

Aus der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. E.-F. Solomayer

**Immunhistochemische Bestimmung der PD-L1 Expression mit drei verschiedenen
Antikörper-Klonen und Bestimmung der SOX10 Expression am triple negativen
Mammakarzinom**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Margit Maria Guhl

geb. am: 01.02.1973 in Trier, Deutschland

Tag der Promotion:

20. Mai 2020

Dekan:

Prof. Dr. Michael D. Menger

Erstberichterstatter:

Herr Prof. Dr. Dr. Mohamed E. Hammadeh

Zweitberichterstatter:

Herr Prof. Dr. Rainer M. Bohle

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Zusammenfassung	9
1.1. Abstract	11
2. Einleitung	13
2.1. Das Mammakarzinom	13
2.2. Das triple negative Mammakarzinom	13
2.3. Therapieoptionen beim Mammakarzinom	14
2.4. Die Immunonkologie als neuer Therapieansatz beim Mammakarzinom	14
2.5. Die Immunabwehr	14
2.6. Der Krebs-Immunzell-Zyklus	15
2.7. Cancer Immunoediting	16
2.8. Biomarkerexpression zur Tumorcharakterisierung	18
2.9. Der PD-L1 Signalweg	19
2.10. Immuncheckpoint-Inhibitoren	20
2.11. SOX10-Protein	22
2.12. Fragestellungen der Arbeit	23
3. Material und Methodik	24
3.1. Patientinnen und Tumorgewebe	24
3.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung	26
3.3. Tissue Micro Array	27
3.3.1. Herstellung der TMA Blöcke	27
3.3.2. Verarbeitung der TMA Blöcke	30
3.4. Immunhistochemische Färbungen	30
3.4.1. Immunhistochemie	30
3.4.2. Positivkontrolle	31
3.4.3. Negativkontrolle	31
3.4.4. Immunhistochemische Färbung im Ventana BenchMark ULTRA	32

3.4.5. Färbeprotokolle	34
3.4.6. Verwendete Antikörper	38
3.4.7. Verwendete Detektionssysteme.....	39
3.4.8. Weitere Reagenzien	40
3.4.9. Aufbereitung der Schnitte zur mikroskopischen Auswertung	45
3.5. Auswertung, Validierung und Dokumentation der immunhistochemischen Färbungen.....	46
3.6. Statistische Auswertung der klinischen Daten	48
3.7. Reagenzien, Apparate, Hilfsmittel, Softwareprogramme und Service.....	49
4. Ergebnisse	52
4.1. Auswertung der Schnitte und Fotodokumentation	52
4.1.1. Positivkontrolle.....	52
4.1.2. Negativkontrolle	53
4.1.3. PD-L1 Färbungen der Tumorzellmembran mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3	54
4.1.4. PD-L1 Färbungen der Tumorzellmembran mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 28-8.....	56
4.1.5. PD-L1-Färbung der Immunzellen mit Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 .	58
4.1.6. SOX10 Färbung mit dem Antikörper Klon SP267	59
4.2. Klinische Daten der Patientinnen.....	61
4.3. Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	64
4.4. Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen im Bezug zu den vorhandenen klinischen Daten der Patientinnen	69
5. Diskussion.....	78
6. Literaturverzeichnis	88
7. Publikation.....	93
8. Danksagung	94
9. Anhang.....	95
10. Lebenslauf.....	118

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Krebs-Immunzell-Zyklus.....	15
Abbildung 2: Therapien, die den Krebs-Immunzell-Zyklus beeinflussen können.....	17
Abbildung 3: PD-L1 im Tumormikromilieu	19
Abbildung 4: Aktivierte T-Zelle.....	21
Abbildung 5: Der Färbeautomat Ventana BenchMark ULTRA.....	33
Abbildung 6: Positivkontrolle.....	52
Abbildung 7: Negativkontrolle	53
Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung mit Klon 22C3	54
Abbildung 9: Immunhistochemische PD-L1 Färbung mit Klon 28-8.....	56
Abbildung 10: Immunhistochemische PD-L1 Färbung mit Klon SP142	58
Abbildung 11: Immunhistochemische SOX10 Färbung mit Klon SP267.....	59
Abbildung 12: PD-L1 Färbung (TC) mit Klon 22C3 und Klon 28-8	64
Abbildung 13: PD-L1 Färbung (Cyt) mit Klon 22C3 und Klon 28-8.....	65
Abbildung 14: PD-L1 Färbung (TC) und (Cyt) mit Klon 22C3 bzw Klon 28-8	66
Abbildung 15: PD-L1 Färbung TC mit Klon 22C3, Klon 28-8 und IC mit Klon SP142....	67
Abbildung 16: PD-L1 Färbung IC mit Klon SP142 und Cyt mit Klon 22C3, Klon 28-8 ...	68
Abbildung 17: PD-L1 Expression (TC) mit Klon 22C3 bzw. Klon 28-8 und Ki67.....	71
Abbildung 18: PD-L1 Expression (IC) mit Klon SP142 und Ki67	73
Abbildung 19: SOX10 Expression und Ki67	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tissue Micro Array Probe 1.....	27
Tabelle 2: Tissue Micro Array-Probe 2	28
Tabelle 3: Tissue Micro Array Probe 3.....	29
Tabelle 4: verwendete Reagenzien	50
Tabelle 5: verwendete Geräte, optische Geräte, Hilfsmittel, Software, Services	51
Tabelle 6: Darstellung der klinischen Daten, Patienten- und Tumorcharakteristika..	63
Tabelle 7: Vergleich PD-L1 Expression TC und SOX10 Expression	76
Tabelle 8: Vergleich PD-L1 Expression IC und SOX10 Expression	77
Tabelle 9: TMA Block Probe 1, TC gefärbt mit Klon 22C3.....	95
Tabelle 10: TMA Block Probe 2, TC gefärbt mit Klon 22C3.....	95
Tabelle 11: TMA Block Probe 3, TC gefärbt mit Klon 22C3.....	96
Tabelle 12: TMA Block Probe 1, TC gefärbt mit Klon 28-8	96
Tabelle 13: TMA Block Probe 2, TC gefärbt mit Klon 28-8	97
Tabelle 14: TMA Block Probe 3, TC gefärbt mit Klon 28-8	97
Tabelle 15: TMA Block Probe 1, Cyt gefärbt mit Klon 22C3	98
Tabelle 16: TMA Block Probe 2, Cyt gefärbt mit Klon 22C3	98
Tabelle 17: TMA Block Probe 3, Cyt gefärbt mit Klon 22C3	99
Tabelle 18: TMA Block Probe 1, Cyt gefärbt mit Klon 22-8.....	99
Tabelle 19: TMA Block Probe 2, Cyt gefärbt mit Klon 28-8.....	100
Tabelle 20: TMA Block Probe 3, Cyt gefärbt mit Klon 28-8.....	100
Tabelle 21: TMA Block Probe 1, IC gefärbt mit Klon SP142.....	101
Tabelle 22: TMA Block Probe 2, IC gefärbt mit Klon SP142.....	101
Tabelle 23: TMA Block Probe 3, IC gefärbt mit Klon SP142.....	102
Tabelle 24: TMA Block Probe 1, SOX10 gefärbt mit Klon SP267.....	102
Tabelle 25: TMA Block Probe 2, SOX10 gefärbt mit Klon SP267.....	103
Tabelle 26: TMA Block Probe 3, SOX10 gefärbt mit Klon SP267.....	103
Tabelle 27: Korrelation PD-L1 Expression TC und Überleben.....	104
Tabelle 28: Korrelation PD-L1 Expression TC und spätere Metastasierung.....	104
Tabelle 29: Korrelation PD-L1 Expression TC und Rezidivierung	105
Tabelle 30: Korrelation PD-L1 Expression TC und Tumorstatus	105

Tabelle 31: Korrelation PD-L1 Expression TC und Nodalstatus	106
Tabelle 32: Korrelation PD-L1 Expression TC und Grading	106
Tabelle 33: Korrelation PD-L1 Expression TC und Her2(neu) Score 0,1,2.....	107
Tabelle 34: Korrelation PD-L1 Expression IC und Überleben	107
Tabelle 35: Korrelation PD-L1 Expression IC und spätere Metastasierung	108
Tabelle 36: Korrelation PD-L1 Expression IC und Rezidivierung	108
Tabelle 37: Korrelation PD-L1 Expression IC und Tumorstatus	109
Tabelle 38: Korrelation PD-L1 Expression IC und Nodalstatus	109
Tabelle 39: Korrelation PD-L1 Expression IC und Grading.....	110
Tabelle 40: Korrelation PD-L1 Expression IC und Her2(neu) Score 0,1,2.....	110
Tabelle 41: Korrelation SOX10 Expression und Überleben	111
Tabelle 42: Korrelation SOX10 Expression und spätere Metastasierung... ..	112
Tabelle 43: Korrelation SOX10 Expression und Rezidivierung	113
Tabelle 44: Korrelation SOX10 Expression und Tumorstatus.....	114
Tabelle 45: Korrelation SOX10 Expression und Nodalstatus.....	115
Tabelle 46: Korrelation SOX10 Expression und Grading.....	116
Tabelle 47: Korrelation SOX10 Expression und Her2(neu) Score 0,1,2	117

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
≤	kleiner oder gleich
≥	größer oder gleich
<	kleiner als
>	größer als
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALK	anaplastische Lymphomkinase
APC	antigenpräsentierende Zellen
BRAF	B-Raf-Proto-Onkogen
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARs	chimäre Antigen-Rezeptoren
CC	cell conditioning
CTLs	cytotoxische T-Zelle
CTLA-4	cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen
Cyt	cytoplasmatische Färbung
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Substratlösung
DC	dendritische Zellen
DFS	disease free survival (progressionsfreies Überleben)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ER	Östrogen-Rezeptor
et.al.	Lateinisch: „et alia“, meint: und andere

FDA	amerikanische Food and Drug Administration
G1,G2,G3	Grading 1,2,3
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HER2(neu)	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
IC	Immunzellfärbung
ICI	Immuncheckpoint- Inhibitor
IHC	Immunhistochemie
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
l	Liter
LCS	Liquid Coverslip
M	Molarität (Mol pro Liter)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mod.	modifiziert
mUC	metastasiertes Urothelkarzinom
n	Anzahl (number)
N	Nodalstatus
NK	natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
NSCLC	nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
OP	Operation
OS	Überleben (overall survival)
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PFS	progressionsfreies Überleben (progression free survival)

PD-1	programmed cell death receptor 1
PD-L1	programmed cell death receptor 1 ligand 1
PD-L2	programmed cell death receptor 1 ligand 2
pH	potential hydrogenii
PR	Progesteron-Rezeptor
QUIP	Qualitätssicherungsinitiative Pathologie GmbH
R	Rezidiv
SAP	Systeme, Anwendungen, Produkte
SABCS	San Antonio Breast Cancer Symposium
SOX10	SRY-related HMG-box-Protein
T	Tumorstadium
TC	Tumorzellmembranfärbung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TILs	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TMA	tissue microarray
TNBC	triple negatives Mammakarzinom
TPS	Score: PD-L1 positive Tumorzellen/PD-L1 positive + PD-L1 negative Tumorzellen
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
vs.	versus
zB.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Neue Ansätze mit Checkpoint-Inhibitoren, die gegen Protein Death-Ligand1/Protein Death1 (PD-L1/PD-1) gerichtet sind, zeigen u.a. beim triple negativen Mammakarzinom (TNBC) eine Verbesserung der Therapie. PD-L1 ist in der Zwischenzeit ein etablierter prädiktiver Biomarker bei vielen Tumorentitäten geworden. Zur immunhistochemischen Diagnostik von PD-L1 gibt es eine Vielzahl von Antikörpern und Kits. Ziel dieser Arbeit war es, die PD-L1 Expression am TNBC mit verschiedenen Antikörper-Klonen zu bestimmen, diese Ergebnisse im Hinblick auf die Färbung von Tumorzellmembran, Färbung der Immunzellen und der cytoplasmatischen Färbung zu vergleichen, um herauszufinden, ob die verschiedenen Klone bzw. Methoden ausgetauscht werden können. Zudem sollte überprüft werden, ob eine PD-L1 bzw. SOX10 Expression mit den vorhandenen klinischen Parametern korrelieren.

