben höher als bei kleineren (Ahmed and Gravel, 2018). Im Übrigen steigt auch die Wahrscheinlichkeit von Färbeartefakten mit der immunhistochemisch gefärbten Gewebemenge an. Relevante Daten, die zeigen, dass Schnitte im Vergleich zu Tissue-Microarrayschnitten ein höheres Artefaktrisiko aufweisen stammen aus einer Studie von Torhorst et al. (2001). In dieser Untersuchung an mehr als 500 Mammakarzinomen auf Großschnitten und an Tissue-Microarrays fand sich für p53 eine deutlich höhere Rate der Positivität an Großschnitten (42,8%) als an Tissue-Microarrays

(15,2%-20,9%). Da die p53 Positivität an Tissue-Microarrays hochsignifikant mit der Prognose assoziiert war, eine derartige Assoziation für die häufiger positiven Großschnitte aber nicht gefunden werden konnte, wurde gefolgert, dass die p53 Daten wegen Artefakten an den Großschnitten weniger aussagekräftig waren als an den TMAs. Für Pathologen, welche immunhistochemische Färbungen an Tumoren auswerten, haben die Tissue-Microarrays auch den Vorteil, dass eine große Zahl von Präparaten auf einem Schnitt sichtbar sind, sodass in Grenzfällen immer wieder zwischen der Färbeintensität verschiedener Tumoren verglichen werden kann. Die Möglichkeit des permanenten Vergleichens ermöglicht es wahrscheinlich, die Färbeintensitäten standardisierter zu beurteilen, als bei der einzelnen Beurteilung der Großschnitte¹. Die größte „Schwäche“ ist die Limitation von Tissue-Microarrays, heterogene Befunde nachzuweisen (Jawhar, 2009). Verschiedene Untersucher haben deswegen früher vorgeschlagen, für Tissue-Microarrays nicht nur einen 0,6 mm messenden Gewebezylinder zu verwenden sondern multiple, meist drei bis vier Zylinder (Tennstedt et al., 2012, Sauter, 2010). Am Institut für Pathologie des UKE werden Tissue-Microarrays immer mit nur einem Gewebeelement pro Patient hergestellt. Ein wesentlicher Grund hierfür ist, dass man es vermeiden möchte, eine unterschiedliche Anzahl von auswertbaren Gewebestücken pro Patient zu haben. Je mehr Stenzen von einem Patient zur Untersuchung kommen, desto höher wird die Chance, ein positives Ergebnis zu erzielen, einerseits wegen möglicher Gewebheterogenität, andererseits aber auch wegen möglicher Artefaktfärbungen. Die Verwendung eines TMAs mit ausschließlich einem Spot pro Patienten führt dazu, dass wie in unserem Fall einzelne Patienten nicht auswertbar sind, weil entweder die Stanze keine Tumorzellen enthält oder aber kein Gewebespots auf dem TMA Schnitt vorhanden ist. Letzteres ist meist durch die fehlende Standardisierung der Länge der in die TMA eingebrachten Zylinder bedingt. Diese Länge ist definiert durch die Dicke des Gewebestücks welches in dem Spenderblock liegt. Die Dicke der eingebetteten Gewebestücke ist in keinem Pathologieinstitut standardisiert. Wenn die Zahl der in einem TMA befindlichen Patienten groß genug ist um statistisch relevante Aussagen zu erzielen, ist es nicht störend, dass ein Teil der Patienten, auch wenn dieser 50% beträgt, für die Studie ausfällt. Das beste Beispiel hierfür ist der Hamburger Prostatakarzinom Tissue-Microarray mit mehr als 17.500 Patienten. Die meisten Studien, die mit diesem TMA durchgeführt werden, führen am Ende nur zu 13.000-14.000 interpretierbaren Daten (Bonk et al., 2019, Gerhauser et al., 2018, Hoflmayer et al., 2019). Diese Zahl ist aber immer noch deutlich größer als in vergleichbaren Studien, welche an anderen Orten durchgeführt werden. Viele Forscher verwenden Großschnitte lieber als Tissue-Microarrays, wenn sie heterogene Befunde befürchten oder solche untersuchen wollen. Hierbei ist anzumerken, dass auch die Verwendung von Großschnitten keine Garantie dafür ist heterogene Befunde zu finden. Naturgemäß stammt Material eines Großschnittes aus

¹ Quelle: Prof. Guido Sauter, persönliche Mitteilung

einem definierten, zusammenhängenden Areal in einem Tumor. Für optimierte Heterogenitätsstudien wäre es demnach wünschenswert, nicht einen zufällig ausgewählten Großschnitt zu untersuchen, sondern zumindest Teile von multiplen oder im Optimalfall allen Gewebelöcken eines Tumors. Diesem Gedanken folgend hat die Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie des UKE vor Jahren ein Konzept entwickelt, welches Heterogenitäts Tissue-Microarrays genannt wurde (Burandt et al., 2014). Bei diesem Verfahren werden Tissue-Microarrays speziell dazu hergestellt die Heterogenität von Tumoren zu untersuchen. Zu diesem Zweck werden von bis zu acht verschiedenen Tumorblöcken jeweils eine Gewebeprobe entnommen und auf einen Tissue-Microarray aufgebracht. Zwar werden bei diesem Verfahren wiederum nur 0,6 mm. messende Gewebefragmente untersucht. Die Annahme ist aber, dass wenn ein heterogener Befund Relevanz erlangen sollte, dann sollte er mindestens an einem Ort - dem Ort an dem er auftritt - zu einer Expansion des betreffenden Klon führen und somit mindestens in einer Ecke eines Tumors eine gewisse Größe erreichen. Heterogenitäts TMAs wurden beim Prostatakarzinom (Krohn et al., 2014), Mammakarzinom (Tramm et al., 2018) oder beim Magenkarzinom (Stahl et al., 2015a) erfolgreich angewendet und konnten jeweils eine gute Einordnung der Heterogenität verschiedener Parameter erlauben. Beispielsweise wurde beim Kolonkarzinom gezeigt, dass der p53 Status hochgradig homogen ist, während eine HER2 Amplifikation, wenn sie vorkommt, in den meisten Fällen nur kleine Subpopulationen betrifft (Stahl et al., 2015b). Die hohe Homogenität der p53 Positivität passt gut zu dem Konzept, dass eine p53 Mutation – die Ursache für die immunhistochemische p53 Positivität – eine entscheidende molekulare Veränderung ist, welche prinzipiell zum Zeitpunkt des Übergangs von einem Adenom zu einem invasiven Karzinom auftritt (Ohue et al., 1994). Damit ist zu erwarten, dass in einem invasiven Karzinom diese Veränderung in der Regel homogen vorliegen sollte.

In der vorliegenden Studie wurde ein hoher experimenteller Aufwand betrieben um die kontroversen Daten der Literatur zu klären. Die Untersuchung von insgesamt 1138 Gewebeproben aus Karzinomen ergab, dass die PD-L1 Positivität beim Mammakarzinom ein relativ seltenes und hochgradig heterogenes Ereignis darstellt (Tab. 11).

Tabelle 11: PD-L1 Anfärbung der Tumoren der Tissue-Microarrays

Arrays	n	PD-L1 negativ	PD-L1 positiv	PD-L1 positiv in %
Prognose TMA	892	835	57	6,39%
Heterogenitäts TMA	246	240	6	2,43%
Summe	1138	1075	63	5,53%

Insgesamt sprechen die Befunde auch im Vergleich zu anderen Tumoren eher gegen eine relevante Rolle von PD-L1 beim Mammakarzinom. Dies gilt für die rein numerischen Befunde, unsere Positivitätsrate liegt bei 5,5%, aber auch die Tatsache dass die meisten positiven Tumoren eine nur schwache Expression zeigten. Darüber hinaus deuten die Daten aus unserem Heterogenitätsarray darauf hin, dass der PD-L1 Status einer relativ hohen Heterogenität unterliegt. Unter der Annahme eines meist heterogenen PD-L1 Status haben wir die frühere Literatur separat für TMA-Studien und Großschnittstudien in Säulendiagrammen zusammengefasst (Abb. 7).