60 Patientinnen mit TNBC wurden mittels Immunhistochemie auf die Expression von PD-L1 und SOX10 untersucht. Als Detektions-Kit wurde bei den beiden Antikörpern Anti-Human PD-L1 Klon 22C3 von Dako und Klon 28-8 von abcam, sowie bei dem SOX10 Antikörper Klon SP267 von Cell Marque das ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit verwendet. Bei dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 wurde als Detection Kit OptiView DAB IHC verwendet. Von jeder Patientin wurden 3 Stenzen des Tumorgewebes in Tissue-Microarrays eingebracht. Die Schnitte wurden verblindet von zwei unabhängigen Befundern ausgewertet. Für die Auswertung wurden folgende Cut-Offs verwendet: Expression von PD-L1 an der Tumorzellmembran $<1\%$ (negativ), ≥ 1 bis $<50\%$ (positiv) und $\geq 50\%$ (stark positiv). Bei der Auswertung von SP142 wurde die Färbung der Immunzellen ausgewertet. Hier wurde als Score der prozentuale Flächenanteil der PD-L1 positiven Immunzellen zu den vorhandenen Tumorzellen verwendet. Patientinnen mit einer PD-L1 Expression von ≥ 1 galten als PD-L1 positiv. Bei der immunhistochemischen Färbung von SOX10 wurde die nukleäre Färbung mit folgendem Score ausgewertet: <1 negativ, ≥ 1 bis 50, >50 bis >100 und 100. Der Zusammenhang zwischen PD-L1 Expression (TC und IC) und der SOX10 Expression wurden mit den klinischen Parametern der Patientinnen ab Zeitpunkt der Diagnose bis zum Ende der Datenerhebung (Januar 2018) ausgewertet.

Insgesamt konnten 59 Patientinnen von 60 ausgewertet werden. In der immunhistochemischen Färbung führten die beiden verwendeten Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 und Klon 28-8 in Bezug auf die membranöse Färbung und in Bezug auf die cytoplasmatische Färbung zum gleichen Ergebnis. 12 (20,3%) zeigten mit Klon 22C3 und Klon 28-8 eine positive Membranfärbung mit PD-L1 (Score 1-50%). Bei 1 Patientin (1,7%) konnte eine hohe PD-L1 Expression (Score <math><50-100</math>) nachgewiesen werden. Die cytoplasmatische Färbung bei der Färbung mit Klon 22C3 und Klon 28-8 war bei 24 Patientinnen (40,7%) positiv, das sind signifikant mehr Patientinnen als bei der Tumorzellmembranfärbung. Bei der Immunzellfärbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 wurden ebenfalls 24 Patientinnen (40,7%) PD-L1 positiv diagnostiziert (Score ≥ 1). Es waren dieselben Patientinnen die auch eine cytoplasmatische Färbung bei der Färbung der Tumorzellmembran mit Klon 22C3 und Klon 28-8 zeigten. Ein niedriger Ki67 Wert unter 30 zeigte einen signifikanten Unterschied zu hohem Ki67 Wert bei der PD-L1 Expression der Tumorzellmembran (Färbung mit Klon 22C3 und Klon 28-8). Bei der PD-L1 Expression der Immunzellfärbung mit Klon SP142 konnte man erkennen, dass die PD-L1 negativen Patientinnen (59,3%) tendenziell einen niedrigeren Ki67 Wert hatten als die PD-L1 positiven Patientinnen (40,7%). Die weiteren klinischen Parameter zeigten keine signifikanten Zusammenhänge zu der PD-L1 Expression (TC und IC) und SOX10 Expression.

Die bisher zur immunhistochemischen PD-L1 Bestimmung verwendeten Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 und Klon 28-8 führten in dieser Arbeit zum gleichen Ergebnis, so dass beide Antikörper für die immunhistochemische Bestimmung von PD-L1 beim triple negativen Mammakarzinom gleichwertig eingesetzt werden können. Der Klon SP142 kann nicht durch Klon 22C3 und Klon 28-8 ausgetauscht werden, da in dieser Arbeit signifikant mehr PD-L1 positive Patientinnen mit Klon SP142 diagnostiziert wurden. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die zusätzliche Auswertung der cytoplasmatischen Färbung mit Klon 22C3 und Klon 28-8 gleichwertig mit der Immunzellfärbung, gefärbt mit Klon SP142 ist. Daher könnte künftig die cytoplasmatische Färbung mit den beiden Klonen 22C3 und 28-8 an Bedeutung gewinnen. An dem untersuchten Patientinnen Kollektiv konnten wir bis auf Ki67 keinen Zusammenhang zwischen PD-L1, SOX10 und den vorhandenen klinischen Parametern nachweisen.

1.1. Abstract

New approaches with checkpoint inhibitors directed against Protein Death-Ligand1/Protein Death1 (PD-L1/PD-1) show an improvement of therapy in triple negative breast cancer (TNBC). PD-L1 has become an established predictive biomarker in many tumor entities. For the immunohistochemical diagnosis of PD-L1 there are numerous antibodies and kits available. The aim of this work was to determine the expression of PD-L1 at TNBC with different antibody clones, to compare these results with regard to the staining of tumor cell membranes, staining of immune cells and cytoplasmic staining in order to find out whether the different clones or methods can be exchanged. It should also be checked whether PD-L1 or SOX10 expression correlates with the existing clinical parameters.

60 patients with TNBC were examined for the expression of PD-L1 and SOX10 by immunohistochemistry. The detection kit used was the ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit for the two antibodies Anti-Human PD-L1 clone 22C3 from Dako and clone 28-8 from abcam and the SOX10 antibody clone SP267 from Cell Marque. The Anti-PD-L1 antibody clone SP142 was detected with OptiView DAB IHC. From each patient, 3 punches of tumor tissue were inserted into tissue microarrays. The sections were evaluated blinded by two independent observer. The following cut-offs were used for the evaluation: Expression of PD-L1 at the tumor cell membrane <1% (negative), >1 to <50% (positive) and >50% (strongly positive). In the evaluation of SP142 the staining of the immune cells was evaluated. The score was the percentage of PD-L1 positive immune cells to the tumor cells that were present. Patients with a PD-L1 expression of >1 were considered PD-L1 positive. For the immunohistochemical staining of SOX10, the nuclear staining was evaluated with the following score: <1 negative, >1 to 50, >50 to >100 and 100. The relationship between PD-L1 expression (TC and IC) and SOX10 expression was evaluated with the clinical parameters of the patients from the time of diagnosis until the end of data collection (January 2018).

A total of 59 patients out of 60 were evaluated. In immunohistochemical staining, the two anti-PD-L1 antibodies used, clone 22C3 and clone 28-8, gave to the same result with respect to membrane staining and cytoplasmic staining. 12 of 59 patients (20,3%) with

clone 22C3 and clone 28-8 showed a positive membrane staining with PD-L1 (score 1-50%). In 1 patient (1,7%) a high PD-L1 expression (score <50-100) was detected. The cytoplasmic staining with clone 22C3 and clone 28-8 was positive in 24 patients (40,7%), significantly more patients than with tumor cell membrane staining. In the immune cell staining with the anti-PD-L1 antibody clone SP142 also 24 patients (40,7%) PD-L1 were positively diagnosed (score >1). They were the same patients who also showed cytoplasmic staining of the tumor cell membrane with clone 22C3 and clone 28-8. A low Ki67 value below 30 showed a significant difference to high Ki67 value in PD-L1 expression of tumor cell membrane staining with clone 22C3 and clone 28-8. PD-L1 expression of immune cell staining with clone SP142 showed that PD-L1 negative patients (59,3%) tended to have a lower Ki67 value than PD-L1 positive patients (40,7%). The other clinical parameters showed no significant correlation to PD-L1 expression (TC and IC) and SOX10 expression.

The anti-PD-L1 antibodies clone 22C3 and clone 28-8 used so far for the immunohistochemical PD-L1 determination lead to the same result in this study, so that both antibodies could be used equivalently for the immunohistochemical PD-L1 determination in triple negative breast cancer. Clone SP142 cannot be replaced by clone 22C3 and clone 28-8 because significantly more PD-L1 positive patients have been diagnosed with clone SP142. For the first time it could be shown in this study that the additional evaluation of the cytoplasmic staining with clone 22C3 and clone 28-8 is equivalent to the immune cell staining with clone SP142. Therefore, the cytoplasmic staining with the two clones 22C3 and 28-8 could gain importance in the future. With the exception of Ki67, we were unable to demonstrate any correlation between PD-L1, SOX10 and other clinical parameters in the investigated patient group.

2. Einleitung

2.1. Das Mammakarzinom

Weltweit stellt die Erkrankung Brustkrebs die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen dar. Jede 8. bis 10. Frau erkrankt in Deutschland im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom [1]. In den letzten Jahren gab es weltweit gute Fortschritte in der Therapie des frühen Mammakarzinoms. Dennoch erleben immer noch 20-30% der Patientinnen eine Fernmetastasierung [2]. Der molekulare Subtyp des Primärtumors und das primäre Tumorstadium sind entscheidend für das Metastasierungsmuster und das Risiko ein Rezidiv zu erleiden [3]. Das Mammakarzinom wird in verschiedene Subtypen unterteilt. Luminal A Tumore sind Hormonrezeptor positiv und HER2(neu) negativ. Sie haben einen niedrigen Ki67 Wert. Luminal B Tumore unterscheiden sich von den luminal A Tumoren nur durch einen hohen Ki67 Wert. Zudem gibt es die HER2(neu) positiven Tumore und die basal-like oder triple negativen Tumore der Brust. Das mediane Gesamtüberleben kann in Abhängigkeit vom molekularen Subtyp betrachtet werden. Dabei zeigen metastasierte Brustkrebs-Patientinnen mit einem Luminal ATumor das längste Gesamtüberleben (median 45,3 Monate), gefolgt von Patientinnen mit einem Luminal BTumor (median 29,7 Monate), einem HER2(neu) überexprimierenden Tumor (median 43,5 Monate) und zuletzt von Patientinnen mit einem triple negativen Mammakarzinom (median 10,2 Monate) [4].

2.2. Das triple negative Mammakarzinom

Das triple negative Mammakarzinom (TNBC) ist ein molekularer Subtyp der 15-20% aller Mammakarzinome ausmacht [5, 6]. Bei diesem Subtyp fehlt die Expression des Östrogen-Rezeptors (ER), des Progesteron-Rezeptors (PR) und des HER2(neu) Rezeptors. Im Vergleich zu den anderen Subtypen des Mammakarzinoms zeigt das TNBC eine hohe Mutationsrate und ein aggressives biologisches Verhalten. Es ist von einer ungünstigen Prognose gekennzeichnet [6, 7]. *Metzger-Filho* beschreibt in seiner Arbeit zudem eine Heterogenität des TNBC [6]. Mittels Genexpressionsanalysen konnte eine molekulare Subtypisierung des heterogenen TNBC beschrieben werden [8-11].

2.3. Therapieoptionen beim Mammakarzinom

In den letzten 20 Jahren hat es viele Fortschritte in der Therapie des Mammakarzinoms gegeben. Durch die Chemotherapie, die Hormontherapie und die HER2(neu) zielgerichteten Therapien konnte das Überleben der Mammakarzinom Patientinnen entscheidend verbessert werden. Unabhängig vom molekularen Subtyp wird das mediane Überleben nach einer Metastasierung jedoch weiterhin mit 24 Monaten angegeben [12, 13]. Primär besteht das Ziel der Behandlung aus einer Lebensverlängerung, bei gleichzeitiger Erhaltung der Lebensqualität [14] [15].

2.4. Die Immunonkologie als neuer Therapieansatz beim Mammakarzinom

Die Immunonkologie befasst sich mit der Frage, wie das Immunsystem der Patientinnen für den Kampf gegen Krebs genutzt werden kann. Sie stellt einen neuen Therapieansatz dar, bei welchem das Immunsystem das Ziel der Therapie ist. Eine Immuntherapie stimuliert das Immunsystem der Patientin, um die Antitumorantwort zu verstärken [16]. Es kommen Substanzen zum Einsatz, die einzelne Komponenten des Immunsystems, die sogenannten Immun-Checkpoints, modulieren. Diese Substanzen nennt man Immun-Checkpoint-Inhibitoren. Sie schränken normalerweise die Aktivierung des Immunsystems ein [16, 17]. Durch aktuelle Erkenntnisse bezüglich der komplexen Rolle des Immunsystems in der Behandlung maligner Erkrankungen, und durch die Anwendung neuer wissenschaftlicher Entwicklungen, wächst das Wissen im Bereich der Immunonkologie stetig [16].

2.5. Die Immunabwehr

Bei der Immunabwehr lassen sich zwei Komponenten unterscheiden: die angeborene und die adaptive Immunantwort. Beide können das Krebswachstum stimulieren oder hemmen [18].

Die angeborene Immunantwort beinhaltet keine spezifische Erkennung von Antigenen. Sie gilt als erste Verteidigungslinie gegen Krebs und umfasst Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK) und dendritische Zellen (DC), wobei die dendritische Zellen auch an der adaptiven Immunantwort beteiligt sind [18].

Die adaptive Immunantwort richtet sich bei einer Krebserkrankung spezifisch gegen bestimmte Tumor-assoziierte Antigene [18]. Zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) gehören auch die dendritischen Zellen (DC). Sie präsentieren Antigene, bewirken eine Kostimulation und aktivieren so die T-Zellen [19]. T-Zellen und B-Zellen sind die zentralen Komponenten der Immunantwort [18].

2.6. Der Krebs-Immunzell-Zyklus

Die Erkennung, der Angriff und die Zerstörung von Krebszellen durch das Immunsystem ist ein mehrstufiger Prozess.

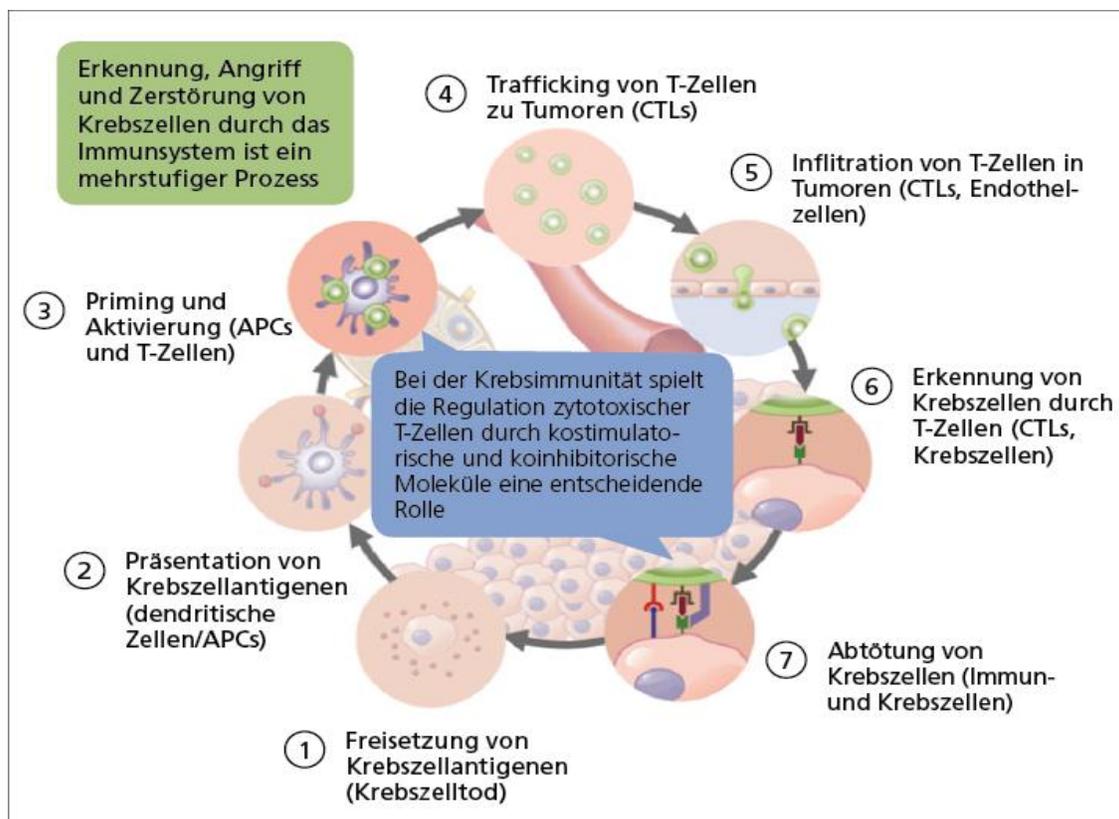


Abbildung 1: Der Krebs-Immunzell-Zyklus, mod. nach Chen [20]

Theoretisch kann der Tumor vom Immunsystem bekämpft und eliminiert werden (Abb. 1). Die Tumorzellen setzen spezielle Eiweißstoffe, sogenannte Tumor-Antigene frei. Zellen des Immunsystems (Antigen-präsentierende Zellen, Dendritische Zellen) greifen diese Tumor-Antigene auf und transportieren sie zu den T-Zellen in den Lymphknoten.

Erkennen die T-Zellen die Tumor-Antigene als fremd, beginnt das Immunsystem den Tumor zu bekämpfen. Die T-Zellen migrieren hämatogen zum Tumor, sie invadieren diesen, identifizieren die Tumorzellen anhand der Antigene und lösen dann über Phagozytose und Induktion der Tumorzell-Apoptose die Zerstörung der Tumorzellen im Tumormikromilieu aus. Dadurch werden neue Tumor-Antigene freigesetzt und der Kreislauf beginnt von vorne [20].

Bei der Krebsimmunität spielt die Regulation zytotoxischer T-Zellen durch Co-stimulatorische und Co-inhibitorische Moleküle eine große Rolle. Tumore können der Immunkontrolle und der Tumorzerstörung entgehen, wenn in einem oder mehreren Schritten des Krebs-Immunzellzyklus Störungen auftreten, wodurch die essentielle T-Zell Aktivität blockiert wird. Die Immuncheckpoint-Inhibitoren sind eine Möglichkeit für diesen Mechanismus der als „tumor-immune-escape“ bezeichnet wird [20].

2.7. Cancer Immunoediting

Der Vorgang mit dem das Immunsystem in das Tumorwachstum eingreift, bezeichnet man als Immunoediting [21]. Dieser Vorgang ist ein fortlaufender Prozess, bei dem das Immunsystem sowohl den Körper vor der Entwicklung von Tumorzellen schützt, als auch die Ausbildung veränderter Tumorzellen fördert [21, 22]. Es wurden drei Phasen des Immunoeditings identifiziert, die simultan oder konsekutiv voneinander ablaufen können.

1. Eliminierungsphase

Hier werden Tumorzellen durch die angeborene und die adaptive Immunantwort erkannt und eliminiert. Diese Phase bezeichnet man als „Immunüberwachung“ [21].

2. Gleichgewichtsphase

In manchen Fällen können Varianten von Tumorzellen den Eliminierungsprozess überleben und in die Gleichgewichtsphase eintreten. Dies kann geschehen, wenn sich der Tumor in einem funktionellen Ruhestadium befindet [21, 22]. Diese Varianten können unter Umständen neue Mutationen entwickeln. Diese Mutationen erlauben den Tumorzellen, mit Hilfe verschiedener Mechanismen der Immunantwort zu entkommen,

wenngleich das Immunsystem in dieser Phase an der Eindämmung der Tumorzellen arbeitet [21, 22].