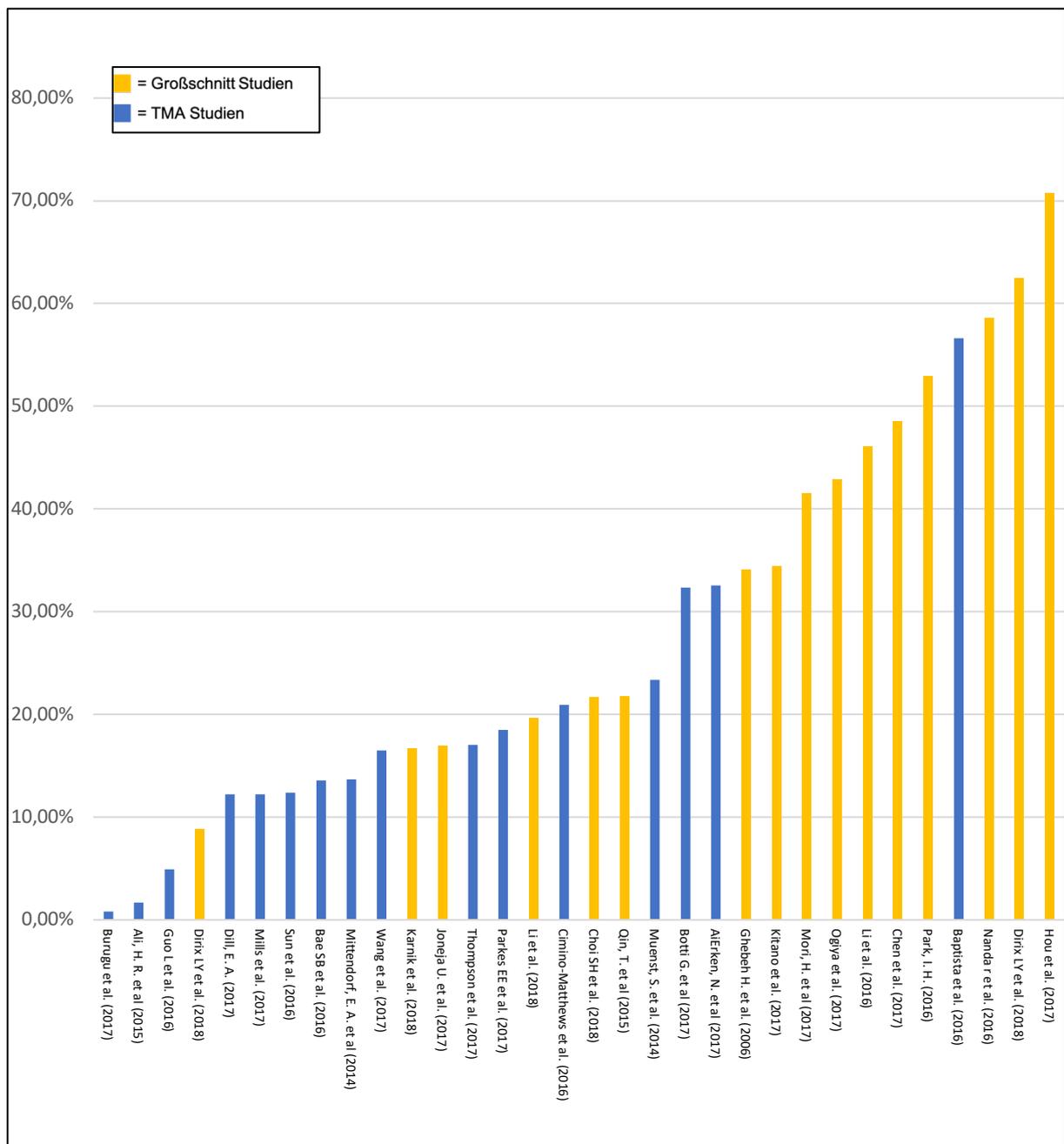


Abbildung 7: PD-L1 Anfärbung in %

Die insgesamt 16 TMA-Studien zeigen eine Variabilität von unter 1% bis 56,6%, wobei die Studie mit 56,6% (Baptista et al., 2016) einen Ausreißer darstellt. Die Studie scheint ein mehr oder weniger konsekutives Patientengut zu betreffen ohne eine erkennbare Selektion. Andere Autoren, die den gleich Antikörper wie Baptista et al. verwendeten, (Rabbit, polyclonal, AbCam) hatten auch überdurchschnittlich hohe Werte berichtet. So fand Li et al. (2018) 19,64% Positivität in 112 Fällen, Park et al. (2016) 52,9% in 308 Fällen und Muenst et al. (2014) 23,8% bei 650 Fällen. Die meisten TMA Studien hatten relativ konstant Werte zwischen 12 und 20% ergeben. Dies sind nur wenige Prozent mehr als in unserer Studie. Besonders auffällig sind die beiden Studien von Burugu (n=2918) und Ali (n=3916), welche 1,7% beziehungsweise 0,8% positive Fälle in sehr großen Patientenkollektiven berichteten. Eine mögliche Erklärung könnte die Verwendung älterer TMA Schnitte sein. In beiden Publikationen wird nicht beschrieben, wie lange die Zeit zwischen der Herstellung der TMA Schnitte und der immunhistochemischen Färbung dauerte. Es ist bekannt, dass die Färbeintensität vieler Antikörper bereits nach einer zweiwöchigen Lagerung von TMA Schnitten massiv abnimmt (Mirlacher et al., 2004). Dieser Umstand ist nicht allgemein bekannt, viele Institutionen schneiden daher TMAs auf Reserve und verwenden sie erst, wenn eine Studie ansteht.²

Der niedrigste Wert in einer Großschnittstudie ist 8,8% in einer Publikation von Dirix et al. (2017). Generell zeigen einige der Großschnittstudien Werte zwischen 13 und 24%, was in etwa unseren Befunden an den TMAs entspricht. Dann gibt es eine zweite Gruppe von Großschnittstudien mit stark ansteigenden Werten von 32 bis 71,5%. Einige dieser Studien untersuchen aber selektionierte Patientenkollektive, wie zum Beispiel in der Studie von Hou et al. (2018) mit einer Positivität von 70,2% in HER2 positiven Tumoren. HER2 positive Karzinome sind zu einem sehr hohen Teil Grad 3 Tumoren. Die signifikante Assoziation des PD-L1 Status mit dem BRE-Grad in unserer Studie macht deutlich, dass in G3 Tumoren eine höhere Rate PD-L1 positiver Fälle zu erwarten ist. Auffällig ist auch, dass die Studien mit digitaler Quantifizierung von PD-L1 wie zum Beispiel die Studie von Schalper et al. (2014) besonders hohe Werte PD-L1 positiver Tumoren fanden. Schalper berichtete in seiner Studie über 55,7% positiver Tumoren.

Eine weitere Möglichkeit für Diskrepanzen sind die Verwendung unterschiedlicher Antikörper und Auswertekriterien. In Tabelle 12 sind für die 31 von uns als besonders relevant empfundenen Publikationen jeweils die verwendeten Antikörper und die Kriterien für die Definition einer Positivität dargestellt:

² Quelle: Prof. Guido Sauter, persönliche Mitteilung

Tabelle 12: IHC Studien: Genutzte Antikörper und Cut-Offs

Autor (Jahr)	Antikörper	Definition PD-L1 positiv
AiErken et al. (2017)	Rabbit primärer AK (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)	> 1,5% Anfärbung
Ali et al. (2015)	Rabbit monoklonaler AK (E1L3N, Cell Signalling Technology, catalogue #13684)	> 1% Anfärbung
Botti et al. (2017)	Rabbit primärer monoklonaler AK (SP142; Spring Bioscience Corp.)	> 10% Anfärbung
Mittendorf et al. (2014)	Mouse monoklonaler AK (5H1, Catalogue #MABC1115)	> 5% Anfärbung
Muenst et al. (2014)	Rabbit polyklonaler AK (ab58810; Abcam, Cambridge, UK)	H-Score, Cut-Off 99%
Bae et al. (2016)	Rabbit monoklonaler AK (E1L3N, Cell Signalling Technology, catalogue #13684)	H-Score, Cut-Off 99%
Qin et al. (2015)	Rabbit monoklonaler AK (E1L3N, Cell Signalling Technology, catalogue #13684)	> 5% Anfärbung
Park et al. (2016)	Rabbit polyklonaler AK (ab58810; Abcam, Cambridge, UK)	H-Score, Cut-Off 199%
Mori et al. (2017)	Rabbit monoklonaler AK (E1L3N, Cell Signalling Technology, catalogue #13684)	> 1% Anfärbung
Baptista et al. (2016)	Rabbit polyklonaler AK (ab58810; Abcam, Cambridge, UK)	Allred Score >2
Li et al. (2016)	Rabbit polyklonaler AK (ab58810; Abcam, Cambridge, UK)	H-Score, Cut-Off 99%
Sun et al. (2016)	Rabbit monoklonaler AK (E1L3N, Cell Signalling Technology, catalogue #13684)	> 5% Anfärbung
Dill et al. (2017)	Rabbit monoklonaler PD-L1 AK (clone SP142; catalog #M4420; Spring Bioscience, Pleasanton, CA)	> 1% Anfärbung
Ghebeh et al. (2006)	Mouse monoklonaler AK (MIH1 clone; ebioscience)	jegliche Anfärbung
Ogiya et al. (2016)	Rabbit polyklonaler AK (ab58810; Abcam, Cambridge, UK)	> 10% Anfärbung
Hou et al. (2018)	Rabbit monoklonaler PD-L1 AK (clone SP263, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ)	> 1% Anfärbung
Burugu et al. (2017)	Rabbit monoklonaler PD-L1 AK (clone SP142)	> 1% Anfärbung