3. Escape-Phase

Diese Phase bezeichnet man auch Tumorevasion. Es kommt zur Tumorevasion, wenn die Tumorzellen so mutiert sind, dass sie sich der Immunantwort entziehen können. Der Tumor wächst dann ungehindert weiter und wird klinisch erkennbar [21]. Beispiele der Tumorevasion sind z. B. der Verlust der Antigen-Expression.

Mache Tumorzellen, wie auch das triple negative Mammakarzinom, können die Präsentation tumorspezifischer Antigene reduzieren, indem sie die Moleküle des Haupthisokompatibilitätskomplexes (MHC) herunterregulieren oder vollständig eliminieren [19, 23]. Andere Tumore können ihre Antigene durch Mutation verlieren, so dass der Tumor nicht mehr vom Immunsystem erkannt wird [23].

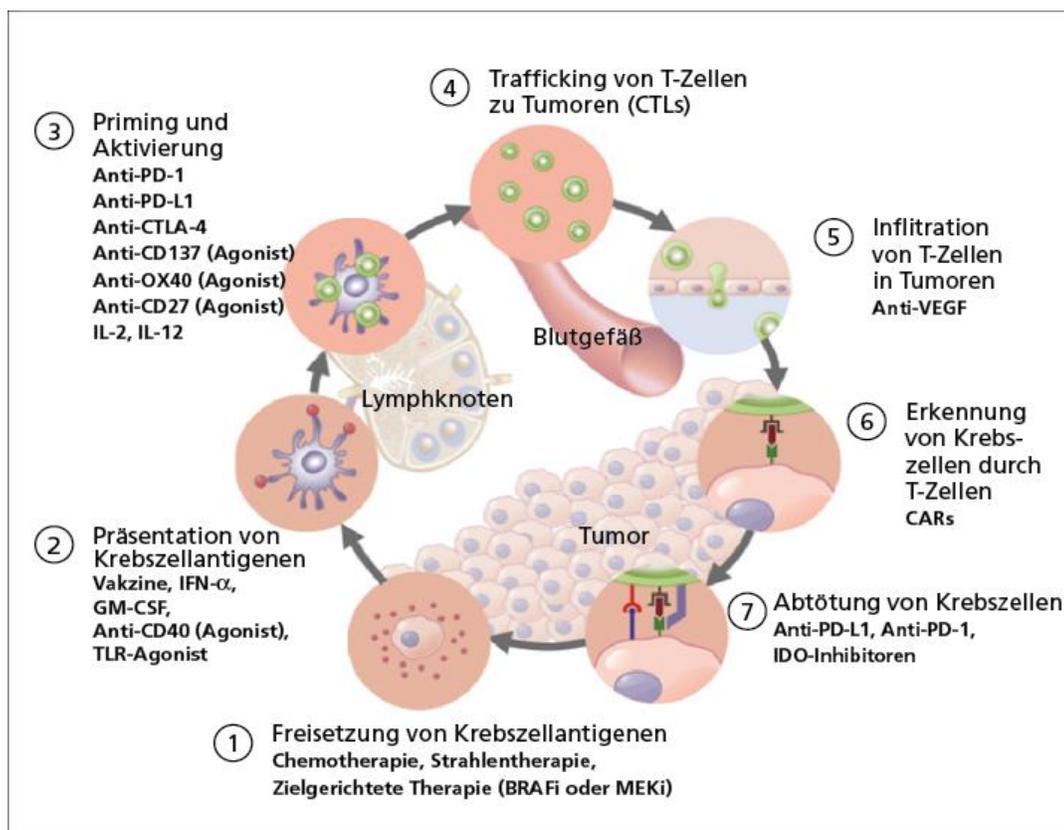


Abbildung 2: Therapien, die den Krebs-Immunzell-Zyklus beeinflussen können, mod. nach Chen [20]

Ein weiteres Beispiel ist die Freisetzung immunsuppressiver Zytokine und Rekrutierung immunsuppressiver Zellen (Tumore können regulatorische T-Zellen rekrutieren und dazu bringen, dass sie den Tumor gegen Angriffe des Immunsystems schützen). Diese regulatorischen T-Zellen unterdrücken viele Funktionen der Immunantwort. Sie können eine antitumorale Immunantwort verhindern, indem sie die Aktivität von T-Zellen hemmen [19, 21, 24]. Ein anderes Beispiel der Tumorevasion ist die Manipulation von Immun-Checkpoints. Die Tumore können die Immunantwort unterdrücken, indem sie bestimmte Immun-Checkpoints dysregulieren. Die T-Zell-Aktivität kann während der Immunantwort in verschiedenen Phasen über Immun-Checkpoints wie z.B. PD-1 und andere reguliert werden (Abb. 2). Die Intensität und die Qualität der T-Zell-Antwort wird von diesen Immun-Checkpoints reguliert [17, 25, 26].

2.8. Biomarkerexpression zur Tumorcharakterisierung

Die Evaluierung der Biomarkerexpression kann zur klinischen Entscheidungsfindung beitragen [27], denn Biomarker können zu einem besseren Verständnis der bei einem Patienten vorliegenden Tumorart helfen [28]. Übliche Tumormarker deuten auf die Expression eines Gens bzw. auf das Vorliegen einer Mutation hin [29]. Angesichts der steigenden Anzahl von Biomarkern ist es mittlerweile erforderlich, Protokolle zu etablieren, die den Einsatz dieser Biomarker im klinischen Alltag ermöglichen [27]. Die verwendeten Tests für den Nachweis von Biomarkern sind unterschiedlich und komplex. Es gibt bereits eine Reihe von etablierten onkologischen Biomarkern, die von prognostischem Wert sind. Sie liefern Hinweise auf den zu erwartenden Krankheitsverlauf bei einem Patienten [30]. Andere Biomarker bezeichnet man als prädiktiv [31]. Prädiktive Biomarker dienen zur Identifikation von Patientengruppen, die mit der größten Wahrscheinlichkeit von einer bestimmten Behandlung profitieren können [30]. In der klinischen Praxis können Biomarker unter anderem über das Proteinexpressionsniveau nachgewiesen werden [27]. Zu den „neu“ entdeckten Biomarkern gehört der in dieser Arbeit untersuchte Biomarker PD-L1, der auf eine Tumor-induzierte Immunsuppression hindeuten kann [31]. Der Transkriptionsfaktor SOX10, der in dieser Arbeit untersucht wurde, könnte zukünftig auch ein interessanter Biomarker beim triple negativen Mammakarzinom werden [32].

2.9. Der PD-L1 Signalweg

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, bedienen sich Tumorzellen vielfältiger Strategien um sich dem Immunsystem zu entziehen (Tumorevasion). Dies können sie erreichen indem sie z.B. den PD-1 oder PD-L1 Signalweg zweckentfremden. Unter physiologischen Bedingungen dient dieser Signalweg dazu, die Homöostase aufrechtzuerhalten, um z.B. Autoimmunreaktionen zu verhindern. Die Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen und die Expression von PD-L1 auf den tumorinfiltrierenden Immunzellen schafft eine immunsuppressive Mikroumgebung. Dieses Prinzip nutzen die Tumore um die Immunantwort lahmzulegen [20, 33, 34]. Der inhibitorische Rezeptor Programmed cell Death Protein 1 (PD-1) ist auf den T-Lymphozyten lokalisiert. Er dient hauptsächlich der Regulation der T-Zell-Aktivität in der Effektorphase der Immunantwort. Die Inaktivierung der T-Zelle erfolgt nach Bindung an seinen Liganden PD-L1 auf der Tumorzelle oder der Immunzelle. Dadurch kann die T-Zelle ihre zytotoxische Wirkung nicht mehr entfalten (Abb. 3).

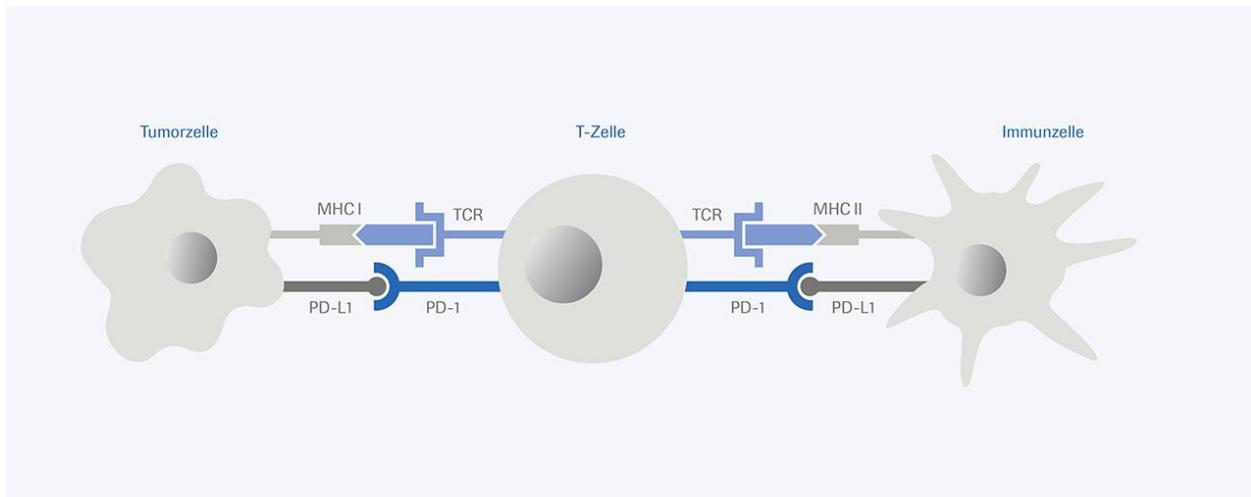


Abbildung 3: PD-L1 im Tumormikromilieu

PD-L1 auf Tumorzellen bindet PD-1 auf aktivierten T-Zellen, die den Tumor erreichen. Damit wird ein inhibitorisches Signal an die T-Zellen vermittelt, welches sie daran hindert, die Tumorzellen zu zerstören. PD-L1 auf Immunzellen bindet ebenfalls an PD-1 auf T-Zellen. So werden T-Zellaktivierung und Zytokinproduktion gehemmt und die Immunantwort herunterreguliert [35]

PD-L1 wird von Tumorzellen und von Immunzellen exprimiert (Abb. 3). In normalen Gewebsverbänden wird PD-L1 besonders stark in den Tonsillen oder im Plazentagewebe exprimiert. Man vermutet, dass die physiologische Funktion der Aktivierung von PD-1 darin besteht, die T-Zell-Aktivität im peripheren Gewebe herunter zu regulieren, um zu verhindern, dass im Zuge der Immunantwort Kollateralschäden am Gewebe entstehen [25, 26, 34].