Wang et al. (2017)	Rabbit monoklonaler PD-L1 AK (clone SP142; catalog #M4420; Spring Bioscience, Pleasanton, CA)	H-Score, Cut-Off 99%
Dirix et al. (2017)	Rabbit monoklonaler PD-L1 AK (73-10 pharmDx; Dako, Carpinteria, CA, USA)	> 1% und >10% Anfärbung
Kitano et al. (2017)	Polyklonaler AK (#4059, ProScience, Poway, California, USA).	jegliche Anfärbung
Parkes et al. (2017)	Rabbit monoklonaler PD-L1 AK (SP142, Roche)	> 1% Anfärbung
Joneja et al. (2017)	Rabbit monoklonaler PD-L1 AK (clone SP142, Spring Bioscience)	> 5% Anfärbung
Guo et al. (2016)	Rabbit monoklonaler PD-L1 AK (clone SP142; Ventana, Tucson, AZ)	> 10% Anfärbung
Nanda et al. (2016)	Polyklonaler AK (22C3, Merck & Co., Kenilworth, NJ)	> 1% Anfärbung
Choi et al. (2018)	Rabbit Polyklonaler AK (Cat. # ABF133 EMD Millipore, Temecula, CA, USA)	> 5% Anfärbung
Li et al. (2018)	Rabbit polyklonaler AK (ab58810; Abcam, Cambridge, UK)	IRS >2
Chen et al. (2017)	Polyklonaler AK (22C3, Merck & Co., Kenilworth, NJ)	Moderate Anfärbung (≥3/5)
Mills et al. (2017)	Rabbit monoklonaler PD-L1 AK (clone SP142; catalog #M4420; Spring Bioscience, Pleasanton, CA)	> 1% Anfärbung
Karnik et al. (2018)	Rabbit monoklonaler PD-L1 AK (clone SP263, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ)	> 1% Anfärbung
Thompson et al. (2016)	Rabbit monoklonaler PD-L1 AK (clone SP142; Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA)	> 5% Anfärbung
Cimino-Mathews et al. (2016)	Mouse monoklonaler AK (5H1, Catalogue #MABC1115)	> 5% Anfärbung

Dass selbst ähnliche Auswertungsverfahren unterschiedliche Ergebnisse zutage fördern, zeigt Abbildung 8, welche anhand von ausgewählten IHC-Studien zeigt, dass bei einem teils geringeren Cut-Off-Wert für PD-L1-Positivität trotzdem geringere Häufigkeiten von PD-L1 Anfärbungen auftreten können.

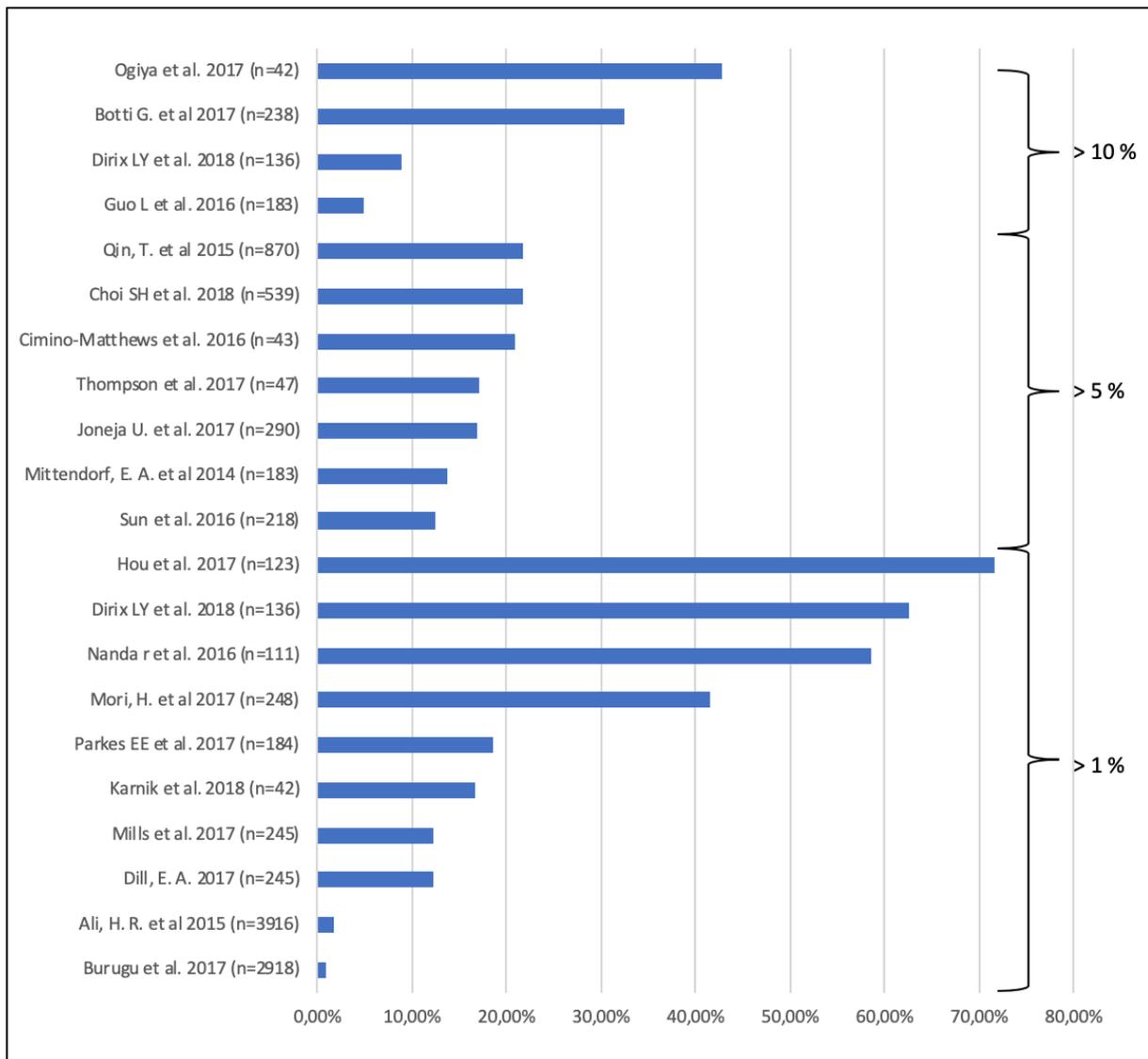


Abbildung 8: Anfärbung von Tumorzellen und Cut-Off Werte³

Die Auflistung macht deutlich, wie heterogen die verwendeten Verfahren zur PD-L1 Bestimmung sind. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die großen Diskrepanzen zwischen verschiedenen Studien durch unterschiedliche Färbungen verschiedener Laboratorien bedingt sind. Ein weiterer Aspekt für Variabilität von Färbungen könnten verwendete Fixationsmittel sein, bei vielen Studien stammen die Proben aus zahlreichen verschiedenen Pathologielaboratorien, teilweise aus verschiedenen Ländern. Die HER2-Immunhistochemie ist das bekannteste Beispiel für eine klinisch relevante immunhistochemische Anfärbung, die dann falsch positiv wird, wenn das Gewebe während der Fixationsphase Alkohol exponiert war. Eine Alkoholexposition kann durch eine absichtlich durchgeführte Alkoholfixation bedingt sein, wie diese früher in verschiedenen Laboratorien durchgeführt wurde. Die Alkoholfixation führt im Gegensatz zur Formalinfixierung nicht zu einem sogenannten Cross-linking der

³ Anmerkung: die Studie von Dirix et al. (2018) nutzte sowohl 10 % als auch 1 % als Grenzwert.