Indem die Tumorzellen die Immun-Checkpoints manipulieren (wie z.B. den PD-1/PD-L1 Signalweg) können sie sich so der Immunantwort des Körpers entziehen [17, 25]. Die Tumorzellen können den PD-1 Immunregulationsweg nutzen, um sich der Immunüberwachung zu entziehen [25, 34]. Über den PD-1 Immunregulationsweg können sie durch die Expression der PD1 Liganden (PD-L1 und PD-L2) die Immunantwort blockieren [17, 31, 36]. Die Inaktivierung der T-Zelle erfolgt über die Bindung von PD-L1 bzw. PD-L2 an den PD-1 Rezeptor der T-Zelle [17].

2.10. Immuncheckpoint-Inhibitoren

Eine Expression von PD-L1 auf der Tumoroberfläche, kann die einwandernden zytotoxischen T-Zellen inaktivieren. Die Zerstörung des Tumors wird dadurch verhindert. Indem der von den Tumorzellen exprimierte Ligand PD-L1 an den PD-1 Rezeptor im Tumormikromilieu bindet, kann die T-Zellaktivität herunterreguliert werden. Der PD-L1 Rezeptor wird von Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten und von tumorinfiltrierenden Immunzellen exprimiert, und kann auf eine tumorinduzierte Suppression der Immunantwort hindeuten [31]. Die Immuncheckpoint-Inhibitoren greifen entweder durch die Blockierung von PD-1 an der T-Zelle oder durch Blockierung von PD-L1 an der Tumorzelle an. Auf diese Weise kann die Inaktivierung der zytotoxischen T-Zellen verhindert werden (Abb. 4).

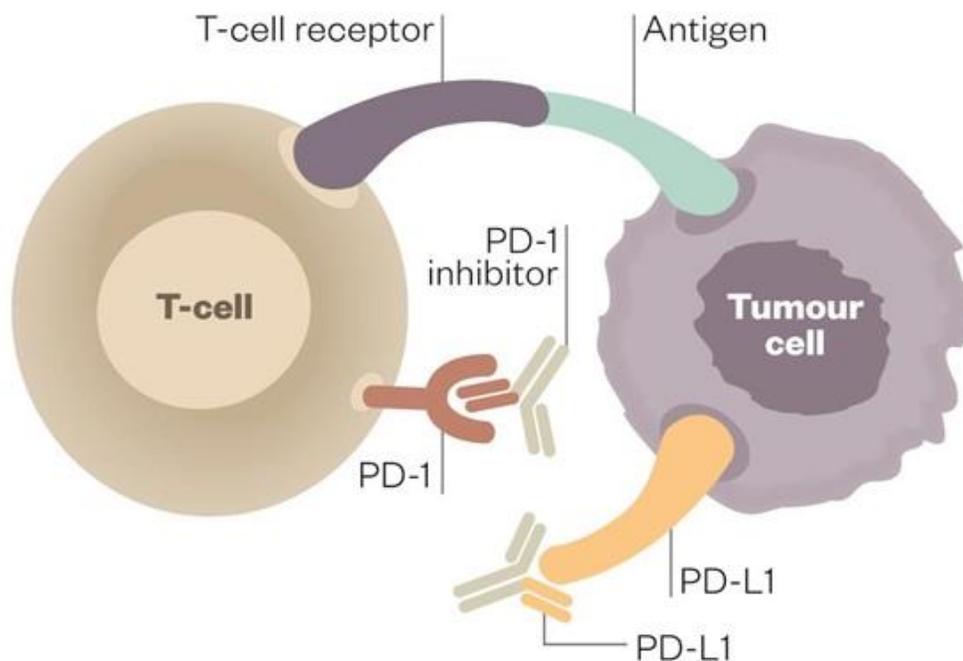


Abbildung 4: Aktivierte T-Zelle

Inhibitoren des PD-1- und des PD-L1-Rezeptors können verhindern, dass die Tumorzelle an PD-1 bindet, wodurch die T-Zelle aktiv bleiben und einen Angriff koordinieren kann [37]

Zulassungsstudien wurden für unterschiedliche Substanzen zuerst beim malignen Melanom durchgeführt, gefolgt beim fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom [38]. In der Zwischenzeit wurden die PD-1 Antagonisten Nivolumab und Pembrolizumab bei verschiedenen Tumoren zugelassen. Der PD-L1 Antagonist Atezolizumab wurde zur Therapie des vorbehandelten fortgeschrittenen nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) [39] sowie für die Therapie des lokal-fortgeschrittenen oder metastasierten Urothelkarzinoms (mUC) [40] zugelassen. In den vereinigten Staaten von Amerika hat die Food and Drug Administration (FDA) die Zulassung von Atezolizumab mit proteingebundenem Paclitaxel im März 2019 beim triple negativen Mammakarzinom erteilt, bei Patientinnen die PD-L1 $\geq 1\%$ exprimieren. Die PD-L1-Expression wurde in der Zulassungsstudie Impassion 130 mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 bestimmt [41]. Durch die Hemmung von PD-L1 ermöglicht Atezolizumab die Aktivierung der T-Zellen und stellt so deren Fähigkeit zur Erkennung

und Bekämpfung von Tumorzellen wieder her. Auf diese Weise wird das Immunsystem reaktiviert [42]. Atezolizumab hemmt die Interaktion von PD-L1 mit den Rezeptoren PD-1 und B7.1 und bewirkt somit eine doppelte Blockade der über PD-L1 vermittelten Signalwege [34].

Es ist positiv zu bewerten, wenn Immunzellen in den Tumor eindringen, weil man davon ausgeht, dass dadurch die körpereigene Abwehr gegen Krebs vorangeht. Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) entscheiden bei bestimmten Brustkrebsformen über die Überlebenschancen und können einen prädiktiven Nutzen hinsichtlich des Ansprechens auf eine Chemotherapie haben [43]. Beim triple negativen Mammakarzinom zeigen Patientinnen mit einem hohen TIL-Spiegel ein besseres Ansprechen auf die Therapie. Damit haben diese Patientinnen eine bessere Prognose [43]. Die Immuntherapie soll das Immunsystem zusätzlich gegen den Tumor aktivieren. Insofern könnten Immunzellen (TILs) ein Marker für eine erfolgreiche Immuntherapie mit Checkpointinhibitoren sein [43].

2.11. SOX10-Protein

SOX10 ist ein nuklearer Transkriptionsfaktor. Mit anderen Faktoren der SOX-Familie spielt er eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung von Geweben und Organen. Er ist an der Entwicklung der Neuralleiste und des peripheren Nervensystems beteiligt und fungiert als nukleocytoplasmatisches Shuttle-Protein [44]. Im normalen Gewebe wird SOX10 in Melanozyten und Myoepithelzellen exprimiert [45]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass SOX10 sowohl in physiologischem Brustgewebe als auch bei einigen Brustkrebsarten, besonders beim triple negativen Mammakarzinom exprimiert wird. Der Stellenwert der SOX10 Expression beim metastasierten triple negativen Mammakarzinom ist jedoch noch unklar [46]. Da in einer weiteren Studie gezeigt wurde, dass SOX10 einen Nutzen als ein Marker in Genexpressions-Panels zur Diagnose des triple negativen Brustkrebs haben könnte [32], wurde in dieser Arbeit das Protein bei dem untersuchten Kollektiv der triple negativen Mammakarzinom Patientinnen bestimmt. Es sollte herausgefunden werden, ob die Expression von SOX10 mit der PD-L1 Expression und den vorhandenen klinischen Daten der Patientinnen im Zusammenhang steht.

2.12. Fragestellungen der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von PD-L1 und SOX10 bei TNBC Patientinnen mittels Immunhistochemie mit verschiedenen Antikörper-Klonen und Detektionskits zu untersuchen, und diese Ergebnisse mit den vorhandenen klinischen Daten der Patientinnen zu analysieren. Zudem wollten wir herausfinden, ob die zur Verfügung stehenden Antikörper-Klone und Detektionssysteme zur PD-L1 Bestimmung beim TNBC zu vergleichbaren Ergebnissen führen.

Folgende Fragestellungen wurden in dieser Arbeit beantwortet:

- Führen die beiden Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 und Klon 28-8 bei der immunhistochemischen Färbung bei TNBC Patientinnen zum gleichen Ergebnis?
- Gibt es einen Unterschied zwischen der PD-L1 Färbung der Tumorzellen (gefärbt mit Klon 22C3 und Klon 28-8) und der PD-L1 Färbung der Immunzellen (gefärbt mit Klon SP142)?
- Ist die cytoplasmatische Färbung bei der Färbung mit Klon 22C3 und Klon 28-8 unter Verwendung des Detektion-Kits ultraView Alkaline Phosphatase Red auswertbar? Ist diese relevant?
- Unterscheidet sich die Färbung der Tumorzellmembran von der cytoplasmatischen Färbung bei der immunhistochemischen Färbemethode mit den beiden PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 und Klon 28-8?
- Korreliert die cytoplasmatische PD-L1 Färbung (gefärbt mit Klon 22C3 und Klon 28-8) mit der PD-L1 Färbung der Immunzellen (gefärbt mit Klon SP142)?
- Exprimieren diese untersuchten TNBC Patientinnen SOX10?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression auf den Tumorzellen (TC), der PD-L1 Expression auf den Immunzellen (IC), der SOX10 Expression und den vorhandenen klinischen Parametern wie Überleben, spätere Metastasierung, Rezidiv, Nodalstatus, Grading, Her2(neu) Status (Score 0,1,2) und Ki67?

3. Material und Methodik

3.1. Patientinnen und Tumorgewebe

Patientinnen

Für diese Arbeit wurden 60 Patientinnen aus der Datenbank der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes ausgewählt. Alle Patientinnen wurden im Routinealltag mit einem triple negativen Mammakarzinom diagnostiziert. Eingeschlossen wurden alle Patientinnen mit einem histologisch gesicherten triple negativen Mammakarzinom, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten. Alle Patientinnen wurden in der Universitätsfrauenklinik in Homburg operiert. Ihr Tumorgewebe war im Institut für Pathologie der Universität des Saarlandes in Homburg gelagert und somit für diese Arbeit verfügbar. Der Krankheitsverlauf der Patientinnen wurde von der Diagnose an im hauseigenen Programm SAP (Systeme, Anwendungen, Produkte) der Universität Homburg Saar archiviert. Somit konnten die klinischen Daten retrospektiv vom Autor erhoben werden. Als Stichtag der Datenerhebung wurde der 10. Januar 2018 festgesetzt.

Ethikvotum

Für die Studie wurde ein Ethikvotum bei der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes in der Geschäftsstelle Saarbrücken erteilt. Die Registernummer für das Projekt lautet 207/10.