Proteine sondern zu einer Koagulation (Bancroft, 2008). Die beiden Prozesse führen zu unterschiedlicher Verfügbarkeit von Proteinepitopen. Im Falle von HER2 werden Mammaepithelien - auch normale - nach Alkoholfixation positiv (Hanley et al., 2009). Unbeabsichtigte Alkoholfixierung kann auch in modernen Laboratorien dann erfolgen wenn das Tumorgewebe ungenügend in Formalin fixiert wird. Wird (vermeintlich) bereits formalinfixiertes Gewebe in einem Pathologieinstitut verarbeitet, so durchläuft das Gewebe aufsteigende Alkoholreihen im Rahmen des Versuchs einer Dehydrierung. In diesem Prozess wird nicht formalinfixiertes Gewebe nachträglich Alkoholfixiert. Dieser Vorgang ist immer noch ein klinisches Problem bei der immunhistochemischen HER2 Diagnostik. Inwieweit eine unbeabsichtigte artifizielle Alkoholfixation die PD-L1 Diagnostik beeinflusst, ist nicht bekannt.

Auffallend in dieser Studie ist die besonders starke Beziehung zwischen dem BRE-Grad und der PD-L1 Expression, während das Tumorstadium (pT) nicht eindeutig mit dem PD-L1 Status korreliert. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass der BRE-Grad eindeutig unmittelbar mit der „Malignität“ eines Tumors vergesellschaftet ist. Der BRE-Grad wird höher, je mehr Mitosen, je mehr zytologische Atypie und je weniger Drüsenstrukturen im Tumor vorhanden sind (Elston and Ellis, 1991). All diese Aspekte sind eindeutige Entdifferenzierungsphänomene. Das pT-Stadium ist in der Hinsicht weniger eindeutig mit der Tumormalignität assoziiert. Im Prinzip spiegelt das pT-Stadium in erster Linie die Tumorgöße wider. Die Tumorgöße ist nicht nur davon abhängig, wie schnell ein Tumor wächst, sondern auch wie früh dieser erkannt wurde. Es ist nicht zu erwarten, dass ein spät entdeckter, an sich wenig aggressiver Tumor, der aber genügend Zeit hatte eine gewisse Größe zu erreichen, biologisch anders sein sollte, als ein gleichartiger Tumor, der früher in einem kleinen Zustand entdeckt wurde. Auch sind die Kriterien für die Definition der pT-Stadien recht arbiträr, entscheidende Schwellenwerte liegen bei 2 und 5 cm. Prinzipiell muss nicht erwartet werden, dass ein Tumor der 2,1 cm im Durchmesser misst (pT2), sich biologisch erheblich anders verhält als ein Tumor, der 1,9 cm im Durchmesser aufweist (pT1). Im Prinzip sprechen diese Befunde dafür, dass der BRE-Grad ein Parameter für die Wachstumsgeschwindigkeit, Aggressivität und Entdifferenzierung eines Tumors ist, während das Tumorstadium mit diesen biologischen Parametern weniger korreliert.

Insgesamt deuten unsere Daten darauf hin, dass das PD1/PD-L1 Regelsystem zumindest in BRE-Grad 1 und 2 Tumoren von untergeordneter Bedeutung sein dürften. Die relativ hohe Häufigkeit in G3-Tumoren, welche ohnehin die aggressivsten Mammakarzinome sind, könnte aber dafür sprechen, dass diese Tumorgruppe von einer Therapie mit Anti-PD1 oder Anti-PD-L1 Antikörpern profitieren könnte. Entsprechende Studien sind auch im Gang. Eine Gruppe der Yale School of Medicine, Connecticut untersucht beispielsweise derzeit einen

neoadjuvanten Therapieansatz basierend auf einer Kombination von Paclitaxel und dem PD-L1 Inhibitor Durvalumab bei verschiedenen Mammakarzinomen.⁴ Das National Cancer Institute der Vereinigten Staaten von Amerika führt derzeit eine Studie bezüglich der Kombination von PD-L1 Inhibitoren mit Etoriximab bei inoperablen Karzinomen durch.⁵

Bezüglich Therapien mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren sehen wir wahrscheinlich aktuell nur die Spitze des Eisberges. Die gegenwärtige Erkenntnislage zeigt, dass Medikamente gegen PD1 und PD-L1 zumindest bei einigen Tumoren einen substanziellen Effekt erzielen. Allerdings gibt es auf menschlichen Immunzellen mehrere analoge Regelsysteme wie beispielsweise TIGIT (Chauvin et al., 2015), CD137 (Lynch, 2008) und CTLA-4 (Hodi et al., 2010).

Bereits die Kombination von Anti PD1/PD-L1 Medikamenten mit klassischen Chemotherapien oder anderen Tumortherapien hat teilweise einen synergistischen Effekt gezeigt (Hung et al., 2018). Für die Zukunft darf gehofft werden, dass Kombinationen von Checkpoint-Inhibitoren die verschiedenen Regelsysteme gleichzeitig angreifen eine Rolle spielen könnten. Ein Problem wird in dieser Situation aber sein, dass zur Zeit verhältnismäßig viele derartige Medikamente entwickelt werden und es möglicherweise nicht genug Patienten geben wird, um alle möglichen Kombinationen zu testen. Dies unterstreicht die besondere Rolle der Diagnostik. Es ist für den Erfolg der Immuntherapien von essenzieller Bedeutung, dass die Pathologen Wege finden, diese Checkpoint-Inhibitoren und ihre relevanten Liganden adäquat zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigen die Daten unserer Studien, dass PD-L1 bei Mammakarzinom eher selten, meist heterogen und vor allem in Grad 3 Tumoren exprimiert wird. Im Vergleich zu anderen Tumorarten scheint die PD-L1 Expression beim Mammakarzinom eher gering und von untergeordneter biologischer Bedeutung zu sein. Dennoch könnte auf Grund der hohen Häufigkeit des Mammakarzinoms zumindest in Subgruppen (zum Beispiel G3-Tumoren) eine Anti PD1/Anti PD-L1 Therapie nützlich sein.

⁴ Quelle: ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02489448 Stand: 05.03.2020

⁵ Quelle: ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02453620 Stand: 05.03.2020

5. Zusammenfassung

Therapien mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren sind aus der modernen Onkologie nicht mehr wegzudenken. Zahlreiche Medikamente inhibieren PD1 oder PD-L1, ein Regelsystem welches dazu dient, überschießende Entzündungen zu verhindern, aber auch die Immunantwort auf Tumorgewebe hemmt. Tumoren sprechen insbesondere dann gut auf eine derartige Therapie an, wenn PD-L1 im Tumorgewebe oder in assoziierten histiozytären Zellen überexprimiert wird. Die Häufigkeit mit der dies in Mammakarzinomen passiert, wird in der Literatur sehr widersprüchlich angegeben. Die Häufigkeit reicht von unter 1% bis über 70%. Zur Klärung der Frage, wie häufig PD-L1 in Mammakarzinomen exprimiert wird und ob eine besonders hohe Heterogenität der PD-L1 Expression zu diesen diskrepanten Ergebnissen beiträgt wurden zwei Tissue-Microarray-Systeme immunhistochemisch mit einem Antikörper von Cell Signaling Technology® (Hase, Polyklonal, Klon (E1L3N®)XP®, Referenznummer #13684, Verdünnung 1:200) gegen PD-L1 untersucht. Tissue-Microarray 1 umfasste 892 auswertbare Mammakarzinome mit assoziierten Prognosedaten. Tissue-Microarray 2 war ein Mammakarzinom Heterogenitätsarray mit jeweils acht Stanzten aus unterschiedlichen Blöcken von besonders großen Mammatumoren. Die Untersuchung am Prognosearray ergab eine PD-L1 Positivität in Tumorzellen in 6,4% und in intratumoralen Histiozyten in 3,2%. Die PD-L1 Positivität war hochsignifikant mit dem BRE-Grad assoziiert. Grad 1 Tumoren waren in 0%, Grad 2 Tumoren in 2,5 % und Grad 3 Tumoren in 14,4 % PD-L1 positiv ($p < 0.0001$). Die PD-L1 Expression war nicht mit dem pT-Stadium, pN, dem Vorliegen hämatogener Metastasen oder der Patientenprognose assoziiert. Die Heterogenitätsuntersuchung von bis zu 8 Entnahmeorten bei 241 Patienten ergab bei 6 Patienten (2,48%) eine PD-L1 Positivität. Die PD-L1 Positivität war in allen Fällen heterogen. In je 2 PD-L1 positiven Tumoren waren 1,3, und 4 Proben (von 1-8) positiv. Die Befunde dieser Untersuchung zeigen, dass PD-L1 Expression beim Mammakarzinom selten ist und meist hochgradig heterogen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass das Mammakarzinom weniger geeignet ist für eine Therapie mit Medikamenten gegen PD1 oder PD-L1 als viele andere Tumoren. Die deutlich größere Häufigkeit der PD-L1 Expression in den besonders aggressiven G3 Tumoren lässt allerdings hoffen, dass möglicherweise in diesem Patienten Subset eine Therapie mit in das PD1/PD-L1 System eingreifenden Immun-Checkpoint-Inhibitoren erfolgreich sein könnte. Entsprechende Studien sind derzeit in Arbeit.