Klinische Daten

Mit Hilfe des in der Klinik angewandten Softwareprogrammes SAP wurden vom Autor folgende klinische Daten ermittelt:

- Name (im Verlauf anonymisiert)
- Geburtsdatum (im Verlauf anonymisiert)

- Histo-Nummer
- Diagnosedatum
- Alter bei Erkrankung
- Art der Operation
- Histologischer Typ
- Her2(neu) Status (0,1,2)
- Ki67
- Tumorstadium (gemäß TNM Klassifikation)
- Grading
- Nodalstatus
- Metastasen (ja/nein)
- Rezidiv (ja/nein)
- Diagnosedatum eines Zweitkarzinoms
- Diagnosedatum einer späteren Metastasierung
- Todesdatum und Todesursache
- Gesamtüberleben
- Letzte Untersuchung im SAP (Follow-up Klinik)
- Letzte Untersuchung in der Universitätsfrauenklinik (Follow-up Gyn)

Tumorgewebe

Nach Primärexzision durch den Operateur in der Universitätsfrauenklinik in Homburg, wurde der Tumor in 4%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert. Im Institut für Allgemeine und spezielle Pathologie der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes wurde der Tumor vom Pathologen zugeschnitten, in aufsteigender Alkoholreihe (50%, 50%, 70%, 70%, 96%, 96%) entwässert, in Xylol getaucht, mit Paraffin in Kassetten eingebettet und befundet.

3.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Zunächst erfolgte eine Routinefärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE Färbung), die zur Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild diente. In der Forschung verwendet man die HE Färbung bei der Diagnostik von Tumoren [47]. Mit dem Rotationsmikrotom wurden 1µm dicke Schnitte angefertigt. Im warmen Wasserbad streckten sich die Schnitte bei 42 Grad Celsius, und wurden dann auf Objektträger aufgezogen. Über Nacht wurden diese bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet, und anschließend vom Pathologen zur morphologischen Kontrolle des Gewebes und zur Diagnostik verwendet. Es erfolgte eine 10-minütige Entparaffinierung der Schnitte in Xylol. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 96%, 70%, 70%, 50%, 50%, dann Aqua destillata) rehydriert. Die Schnitte wurden in Hämatoxylin (Hämalaun, sauer nach Mayer) überführt, um saure Strukturen anzufärben. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung erschienen die Zellkerne nach der Hämatoxylin-Färbung rötlich-braun. Beim anschließenden „Bläuen“ wurde der pH-Wert durch einfaches Spülen in Leitungswasser erhöht. Dadurch schlug der Farbton nach Blauviolett um. Die Cytoplasma-Färbung erfolgte anschließend in einer wässrigen Lösung von Eosin (Eosin G-Lösung 0,5% wässrig). Durch weitere Spülschritte über Alkohollösungen in aufsteigender Konzentration (50%, 50%, 70%, 70%, 96%, 96%) wurde das Wasser aus den Gewebeschnitten verdrängt. Schließlich wurde der entwässerte Schnitt in dem organischen Lösungsmittel Xylol geklärt, mit dem Eindeckmittel Eukitt eingedeckelt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Schnitte wurden dann zur Mikroskopie verwendet um den Tumoranteil in den Präparaten zu untersuchen. Patienten deren Operations-Präparate einen Tumoranteil von unter 10% (Prozent) enthielten, wurden nicht berücksichtigt. Es wurde eine Liste mit den Fallnummern der Patientinnen mittels OP-Schlüssel erstellt. Von jeder in den Voruntersuchungen ausgewählten Proben mit ausreichendem Tumorgehalt, wurden jeweils 3 Stenzen des Tumorgewebes in Tissue-Microarrays (TMA) eingebracht (siehe 3.3.1.). Es wurde darauf geachtet, dass in jeder Stanze mind. 100 vitale Tumorzellen vorhanden sind (Tabelle 1,2,3).

3.3. Tissue Micro Array

3.3.1. Herstellung der TMA Blöcke

Nach der Vorauswahl der 60 Proben triple negativer Patientinnen mit ausreichendem Tumormaterial (Tabelle 1, 2 und 3), erfolgte die Erstellung von drei TMA Blöcken durch die Firma multiblock GmbH in Hannover, Vertrieb durch ZYTOMED, Berlin.

Pat.-Nr.	Tumor-Block	Position im TMA
1	H23929-04 I C	A1,B1,C1
2	H10006-05 III C	D1,E1,F1
3	H11674-05 C ss	A2,B2,C2
4	H15305-05 I B	D2,E2,F2
5	H16467-05 I B	A3,B3,C3
6	H16627-05 4 B	D3,E3,F3
7	H17889-05 IB	A4,B4,C4
8	H07132-06 6A	D4,E4,F4
9	H00210-07 IA	A5,B5,C5
10	H01204-07 IF	E5,F5,G5
11	H02454-07 II H	A6,B6,C6
12	H03506-07 IC	E56,F6,G6
13	H06023-07 IE; IG	A7,B7,C7
14	H05510-07 IG	E7,F7,G7
15	H06617-07 IA	A8,B8,C8
16	H07130-07 li	E8,F8,G8
17	H08043-07 IA	A9,B9,C9
18	H07895-07 IF	D9,E9,F9
19	H10187-07 IE	A10,B10,C10
20	H14670-07 IA	D10,E10,F10

Tabelle 1: Tissue Micro Array Probe 1

Tumor-Block der Gewebeproben der TNBC-Patientinnen die für die Erstellung der TMA's verwendet wurden.

Pat.-Nr.	Tumor-Block	Position im TMA
21	H20306-07 IF	G1,H1,I1
22	H20250-07 IE	J1,K1,L1
23	H03717-08 H	G2,H2,I2
24	H06504-08 IG	J2,K2,L2
25	H08861-08 IE	G3,H3,I3
26	H08970-08 G	J3,K3,L3
27	H17920-08 SS	G4,H4,I4
28	H23415-08 A	J4,K4,L4
29	H06016-09 IA	G5,H5,I5
30	H16202-09 G	J5,K5,L5
31	H16379-09 IA	G6,H6,I6
32	H17947-09 IA	J6,K6,L6
33	H22570-09 II E	G7,H7,I7
34	H01131-10 IE	J7,K7,L7
35	H01471-10 A,C	G8,H8,I8
36	H02500-10 C	J8,K8,L8
37	H03727-10 A	G9,H9,I9
38	H05225-10 F	J9,K9,L9
39	H09964-10 G	G10,H10,I10
40	H18144-10 IE	J10,K10,L10

Tabelle 2: Tissue Micro Array-Probe 2

Tumor-Block der Gewebeproben der TNBC-Patientinnen die für die Erstellung der TMA's verwendet wurden.

Pat.-Nr.	Tumor-Block	Position im TMA
41	H23251-10 A	M1,N1,O1
42	23948-10C	P1,Q1,R1
43	H23948-10 C,I	M2,N2,O2
44	H25944-10 IC	P2,Q2,R2
45	H02228-11 IF	M3,N3,O3
46	H03301-11 A	P3,Q3,R3
47	H07677-11 IE	M4,N4,O4
48	H10885-11 I A,H	P4,Q4,R4
49	H14899-11 A (SS), C	M5,N5,O5
50	H21537-11 A,E	P5,Q5,R5
51	H22940-11 I G	M6,N6,O6
52	H27104-11 IF	P6,Q6,R6
53	H06119-12 I B,D	M7,N7,O7
54	H14075-12 C	P7,Q7,R7
55	H21403-13 E	M8,N8,O8
56	H10207-12 G	P8,Q8,R8
57	H15818-13 II A	M9,N9,O9
58	H23495-12 E	P9,Q9,R9
59	16276-07 I E C	M10,N10,O10
60	3033-08 IG	P10,Q10,R10

Tabelle 3: Tissue Micro Array Probe 3

Tumor-Block der Gewebeproben der TNBC-Patientinnen die für die Erstellung der TMA's verwendet wurden.

Dem Technikreport ist zu entnehmen, dass im Block 1 (LS 868611-1) der Gewebeanteil in den Stenzen für die Positionen 5, 43, 52 und 57 sehr klein war, ebenfalls im Block 2 (LS 868611-2) die Position 1, 2, 3, 21, 35, 44, 46 und 47, in Block 3 (LS 868611-3) in den Positionen 4, 5, 6 und 27. Das hatte zur Folge, dass später beim Schneiden der Blöcke in diesen Positionen bei den Stenzen die Anzahl der erzielbaren Schnitte gering war. Die Einbettung erfolgte am 12.02.2017 von Frau Chr. Heinze, Medizinisch-technische Assistentin aus Hannover. Die Position M* (Probe 1 Position X3, Probe 2 Position Y3, Probe 3 Position Z3) ist exzentrisch gelegenes Markierungsgewebe (Herzmuskel vom Hund), welches zur Orientierung im Multiblock und gleichzeitig als Negativkontrolle diente.

3.3.2. Verarbeitung der TMA Blöcke

Von den TMA Blöcken mit den Tumorgewebeproben der triple negativen Patientinnen wurden mittels Rotationsmikrotom 1µm dicke Schnitte zur weiteren Untersuchung angefertigt. Die Schnitte streckten sich im warmen Wasserbad bei 42°C und wurden dann auf Objektträger aufgezogen. Über Nacht wurden diese bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet.

3.4. Immunhistochemische Färbungen

3.4.1. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode, die in Laboren zur Diagnostik eingesetzt wird. Es werden spezifische Primärantikörper zur Lokalisierung und Bindung von Antigenen in fixierten Gewebeschnitten verwendet. Die Bindung des Antikörpers an das Antigen wird mit einem indirekten Nachweisverfahren visualisiert, indem man ein gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteter Sekundärantikörper, sowie ein Enzym mit einem entsprechenden Substrat-Chromogen-System verwendet. Durch diese Kombination entsteht ein farbiges Präzipitat an der Stelle der spezifischen Antikörperbindung [48]. Die Immunhistochemie ist eine schnelle und relativ kostengünstige Methode, die von den meisten Pathologen bevorzugt wird, weil sie gleichzeitig die Auswertung eines Färbemusters und die Auswertung des Gewebemusters, sowie die Erkennung der Tumorzellen ermöglicht [49]. In dieser Arbeit wurden formalinfixierte, paraffineingebetteten Proben (FFPE) verwendet.

Immunhistochemie zum Nachweis von PD-L1

Durch verschiedene immunhistochemische Analysen konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass PD-L1 von Tumorzellen unterschiedlich stark exprimiert wird [31]. Das Potential von PD-L1 als Biomarker ist mittlerweile in den Focus der Krebsforschung gerückt. PD-L1 ist ein membranständiges Protein, das einerseits von Immunzellen, wie dendritischen Zellen, Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten, andererseits von epithelialen Zellen, auch Tumorzellen, exprimiert werden kann [50]. Zur Bestimmung gibt es zahlreiche Antikörper-Klone und Nachweis-Kits. In dieser Arbeit haben wir uns auf drei

verschiedene Anti-PD-L1 Antikörper Klone beschränkt: Klon 22C3, Klon 28-8 und Klon SP142. Die beiden Klone 22C3 und 28-8 werden beim NSCLC verwendet um die PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran zu bestimmen. Beim NSCLC wird bei dieser PD-L1 Färbung die cytoplasmatische Färbung nicht berücksichtigt [51]. Der Antikörper SP142 wurde von der Firma Roche/Ventana Medical systems und von Roche/Gentech entwickelt, um die PD-L1 Expression auf tumorinfiltrierenden Immunzellen nachzuweisen, speziell um Patientinnen zu identifizieren, die auf die Behandlung mit dem Immuncheckpoint-Inhibitor Atezolizumab ansprechen [20, 33, 34].

Immunhistochemie zum Nachweis von SOX10

In einer Studie von *Tacha et al.* [52] wurde die Expression von SOX10 mittels Immunhistochemie beschrieben. *Tetzlaff et al.* [53] beschreibt in seiner Arbeit die SOX10 Expression mit einem Antikörperklon von Cell Marque. In dieser Arbeit wurde der monoklonale Kaninchenantikörper SP267 von Cell Marque ausgewählt, der ebenfalls mit dem Ventana Nachweis-System im BenchMark Färbeautomaten verwendet werden kann.

3.4.2. Positivkontrolle

Zur Qualitätskontrolle ist es generell erforderlich zusammen mit jedem Färbedurchlauf eine positive Gewebekontrolle mitlaufen zu lassen. Die Positivkontrolle dient als Nachweis dafür, dass während des Färbeprozesses der Antikörper aufgebracht wurde, und dass das Gerät korrekt funktioniert hat. In dieser Arbeit wurde als Positivkontrolle für die PD-L1 Bestimmung Tonsillengewebe verwendet. Bei der SOX10 Bestimmung wurde eine positive Gewebeprobe (Mamma-Gewebe Probe 3, P1) als Positivkontrolle eingesetzt.

3.4.3. Negativkontrolle

Zur Qualitätskontrolle ist es ebenfalls erforderlich zusammen mit jedem Färbedurchlauf eine negative Gewebekontrolle mit zu färben. Die negative Gewebefärbung dient zum Nachweis dafür, dass der Färbeprozesses korrekt funktioniert hat, dass dort wo keine PD-L1 Rezeptoren bzw. SOX10 Rezeptoren sitzen, keine Färbung zu sehen ist. In dieser Arbeit wurde als Negativkontrolle bei allen Färbungen Herzmuskelgewebe vom Hund verwendet, welches zusätzlich als Orientierungshilfe diente.

3.4.4. Immunhistochemische Färbung im Ventana BenchMark ULTRA

Die Schnitte wurden im Färbevollautomat BenchMark ULTRA (Ventana Roche) gefärbt (siehe Abb. 5). Ventana BenchMark Ultra ist ein vollautomatisiertes Färbesystem für die Immunhistochemie. Von der Entparaffinierung der Probe bis hin zur Gegenfärbung konnten alle notwendigen Schritte auf einem System im selben Lauf durchgeführt werden. Mit dem Färbeautomaten wurden standardisierte Färbebedingungen geschaffen. Die automatisierten immunhistochemischen Protokolle für den Nachweis von PD-L1 und anderen Biomarkern wurden bereits von der US Food and Drug Administration (FDA) als Begleitdiagnostik für gezielte Therapien zugelassen [49]. Durch das vollautomatisierte Färbesystem und die gebrauchsfertigen Reagenzien wurden fehleranfälligen Arbeitsschritte und Verwechslungsrisiken minimiert. Im Reagenzien Karussell war Platz für 35 Reagenzien. Es gab 30 Reaktionskammern für je 1 Probe. Zudem hatte der Apparat Platz für Vorratsreagenzien, die das Nachfüllen während des Laufes ermöglichten und einen Abfallbehälter, der auch die Leerung während des Laufs möglich machte. Eine grafischen Benutzeroberfläche am Computer ermöglichte eine kontinuierliche Überwachung aller Komponenten und die Anzeige des Status. Der Ventana BenchMark ULTRA verfügt über eine patentierte Technologie und ermöglichte dadurch eine konstant hohe Färbequalität. Um die Evaporation zu kontrollieren, wurde durch Liquid Coverslip eine Reaktionskammer auf der Oberfläche von jedem Projektträger erzeugt. Dadurch wurde das Gewebe geschützt und die Menge des verwendeten Reagenzes konnte minimiert werden. Unter dem Liquid Coverslip wurde die Pufferschicht durch einen Air Vortex Mixer verwirbelt. Auf diese Weise wurden die Reagenzien gemischt und es entstand eine einheitliche Reaktionskinetik auf der gesamten Oberfläche des Objektträgers. (Produktdatenblatt Ventana BenchMark ULTRA) [54].



Abbildung 5: Der Färbeautomat Ventana BenchMark ULTRA (Produktdatenblatt Ventana BenchMark ULTRA) [54]

Ein probenspezifisches Etikett bestimmte den Ablauf des entsprechenden Protokolls und gewährleistete automatisch eine Probenidentifizierung. Mit dem ThermoFlex Pad (ein Wärmepad mit individueller Temperaturregelung) konnte die benötigte Temperatur präzise eingestellt werden. (Produktdatenblatt Ventana Benchmark ULTRA) [54].

3.4.5. Färbeprotokolle

Färbeprotokoll im Ventana BenchMark ULTRA für 28-8 mit Ultra view red

Das Färbeprotokoll mit der Protokollnummer 450 wurde an der Universität des Saarlandes im Institut für Pathologie in Homburg Saar nach den Vorgaben des Produktdatenblattes des PD-L1 Antikörpers Klon 28-8 [55] erstellt.

1. Entparaffinierung (ausgewählt)
2. Objektträger-Temperatur von 72 °C auf Mittlere Temperaturen (Entparaffinierung) erhöhen
3. Hitzevorbehandlung (ausgewählt)
4. ULTRA CC1 (ausgewählt)
5. Erwärme Objektträger auf 100°C und inkubiere für 8 Minuten (Cell Conditioner Nr.1)
6. 20 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
7. 36 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
8. 52 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
9. 64 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
10. Antikörper Inkubations-Temperatur definieren (ausgewählt)
11. Erwärme Objektträger auf 37°C und inkubiere für 4 Minuten (Antikörper)
12. Antikörper (ausgewählt)
13. 1 Tropfen von (PREP KIT 87) (Antikörper 28-8) auftragen, LCS auftragen u. für 24 Minuten inkubieren
14. Verstärken (ausgewählt)
15. Kaninchen-Antikörper (Amp) (ausgewählt)
16. UltraWash (ausgewählt)
17. Gegenfärbung (ausgewählt)
18. 1 Tropfen von (Hematoxylin II) (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen und für 12 Minuten inkubieren
19. Nach-Gegenfärbung (ausgewählt)
20. 1 Tropfen von BLUING REAGENT (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen und für 4 Minuten inkubieren

Färbeprotokoll im Ventana BenchMark ULTRA für 22C3 mit ultra View red

Das Färbeprotokoll mit der Protokollnummer 449 wurde an der Universität des Saarlandes im Institut für Pathologie in Homburg Saar nach den Vorgaben des Produktdatenblattes des PD-L1 Antikörpers Klon 22C3 [56] erstellt.

1. Entparaffinierung (ausgewählt)
2. Objektträger-Temperatur von 72 °C auf Mittlere Temperaturen (Entparaffinierung) erhöhen
3. Hitzevorbehandlung (ausgewählt)
4. ULTRA CC1 (ausgewählt)
5. Erwärme Objektträger auf 100°C und inkubiere für 8 Minuten mit CC1
6. 20 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
7. 36 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
8. 52 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
9. 64 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
10. Antikörper Inkubations-Temperatur definieren (ausgewählt)
11. Erwärme Objektträger auf 37°C und inkubiere für 4 Minuten (Antikörper)
12. Antikörper (ausgewählt)
13. 1 Tropfen von PREP KIT 86 (Antikörper 22C3) auftragen, LCS auftragen u. für 24 Minuten inkubieren
14. Verstärken (ausgewählt)
15. Maus-Antikörper (Amp) (ausgewählt)
16. UltraWash (ausgewählt)
17. Gegenfärbung (ausgewählt)
18. 1 Tropfen von (Hematoxylin II) (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen und für 12 Minuten inkubieren
19. Nach-Gegenfärbung (ausgewählt)
20. 1 Tropfen von BLUING REAGENT (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen und für 4 Minuten inkubieren

Färbeprotokoll im Ventana BenchMark ULTRA für Ventana SP142 mit OptiView DAB ICH

Das Färbeprotokoll mit der Protokollnummer 412 wurde an der Universität des Saarlandes im Institut für Pathologie in Homburg Saar nach den Vorgaben des Produktdatenblattes des PD-L1 Antikörpers Klon SP142 [57] erstellt.

1. Paraffin (ausgewählt)
2. Entparaffinierung (ausgewählt)
3. Objektträger-Temperatur von 72 °C auf Mittlere Temperaturen (Entparaffinierung) erhöhen
4. Hitzevorbehandlung (ausgewählt)
5. ULTRA CC1 (ausgewählt)
6. Erwärme Objektträger auf 100°C und inkubiere für 4 Minuten mit CC1
7. ULTRA CC1 8 Min (ausgewählt)
8. ULTRA CC1 16 Min (ausgewählt)
9. ULTRA CC1 24 Min (ausgewählt)
10. ULTRA CC1 32 Min (ausgewählt)
11. ULTRA CC1 40 Min (ausgewählt)
12. ULTRA CC1 48 Min (ausgewählt)
13. Vor-Primärperoxidase-Hemmer (ausgewählt)
14. Primärantikörper (ausgewählt)
15. Temperatur Primärantikörper (ausgewählt)
16. Erwärme Objektträger auf 36°C (Primär Antikörper)
17. Antikörpertitration (ausgewählt)
18. Hand Apply (Primär Antikörper SP142), Inkubationszeit: 16 Minuten
19. Opti View Amplification (ausgewählt)
20. 1 Tropfen OV AMP H202 und einen Tropfen OV AMPLIFIER auftragen, LCS auftragen und für 8 Minuten inkubieren
21. 1 Tropfen OV AMP MULTIMER auftragen, Coverslip auftragen, und für 8 Minuten inkubieren
22. Gegenfärbung (ausgewählt)
23. 1 Tropfen von (Hematoxylin II) (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen und für 4 Minuten inkubieren
24. Nach-Gegenfärbung (ausgewählt)
25. 1 Tropfen von BLUING REAGENT (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen und für 4 Minuten inkubieren

Färbeprotokoll im Ventana BenchMark ULTRA für SOX10 mit ultra View red

Das Färbeprotokoll mit der Protokollnummer 418 wurde an der Universität des Saarlandes im Institut für Pathologie in Homburg Saar nach den Vorgaben des Produktdatenblattes des SOX10 Antikörpers Klon SP267 [58] erstellt.