6. Abstract

Therapies with checkpoint inhibitors have become an essential part of modern oncotherapy. Various drugs inhibit PD-1 or PD-L1, a signaling mechanism, which suppresses excessive reactions of the immune system, but as well downregulates the response on tumor cells. Especially tumors or associated histiocytes with a high level of PD-L1 expression show a good sensitivity on aforementioned therapy. The prevalence of PD-L1 expression in breast cancer described in studies is very contradictory, as it reaches from 1% to 70%. Two tissue microarrays were stained with an PD-L1 antibody by Cell Signaling Technology® (rabbit, polyclonal, clone (E1L3N®)XP®, ref. #13684 dilution 1:200), to determine how often PD-L1 is expressed in breast cancer, as well as to find out if a heterogeneous expression contributes to such discrepant results. Tissue microarray 1 included 892 evaluable breast cancers with associated prognostic data. Tissue microarray 2 was a breast cancer heterogeneity array with each eight punches from different blocks of especially big breast cancers. The staining of the prognostic microarray resulted in PD-L1 prevalence of 6,4% in tumor cells and 3,2% in histiocytes. The PD-L1 positivity was highly significant associated with the BRE-grading. Grade 1 tumors were in 0 %, grade 2 tumors were in 2,5 % and grade 3 tumors were in 14,4 % PD-L1 positive ($p < 0.0001$). A PD-L1 expression was neither with the TNM staging, nor with the patients prognosis associated. The heterogeneity examination of up to 8 punches of 241 patients showed positivity in 6 patients (2,48%). The PD-L1 positivity was heterogeneous in each of the cases. In each 2 tumors 1,3 or 4 punches were positive (1 to 8 Punches were taken). The findings of this study show, that PD-L1 positivity in breast cancer is rare and heterogeneous. They furthermore suggest, that an anti PD-L1 therapy is less suitable for breast cancer, than for many other types of tumors. The noticeable higher prevalence of PD-L1 expression in grade 3 tumors gives hope, that a checkpoint inhibitor therapy could be successful for this subset of patients. Corresponding studies are in progress.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
Abb.	Abbildung
BRE	Bloom-Richardson-Ellis (Grad der Tumordifferenzierung)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
IHC	Immunhistochemie
Min.	Mindestens
OS	Overall survival (=Gesamtüberleben)
PD-1/PD-L1	Programmed cell death (ligand) 1
pN	Lymphknotenstatus
pT	Tumorstatus (Ausdehnung des Primärtumors)
Tab	Tabelle
TMA	Tissue-Microarray
TNM	TNM-System, internationale Klassifikation maligner Tumoren
UICC	Union international contre le cancer

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität für Mammakarzinom nach Altersgruppe, Deutschland, 1999–2013/2014 (Barnes et al., 2016)	6
Abbildung 2: Wirkungsweise PD-L1	7
Abbildung 3 a/b: PD-L1 positive Mammakarzinome mit PD-L1 Färbung in 10-30% der Tumorzellen .	14
Abbildung 4 a-d: Gesamtüberleben vs (a) pT, (b) pN, (c) M und (d) BRE-Grad	18
Abbildung 5 a-d: Gesamtüberleben der Subgruppe NST vs (a) pT, (b) pN, (c) M und (d) BRE-Grad .	19
Abbildung 6 a+b: PD-L1 Anfärbung und Gesamtüberleben von (a) allen Tumorentitäten und (b) der Subgruppe NST	19
Abbildung 8: PD-L1 Anfärbung in %	25
Abbildung 9: Anfärbung von Tumorzellen und Cut-Off Werte	29

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Neoadjuvante Therapieoptionen beim Mammakarzinom	5
Tabelle 2: Zugelassene PD-L1/PD-1-Antikörper (*Nur USA) Stichtag: 01.08.2019	8
Tabelle 3: Tumorkollektiv des Prognose Tissue-Mikroarrays.....	10
Tabelle 4: Tumorkollektiv des Heterogenitäts Tissue-Mikroarrays	11
Tabelle 5: PD-L1 Färbung in Mammakarzinom Subtypen	15
Tabelle 6: PD-L1 Anfärbung beim Mammakarzinom und Tumor Phänotyp.....	15
Tabelle 7: PD-L1 Anfärbung beim Mammakarzinomsubtyp NST und Tumor Phänotyp	16
Tabelle 8: PD-L1 Anfärbung in Histozyten bei Mammakarzinom und Tumor Phänotyp	17
Tabelle 9: PD-L1 positive Fälle und Anzahl der untersuchten Stenzen.....	20
Tabelle 10: PD-L1 Anfärbung im Heterogenitäts TMA und Tumor Phänotyp	21
Tabelle 11: PD-L1 Anfärbung der Tumoren der Tissue-Microarrays.....	24
Tabelle 12: IHC Studien: Genutzte Antikörper und Cut-Offs.....	27

10. Literaturverzeichnis

- AHMED, Z. & GRAVEL, S. 2018. Intratumor Heterogeneity and Circulating Tumor Cell Clusters. *Mol Biol Evol*, 35, 2135-2144.
- AIERKEN, N., SHI, H. J., ZHOU, Y., SHAO, N., ZHANG, J., SHI, Y., YUAN, Z. Y. & LIN, Y. 2017. High PD-L1 Expression Is Closely Associated With Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Leads to Good Clinical Outcomes in Chinese Triple Negative Breast Cancer Patients. *Int J Biol Sci*, 13, 1172-1179.
- AL KURAYA, K., SIMON, R. & SAUTER, G. 2004. Tissue microarrays for high-throughput molecular pathology. *Ann Saudi Med*, 24, 169-74.
- ALI, H. R., GLONT, S. E., BLOWS, F. M., PROVENZANO, E., DAWSON, S. J., LIU, B., HILLER, L., DUNN, J., POOLE, C. J., BOWDEN, S., EARL, H. M., PHAROAH, P. D. & CALDAS, C. 2015. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. *Ann Oncol*, 26, 1488-93.
- BAE, S. B., CHO, H. D., OH, M. H., LEE, J. H., JANG, S. H., HONG, S. A., CHO, J., KIM, S. Y., HAN, S. W., LEE, J. E., KIM, H. J. & LEE, H. J. 2016. Expression of Programmed Death Receptor Ligand 1 with High Tumor-Infiltrating Lymphocytes Is Associated with Better Prognosis in Breast Cancer. *J Breast Cancer*, 19, 242-251.
- BANCROFT, J. D. 2008. *Theory and practice of histological techniques*, Churchill Livingstone Elsevier.
- BAPTISTA, M. Z., SARIAN, L. O., DERCHAIN, S. F. M., PINTO, G. A. & VASSALLO, J. 2016. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Human Pathology*, 47, 78-84.
- BARNES, B., KRAYWINKEL, K., NOWOSSADECK, E., SCHÖNFELD, I., STARKER, A., WIENECKE, A. & WOLF, U. 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut.
- BÖCKER, W., DENK, H., HEITZ, P. U. & MOCH, H. 2008. *Pathologie*, München, Elsevier GmbH.
- BONK, S., KLUTH, M., HUBE-MAGG, C., POLONSKI, A., SOEKELAND, G., MAKROPIDI-FRAUNE, G., MOLLER-KOOP, C., WITT, M., LUEBKE, A. M., HINSCH, A., BURANDT, E., STEURER, S., CLAUDITZ, T. S., SCHLOMM, T., PEREZ, D., GRAEFEN, M., HEINZER, H., HULAND, H., IZBICKI, J. R., WILCZAK, W., MINNER, S., SAUTER, G. & SIMON, R. 2019. Prognostic and diagnostic role of PSA immunohistochemistry: A tissue microarray study on 21,000 normal and cancerous tissues. *Oncotarget*, 10, 5439-5453.
- BORGHAEI, H., PAZ-ARES, L., HORN, L., SPIGEL, D. R., STEINS, M., READY, N. E., CHOW, L. Q., VOKES, E. E., FELIP, E., HOLGADO, E., BARLESI, F., KOHLHÄUFL, M., ARRIETA, O., BURGIO, M. A., FAYETTE, J., LENA, H., PODDUBSKAYA, E., GERBER, D. E., GETTINGER, S. N., RUDIN, C. M., RIZVI, N., CRINÒ, L., BLUMENSCHEN, G. R., JR., ANTONIA, S. J., DORANGE, C., HARBISON, C. T., GRAF FINCKENSTEIN, F. & BRAHMER, J. R. 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 373, 1627-39.
- BOTTI, G., COLLINA, F., SCOGNAMIGLIO, G., RAO, F., PELUSO, V., DE CECIO, R., PIEZZO, M., LANDI, G., DE LAURENTIIS, M., CANTILE, M. & DI BONITO, M. 2017. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Tumor Expression Is Associated with a Better Prognosis and Diabetic Disease in Triple Negative Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci*, 18.
- BURANDT, E., SCHREIBER, M., STEIN, A., MINNER, S., CLAUDITZ, T. S., BOKEMEYER, C., JANICKE, F., FISCH, M., IZBICKI, J. R., KNECHT, R., SAUTER, G. & STAHL, P. R. 2014. Continuous tissue microarray based identification of cancers with homogeneous target expression for successful targeted therapy in clinical routine practice. *Genes Chromosomes Cancer*, 53, 228-39.
- BURUGU, S., GAO, D., LEUNG, S., CHIA, S. K. & NIELSEN, T. O. 2017. LAG-3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: clinical correlates and association with PD-1/PD-L1+ tumors. *Ann Oncol*.

- CHAN, A. & MCGREGOR, S. R. 2012. Prevalence and management of HER2/neu-positive early breast cancer in a single institution following availability of adjuvant trastuzumab. *Intern Med J*, 42, 267-74.
- CHAUVIN, J. M., PAGLIANO, O., FOURCADE, J., SUN, Z., WANG, H., SANDER, C., KIRKWOOD, J. M., CHEN, T. H., MAURER, M., KORMAN, A. J. & ZAROOUR, H. M. 2015. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma patients. *J Clin Invest*, 125, 2046-58.
- CHEN, M., ANDREOZZI, M., POCKAJ, B., BARRETT, M. T., OCAL, I. T., MCCULLOUGH, A. E., LINNAUS, M. E., CHANG, J. M., YEARLEY, J. H., ANNAMALAI, L. & ANDERSON, K. S. 2017. Development and validation of a novel clinical fluorescence in situ hybridization assay to detect JAK2 and PD-L1 amplification: a fluorescence in situ hybridization assay for JAK2 and PD-L1 amplification. *Mod Pathol*, 30, 1516-1526.
- CHOI, S. H., CHANG, J. S., KOO, J. S., PARK, J. W., SOHN, J. H., KEUM, K. C., SUH, C. O. & KIM, Y. B. 2018. Differential Prognostic Impact of Strong PD-L1 Expression and 18F-FDG Uptake in Triple-negative Breast Cancer. *Am J Clin Oncol*.
- CIMINO-MATHEWS, A., THOMPSON, E., TAUBE, J. M., YE, X., LU, Y., MEEKER, A., XU, H., SHARMA, R., LECKSELL, K., CORNISH, T. C., CUKA, N., ARGANI, P. & EMENS, L. A. 2016. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Hum Pathol*, 47, 52-63.
- DILL, E. A., GRU, A. A., ATKINS, K. A., FRIEDMAN, L. A., MOORE, M. E., BULLOCK, T. N., CROSS, J. V., DILLON, P. M. & MILLS, A. M. 2017. PD-L1 Expression and Intratumoral Heterogeneity Across Breast Cancer Subtypes and Stages: An Assessment of 245 Primary and 40 Metastatic Tumors. *Am J Surg Pathol*, 41, 334-342.
- DIRIX, L. Y., TAKACS, I., JERUSALEM, G., NIKOLINAKOS, P., ARKENAU, H. T., FORERO-TORRES, A., BOCCIA, R., LIPPMAN, M. E., SOMER, R., SMAKAL, M., EMENS, L. A., HRINCZENKO, B., EDENFIELD, W., GURTLER, J., VON HEYDEBRECK, A., GROTE, H. J., CHIN, K. & HAMILTON, E. P. 2017. Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. *Breast Cancer Res Treat*.
- EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE, G., DAVIES, C., GODWIN, J., GRAY, R., CLARKE, M., CUTTER, D., DARBY, S., MCGALE, P., PAN, H. C., TAYLOR, C., WANG, Y. C., DOWSETT, M., INGLE, J. & PETO, R. 2011. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 378, 771-84.
- ELSTON, C. W. & ELLIS, I. O. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19, 403-10.
- FITZAL, F., FILIPITS, M., RUDAS, M., GREIL, R., DIETZE, O., SAMONIGG, H., LAX, S., HERZ, W., DUBSKY, P., BARTSCH, R., KRONENWETT, R. & GNANT, M. 2015. The genomic expression test EndoPredict is a prognostic tool for identifying risk of local recurrence in postmenopausal endocrine receptor-positive, her2neu-negative breast cancer patients randomised within the prospective ABCSG 8 trial. *Br J Cancer*, 112, 1405-10.
- GERHAUSER, C., FAVERO, F., RISCH, T., SIMON, R., FEUERBACH, L., ASSENOV, Y., HECKMANN, D., SIDIROPOULOS, N., WASZAK, S. M., HUBSCHMANN, D., URBANUCCI, A., GIRMA, E. G., KURYSHEV, V., KLIMCZAK, L. J., SAINI, N., STUTZ, A. M., WEICHENHAN, D., BOTTCHER, L. M., TOTH, R., HENDRIKSEN, J. D., KOOP, C., LUTSIK, P., MATZK, S., WARNATZ, H. J., AMSTISLAVSKIY, V., FEUERSTEIN, C., RAEDER, B., BOGATYROVA, O., SCHMITZ, E. M., HUBEMAGG, C., KLUTH, M., HULAND, H., GRAEFEN, M., LAWERENZ, C., HENRY, G. H., YAMAGUCHI, T. N., MALEWSKA, A., MEINERS, J., SCHILLING, D., REISINGER, E., EILS, R., SCHLESNER, M., STRAND, D. W., BRISTOW, R. G., BOUTROS, P. C., VON KALLE, C., GORDENIN, D., SULTMANN, H., BRORS, B.,