1. Entparaffinierung (ausgewählt)
2. Objektträger-Temperatur von 72 °C auf Mittlere Temperaturen (Entparaffinierung) erhöhen
3. Hitzevorbehandlung (ausgewählt)
4. ULTRA CC1 (ausgewählt)
5. Erwärme Objektträger auf 95°C und inkubiere für 8 Minuten mit CC1
6. 20 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
7. 36 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
8. 52 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
9. 64 Minuten ULTRA CC1 (ausgewählt)
10. Antikörper Inkubations-Temperatur definieren (ausgewählt)
11. Erwärme Objektträger auf 37°C und inkubiere für 4 Minuten (Antikörper)
12. Antikörper (ausgewählt)
13. 1 Tropfen von SOX10 (SP267) (Antikörper) auftragen, LCS auftragen u. für 36 Minuten inkubieren
14. UltraWash (ausgewählt)
15. Gegenfärbung (ausgewählt)
16. 1 Tropfen von (Hematoxylin II) (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen und für 12 Minuten inkubieren
17. Nach-Gegenfärbung (ausgewählt)
18. 1 Tropfen von BLUING REAGENT (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen und für 4 Minuten inkubieren

3.4.6. Verwendete Antikörper

Die Expression von PD-L1 wurde mit drei verschiedenen Anti-Human-PD-L1 Antikörpern namens Klon 22C3, Klon 28-8 und Klon SP142 untersucht. Die Expression von SOX10 wurde mit nur einem Antikörper Klon SP267 untersucht. Alle Antikörper sind zur Verwendung in der Immunhistochemie bestimmt, und für die immunhistochemische Färbung mit dem VENTANA Nachweissystem im BenchMark Färbeautomaten empfohlen [55-58].

Anti-Human PD-L1, Klon 22C3

Der monoklonale Mausantikörper Anti-Human PD-L1, Clone 22C3 wurde in flüssiger Form in 0,05 mol/L Tris-HCl-Puffer, 0,015 mol/L Natriumazid, 1% Rinderserum-Albumin, pH 7,2 gelöst geliefert (Produktdatenblatt von Dako) [56].

Konzentration Maus-IgG: 150,0 mg/l

Verdünnung: Der Antikörper Anti-Human PD-L1, Clone 22C3 wurde vor der Färbung mit dem Lösungsmittel Dako Antibody Diluent with Background-Reducing Component 1:50 verdünnt.

Anti-Human PD-L1, Klon 28-8

Der monoklonale Kaninchenantikörper Anti-Human PD-L1, Clone 28-8 wurde in flüssiger Form in 0,01 % Natriumazid, 59% PBS, 40% Glycerol, 0,05% BSA gelöst geliefert (Produktdatenblatt von abcam) [55].

Konzentration Kaninchen-IgG: 1,009 mg/l

Verdünnung: Der Antikörper Anti-Human PD-L1, Clone 28-8 wurde vor der Färbung mit dem Lösungsmittel Dako Antibody Diluent mit Background-Reducing Components 1:200 verdünnt.

Anti-Human PD-L1, Klon SP142

Der monoklonale Kaninchenantikörper Anti-Human PD-L1, Clone SP142 wurde in flüssiger Form in 0,05 mol/l Tris-gepufferte Kochsalzlösung, 0,01 mol/l EDTA, 0,05% Brij-35 mit 0,3% Trägerprotein und 0,05% Natriumazid gelöst geliefert (Produktdatenblatt Ventana) [57].

Konzentration Kaninchen-IgG: 7 mg/l

Verdünnung: Der Antikörper Anti-Human PD-L1, Clone SP142 wurde vor der Färbung nicht weiter verdünnt.

Anti-Human SOX10, Klon SP267

Der monoklonale Kaninchenantikörper SOX10 (SP267) wurde in flüssiger Form in Tris-Puffer (PH 7,3-7,7), 1% BSA und 0,1% Natriumazid gelöst geliefert (Produktdatenblatt von Cell Marque) [58].

Konzentration Kaninchen-IgG: 3 mg/l

Verdünnung: Der Antikörper Anti-Human SOX10, Clone SP267 wurde vor der Färbung nicht weiter verdünnt.

3.4.7. Verwendete Detektionssysteme

ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red

Für die immunhistochemische Färbung von PD-L1 mit 22C3, 28-8 und für die Färbung von SOX10 mit SP267 wurde als Detektionssystem ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red von Ventana Medical Systems verwendet. Es ist ein indirektes biotinfreies System zum Nachweis von Maus-IgG, Maus-IgM und Kaninchen-Primärantikörpern. Dieses Kit wurde zur Immunhistochemie (IHC) in formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten entwickelt, die auf Ventana BenchMark Geräten gefärbt werden. Es weist spezifische Maus- und Kaninchen-Antikörper nach, die in paraffineingebetteten Gewebeschnitten an ein Antigen gebunden sind. Das ultraView

Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit verwendet einen Cocktail aus enzymmarkierten Sekundärantikörpern zum Lokalisieren des gebundenen Primärantikörpers. Der Komplex wird dann mit Naphthol und Fast Red Chromogen dargestellt, wodurch ein rotes Präzipitat entsteht, welches mit Hilfe der Lichtmikroskopie schnell erkennbar ist. Das Nachweiskit beinhaltet ultraView Universal AP Red Multimer, ultraView Universal AP Red Fast Red A, ultraView Universal AP Red Fast Red B, ultraView Universal AP Red Naphthol, ultraView Universal AP Red Enhancer (Produktdatenblatt von Ventana) [48].

Opti View DAB IHC Detection Kit

Bei der immunhistochemischen Färbung von PD-L1 mit SP142 wurde OptiView DAB ICH Nachweiskit von Ventana Medical Systems) verwendet. Es ist ebenfalls ein indirektes, Biotin-freies System zum Nachweis von Maus-IgG-, Maus-IgM- und Kaninchen-Primärantikörpern. Das Kit weist spezifische Maus- und Kaninchen-Primärantikörper nach, die in paraffineingebetteten Gewebeschnitten an Antikörper gebunden sind. Der spezifische Antikörper wird durch einen spezifischen Sekundärantikörper lokalisiert, der durch einen enzymmarkierten Tertiärantikörper gebunden wird. Der Komplex wird dann mit einem Enzymfällungsprodukt sichtbar gemacht. Der Sekundärantikörper besteht hier aus einem Cocktail aus Sekundärantikörpern. Dieser dient zum Lokalisieren des gebundenen Primärantikörpers. Der Cocktail von Sekundärantikörpern wird von einem enzymgebundenen Tertiärantikörper erkannt, der mit einem Wasserstoffperoxidsubstrat und einer 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Substratlösung (DAB) als braune Ablagerung sichtbar gemacht wird. Dieses Enzymfällungsprodukt ist im Lichtmikroskop zu erkennen. Das OptiView Amplification Kit beinhaltet 6 Komponenten: OptiView Peroxidase Inhibitor, OptiView HQ Universal Linker, OptiView HRP Multimer, OptiView H₂O₂, OptiView DAB und OptiView Cooper. Das Nachweiskit wurde für die Verwendung mit einem Ventana BenchMark Färbeautomaten optimiert (Produktdatenblatt von Ventana) [59].

3.4.8. Weitere Reagenzien

Dako Antibody Diluent

Die Antikörper wurden wie unter 3.4.6. beschrieben, mit Antibody Diluent with Background Reducing Components verdünnt. Das Lösungsmittel enthält 0,05% Tris-HCl-Puffer mit 0,1% Tween, Natriumazid und stabilisierenden Proteine zur Reduzierung der Hintergrundfärbungen. Das optimale Färbeergebnis ist von der richtigen Verdünnung des primären Antikörpers abhängig. Zwischen Epitopen und Antikörpern beruhen die Wechselwirkungen hauptsächlich auf schwachen Kräften, wie van der Waals-Kräfte, elektrostatischen und hydrophoben Kräften, die von pH und Ionenstärke beeinflusst werden (Produktdatenblatt von Dako) [60].

Ultra Cell Conditioning (ULTRA CC1) von Ventana Medical Systems

Ultra CC1 ist eine Lösung, die zur Vorbehandlung der Gewebeproben für immunhistochemische Tests verwendet wird, die auf dem Ventana BenchMark ULTRA Färbeautomaten durchgeführt werden. Die Lösung wird nach der Entparaffinierung von den paraffineingebetteten Schnitten auf die Gewebeproben gegeben, bevor andere Reagenzien hinzugegeben werden. Die Fixierung des Gewebes in Formalin hat zur Folge, dass sich kovalente Bindungen zwischen dem Aldehyd und den im Gewebe vorliegenden Aminogruppen bilden. Diese Bindungen denaturieren das Protein und können zum Verlust der Antigenizität führen. Zudem kann das Formaldehyd durch die Vernetzung von Gewebeproteinen Methylenbrücken bilden und so die Permeabilität des Gewebes für große Moleküle, z. B. Antikörper, reduzieren. Ultra CC1 ist ein Tris-basierter Puffer, der nicht verdünnt werden darf. Die Lösung hat einen leicht erhöhten pH-Wert, der bei höheren Temperaturen, die durch das Formalin im Gewebe gebildeten kovalenten Bindungen hydrolysieren kann. Das Entfernen dieser Bindungen ermöglicht die Renaturierung der Proteinmoleküle und erhöht die Aufnahmefähigkeit für Antikörper (Produktdatenblatt von Ventana) [61].

Reaction Buffer Concentrate (10x) von Ventana Medical Systems (Ventana R)

Der Reaction Buffer ist eine Tris-basierte Pufferlösung (pH $7,6 \pm 0,2$). Sie wird als Schlüsselkomponente für stringentes Reinigen von Objektträgern zwischen den Färbevorgängen verwendet, und sorgt für die Aufrechterhaltung einer ordnungsgemäßen, wässrigen Umgebung bei immunhistochemischen Reaktionen. Der Puffer stoppt nach Ablauf der Inkubationszeit mit den entsprechenden Antikörpern die Reaktion und entfernt ungebundene Chemikalien, die ggf. im nachfolgenden Schritt die gewünschte Farbreaktion verhindern könnten (Produktdatenblatt von Ventana) [62].

Vor der Verwendung wurde der Puffer mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnt.

Herstellung der Verdünnung:

Das Konzentrat (Tris-basierter Puffer mit