- SAUTER, G., PLASS, C., YASPO, M. L., KORBEL, J. O., SCHLOMM, T. & WEISCHENFELDT, J. 2018. Molecular Evolution of Early-Onset Prostate Cancer Identifies Molecular Risk Markers and Clinical Trajectories. *Cancer Cell*, 34, 996-1011 e8.
- GHEBEH, H., MOHAMMED, S., AL-OMAIR, A., QATTAN, A., LEHE, C., AL-QUDAIHI, G., ELKUM, N., ALSHABANAH, M., BIN AMER, S., TULBAH, A., AJARIM, D., AL-TWEIGERI, T. & DERMIME, S. 2006. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia*, 8, 190-8.
- GONZALEZ-ERICSSON, P. I., STOVGAARD, E. S., SUA, L. F., REISENBICHLER, E., KOS, Z., CARTER, J. M., MICHIELS, S., LE QUESNE, J., NIELSEN, T. O., LAENKHOLM, A. V., FOX, S. B., ADAM, J., BARTLETT, J. M., RIMM, D. L., QUINN, C., PEETERS, D., DIECI, M. V., VINCENT-SALOMON, A., CREE, I., HIDA, A. I., BALKO, J. M., HAYNES, H. R., FRAHM, I., ACOSTA-HAAB, G., BALANCIN, M., BELLOLIO, E., YANG, W., KIRTANI, P., SUGIE, T., EHINGER, A., CASTANEDA, C. A., KOK, M., MCARTHUR, H., SIZIOPIKOU, K., BADVE, S., FINEBERG, S., GOWN, A., VIALE, G., SCHNITT, S. J., PRUNERI, G., PENAU-LLORCA, F., HEWITT, S., THOMPSON, E. A., ALLISON, K. H., SYMMANS, W. F., BELLIZZI, A. M., BROGI, E., MOORE, D. A., LARSIMONT, D., DILLON, D. A., LAZAR, A., LIEN, H., GOETZ, M. P., BROECKX, G., EL BAIRI, K., HARBECK, N., CIMINO-MATHEWS, A., SOTIRIOU, C., ADAMS, S., LIU, S. W., LOIBL, S., CHEN, I. C., LAKHANI, S. R., JUCO, J. W., DENKERT, C., BLACKLEY, E. F., DEMARIA, S., LEON-FERRE, R., GLUZ, O., ZARDAVAS, D., EMANCIPATOR, K., ELY, S., LOI, S., SALGADO, R., SANDERS, M. & INTERNATIONAL IMMUNO-ONCOLOGY BIOMARKER WORKING, G. 2020. The path to a better biomarker: application of a risk management framework for the implementation of PD-L1 and TILs as immuno-oncology biomarkers into breast cancer clinical trials and daily practice. *J Pathol*.
- GUO, L., LI, W., ZHU, X., LING, Y., QIU, T., DONG, L., FANG, Y., YANG, H. & YING, J. 2016. PD-L1 expression and CD274 gene alteration in triple-negative breast cancer: implication for prognostic biomarker. *Springerplus*, 5, 805.
- HAANEN, J. B. & ROBERT, C. 2015. Immune Checkpoint Inhibitors. *Prog Tumor Res*, 42, 55-66.
- HANLEY, K. Z., BIRDSONG, G. G., COHEN, C. & SIDDIQUI, M. T. 2009. Immunohistochemical detection of estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 expression in breast carcinomas: comparison on cell block, needle-core, and tissue block preparations. *Cancer*, 117, 279-88.
- HEINZERLING, L., DE TONI, E. N., SCHEIT, G., HUNDORFEAN, G. & ZIMMER, L. 2019. Checkpoint Inhibitors. *Dtsch Arztebl Int*, 116, 119-126.
- HODI, F. S., O'DAY, S. J., MCDERMOTT, D. F., WEBER, R. W., SOSMAN, J. A., HAANEN, J. B., GONZALEZ, R., ROBERT, C., SCHADENDORF, D., HASSEL, J. C., AKERLEY, W., VAN DEN EERTWEGH, A. J., LUTZKY, J., LORIGAN, P., VAUBEL, J. M., LINETTE, G. P., HOGG, D., OTTENSMEIER, C. H., LEBBE, C., PESCHEL, C., QUIRT, I., CLARK, J. I., WOLCHOK, J. D., WEBER, J. S., TIAN, J., YELLIN, M. J., NICHOL, G. M., HOOS, A. & URBA, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363, 711-23.
- HOFLMAYER, D., WILLICH, C., HUBE-MAGG, C., SIMON, R., LANG, D., NEUBAUER, E., JACOBSEN, F., HINSCH, A., LUEBKE, A. M., TSOURLAKIS, M. C., HULAND, H., GRAEFEN, M., HAESE, A., HEINZER, H., MINNER, S., BUSCHECK, F., SAUTER, G., SCHLOMM, T., STEURER, S., CLAUDITZ, T. S., BURANDT, E., WILCZAK, W. & BERNREUTHER, C. 2019. SNW1 is a prognostic biomarker in prostate cancer. *Diagn Pathol*, 14, 33.
- HOU, Y., NITTA, H., WEI, L., BANKS, P. M., PARWANI, A. V. & LI, Z. 2018. Evaluation of Immune Reaction and PD-L1 Expression Using Multiplex Immunohistochemistry in HER2-Positive Breast Cancer: The Association With Response to Anti-HER2 Neoadjuvant Therapy. *Clin Breast Cancer*, 18, e237-e244.

- HUNG, A. L., MAXWELL, R., THEODROS, D., BELCAID, Z., MATHIOS, D., LUKSIK, A. S., KIM, E., WU, A., XIA, Y., GARZON-MUVDI, T., JACKSON, C., YE, X., TYLER, B., SELBY, M., KORMAN, A., BARNHART, B., PARK, S. M., YOUN, J. I., CHOWDHURY, T., PARK, C. K., BREM, H., PARDOLL, D. M. & LIM, M. 2018. TIGIT and PD-1 dual checkpoint blockade enhances antitumor immunity and survival in GBM. *Oncoimmunology*, 7, e1466769.
- JAWHAR, N. M. 2009. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med*, 29, 123-7.
- JONEJA, U., VRANIC, S., SWENSEN, J., FELDMAN, R., CHEN, W., KIMBROUGH, J., XIAO, N., REDDY, S., PALAZZO, J. & GATALICA, Z. 2017. Comprehensive profiling of metaplastic breast carcinomas reveals frequent overexpression of programmed death-ligand 1. *J Clin Pathol*, 70, 255-259.
- KARNIK, T., KIMLER, B. F., FAN, F. & TAWFIK, O. 2018. PD-L1 in breast cancer: comparative analysis of 3 different antibodies. *Hum Pathol*, 72, 28-34.
- KITANO, A., ONO, M., YOSHIDA, M., NOGUCHI, E., SHIMOMURA, A., SHIMOI, T., KODAIRA, M., YUNOKAWA, M., YONEMORI, K., SHIMIZU, C., KINOSHITA, T., FUJIWARA, Y., TSUDA, H. & TAMURA, K. 2017. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO Open*, 2, e000150.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIEMI, A., BARLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIEMI, O. P. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 844-7.
- KROHN, A., FREUDENTHALER, F., HARASIMOWICZ, S., KLUTH, M., FUCHS, S., BURKHARDT, L., STAHL, P., M, C. T., BAUER, M., TENNSTEDT, P., GRAEFEN, M., STEURER, S., SIRMA, H., SAUTER, G., SCHLOMM, T., SIMON, R. & MINNER, S. 2014. Heterogeneity and chronology of PTEN deletion and ERG fusion in prostate cancer. *Mod Pathol*, 27, 1612-20.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE. 2017. *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms* [Online]. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. Available: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Nierenzellkarzinom/LL_Nierenzell_Langversion_1.2.pdf [Accessed 03.03.2020 18:00 Uhr].
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE. 2018. *Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms* [Online]. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. Available: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Lungenkarzinom/LL_Lungenkarzinom_Langversion_1.0.pdf [Accessed 03.03.2020 18:00 Uhr].
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE. 2020. *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms* [Online]. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. Available: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.3/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.3.pdf [Accessed 03.03.2020 18:00 Uhr].
- LI, F., REN, Y. & WANG, Z. 2018. Programmed death 1 Ligand 1 expression in breast cancer and its association with patients' clinical parameters. *J Cancer Res Ther*, 14, 150-154.
- LI, Z., DONG, P., REN, M., SONG, Y., QIAN, X., YANG, Y., LI, S., ZHANG, X. & LIU, F. 2016. PD-L1 Expression Is Associated with Tumor FOXP3(+) Regulatory T-Cell Infiltration of Breast Cancer and Poor Prognosis of Patient. *J Cancer*, 7, 784-93.
- LYNCH, D. H. 2008. The promise of 4-1BB (CD137)-mediated immunomodulation and the immunotherapy of cancer. *Immunol Rev*, 222, 277-86.
- MILLS, A. M., DILL, E. A., MOSKALUK, C. A., DZIEGIELEWSKI, J., BULLOCK, T. N. & DILLON, P. M. 2017. The Relationship Between Mismatch Repair Deficiency and PD-L1 Expression in Breast Carcinoma. *Am J Surg Pathol*.

- MIRLACHER, M., KASPER, M., STORZ, M., KNECHT, Y., DURMULLER, U., SIMON, R., MIHATSCH, M. J. & SAUTER, G. 2004. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol*, 17, 1414-20.
- MITTENDORF, E. A., PHILIPS, A. V., MERIC-BERNSTAM, F., QIAO, N., WU, Y., HARRINGTON, S., SU, X., WANG, Y., GONZALEZ-ANGULO, A. M., AKCAKANAT, A., CHAWLA, A., CURRAN, M., HWU, P., SHARMA, P., LITTON, J. K., MOLLDREM, J. J. & ALATRASH, G. 2014. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*, 2, 361-70.
- MORI, H., KUBO, M., YAMAGUCHI, R., NISHIMURA, R., OSAKO, T., ARIMA, N., OKUMURA, Y., OKIDO, M., YAMADA, M., KAI, M., KISHIMOTO, J., ODA, Y. & NAKAMURA, M. 2017. The combination of PD-L1 expression and decreased tumor-infiltrating lymphocytes is associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 8, 15584-15592.
- MUENST, S., SCHAEPLI, A. R., GAO, F., DASTER, S., TRELLA, E., DROESER, R. A., MURARO, M. G., ZAJAC, P., ZANETTI, R., GILLANDERS, W. E., WEBER, W. P. & SOYSAL, S. D. 2014. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 146, 15-24.
- NANDA, R., CHOW, L. Q., DEES, E. C., BERGER, R., GUPTA, S., GEVA, R., PUSZTAI, L., PATHIRAJA, K., AKTAN, G., CHENG, J. D., KARANTZA, V. & BUISSERET, L. 2016. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol*, 34, 2460-7.
- OGIYA, R., NIIKURA, N., KUMAKI, N., BIANCHINI, G., KITANO, S., IWAMOTO, T., HAYASHI, N., YOKOYAMA, K., OSHITANAI, R., TERAOKA, M., MORIOKA, T., TSUDA, B., OKAMURA, T., SAITO, Y., SUZUKI, Y. & TOKUDA, Y. 2016. Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes between primary and metastatic tumors in breast cancer patients. *Cancer Sci*, 107, 1730-1735.
- OHUE, M., TOMITA, N., MONDEN, T., FUJITA, M., FUKUNAGA, M., TAKAMI, K., YANA, I., OHNISHI, T., ENOMOTO, T., INOUE, M. & ET AL. 1994. A frequent alteration of p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Res*, 54, 4798-804.
- PARK, I. H., KONG, S. Y., RO, J. Y., KWON, Y., KANG, J. H., MO, H. J., JUNG, S. Y., LEE, S., LEE, K. S., KANG, H. S., LEE, E., JOO, J. & RO, J. 2016. Prognostic Implications of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Association With Programmed Death Ligand 1 Expression in Early-Stage Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*, 16, 51-8.
- PARKES, E. E., WALKER, S. M., TAGGART, L. E., MCCABE, N., KNIGHT, L. A., WILKINSON, R., MCCLOSKEY, K. D., BUCKLEY, N. E., SAVAGE, K. I., SALTO-TELLEZ, M., MCQUAID, S., HARTE, M. T., MULLAN, P. B., HARKIN, D. P. & KENNEDY, R. D. 2017. Activation of STING-Dependent Innate Immune Signaling By S-Phase-Specific DNA Damage in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 109.
- PARRY, R. V., CHEMNITZ, J. M., FRAUWIRTH, K. A., LANFRANCO, A. R., BRAUNSTEIN, I., KOBAYASHI, S. V., LINSLEY, P. S., THOMPSON, C. B. & RILEY, J. L. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, 25, 9543-53.
- PETRELLI, F., VIALE, G., CABIDDU, M. & BARNI, S. 2015. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat*, 153, 477-91.
- QIN, T., ZENG, Y. D., QIN, G., XU, F., LU, J. B., FANG, W. F., XUE, C., ZHAN, J. H., ZHANG, X. K., ZHENG, Q. F., PENG, R. J., YUAN, Z. Y., ZHANG, L. & WANG, S. S. 2015. High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer. *Oncotarget*, 6, 33972-81.
- RECK, M., RODRÍGUEZ-ABREU, D., ROBINSON, A. G., HUI, R., CSÖSZI, T., FÜLÖP, A., GOTTFRIED, M., PELED, N., TAFRESHI, A., CUFFE, S., O'BRIEN, M., RAO, S., HOTTA, K., VANDORMAEL, K., RICCIO, A., YANG, J., PIETANZA, M. C. & BRAHMER, J. R. 2019. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. *J Clin Oncol*, 37, 537-546.

- SAUTER, G. 2010. Representativity of TMA studies. *Methods Mol Biol*, 664, 27-35.
- SCHALPER, K. A., VELCHETI, V., CARVAJAL, D., WIMBERLY, H., BROWN, J., PUSZTAI, L. & RIMM, D. L. 2014. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*, 20, 2773-82.
- SCHOLZEN, T. & GERDES, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182, 311-22.
- SIMEONE, E. & ASCIERTO, P. A. 2017. Anti-PD-1 and PD-L1 antibodies in metastatic melanoma. *Melanoma Manag*, 4, 175-178.
- SIMON, R. & SAUTER, G. 2002. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. *Exp Hematol*, 30, 1365-72.
- SIMON, R. & SAUTER, G. 2003. Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*, 5, 1-12.
- SPARANO, J. A., GRAY, R. J., MAKOWER, D. F., PRITCHARD, K. I., ALBAIN, K. S., HAYES, D. F., GEYER, C. E., JR., DEES, E. C., PEREZ, E. A., OLSON, J. A., JR., ZUJEWSKI, J., LIVELY, T., BADVE, S. S., SAPHNER, T. J., WAGNER, L. I., WHELAN, T. J., ELLIS, M. J., PAIK, S., WOOD, W. C., RAVDIN, P., KEANE, M. M., GOMEZ MORENO, H. L., REDDY, P. S., GOGGINS, T. F., MAYER, I. A., BRUFISKY, A. M., TOPPMEYER, D. L., KAKLAMANI, V. G., ATKINS, J. N., BERENBERG, J. L. & SLEDGE, G. W. 2015. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*, 373, 2005-14.
- STAHL, P., SEESCHAAF, C., LEBOK, P., KUTUP, A., BOCKHORN, M., IZBICKI, J. R., BOKEMEYER, C., SIMON, R., SAUTER, G. & MARX, A. H. 2015a. Heterogeneity of amplification of HER2, EGFR, CCND1 and MYC in gastric cancer. *BMC Gastroenterol*, 15, 7.
- STAHL, P. R., SCHNELLERT, J., KOOP, C., SIMON, R., MARX, A., IZBICKI, J. R., SAUTER, G. & QUAAS, A. 2015b. Determination of Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancers Using Heterogeneity Tissue Microarrays. *Pathol Oncol Res*, 21, 1183-9.
- STAUBER, M. & WEYERSTAHL, T. 2007. *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*, Stuttgart, Germany, Georg Thieme Verlag KG.
- SUN, W. Y., LEE, Y. K. & KOO, J. S. 2016. Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies. *J Transl Med*, 14, 173.
- TENNSTEDT, P., KOSTER, P., BRUCHMANN, A., MIRLACHER, M., HAESE, A., STEUBER, T., SAUTER, G., HULAND, H., GRAEFEN, M., SCHLOMM, T., MINNER, S. & SIMON, R. 2012. The impact of the number of cores on tissue microarray studies investigating prostate cancer biomarkers. *Int J Oncol*, 40, 261-8.
- THOMPSON, E., TAUBE, J. M., ELWOOD, H., SHARMA, R., MEEKER, A., WARZECHA, H. N., ARGANI, P., CIMINO-MATHEWS, A. & EMENS, L. A. 2016. The immune microenvironment of breast ductal carcinoma in situ. *Mod Pathol*, 29, 249-58.
- TORHORST, J., BUCHER, C., KONONEN, J., HAAS, P., ZUBER, M., KOCHLI, O. R., MROSS, F., DIETERICH, H., MOCH, H., MIHATSCH, M., KALLIONIEMI, O. P. & SAUTER, G. 2001. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, 159, 2249-56.
- TRAMM, T., KYNDI, M., SORENSEN, F. B., OVERGAARD, J. & ALSNER, J. 2018. Influence of intra-tumoral heterogeneity on the evaluation of BCL2, E-cadherin, EGFR, EMMPRIN, and Ki-67 expression in tissue microarrays from breast cancer. *Acta Oncol*, 57, 102-106.
- WANG, Z. Q., MILNE, K., DEROCHER, H., WEBB, J. R., NELSON, B. H. & WATSON, P. H. 2017. PD-L1 and intratumoral immune response in breast cancer. *Oncotarget*, 8, 51641-51651.
- WU, Y., CHEN, W., XU, Z. P. & GU, W. 2019. PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy-Blockade, Knockdown, or Inhibition. *Front Immunol*, 10, 2022.
- XIN, L., LIU, Y. H., MARTIN, T. A. & JIANG, W. G. 2017. The Era of Multigene Panels Comes? The Clinical Utility of Oncotype DX and MammaPrint. *World J Oncol*, 8, 34-40.

YI, M., JIAO, D., XU, H., LIU, Q., ZHAO, W., HAN, X. & WU, K. 2018. Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Mol Cancer*, 17, 129.

ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN. 2016. *Brustkrebs (Mammakarzinom)* [Online]. Robert-Koch-Institut,. Available: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html [Accessed 02.03.2020 18:00 Uhr].

11. Danksagungen

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Professor Dr. Guido Sauter, danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, die Dissertation in seinem hervorragenden Institut anzufertigen und mir mit seinem grenzenlosen Schatz an Erfahrung und fundiertem Fachwissen stets zur Seite gestanden hat.

Darüber hinaus danke ich meinen Betreuerinnen Christina Möller-Koop und Melanie Witt für ihre unermüdliche Unterstützung bei der Koordination des Projektes und ihren Beistand, fachlich als auch seelisch bei verschiedenen Hürden auf dem Weg zur Vollendung der Dissertation.

Mein Dank gilt außerdem all den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, die mir diese Arbeit möglich gemacht haben, besonders Privat Dozent Dr. Ronald Simon, Sarah Bonk, Dr. Kristina Jansen und Martina Mirlacher.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Mitdoktoranden danken, die mir im Büro und im Archiv stets erheiternde Stunden beschert haben. Besonders erwähnen möchte ich Neele Heckmann und Annika Jaretzke, die mich beim Schreiben der Doktorarbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

12. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

13. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: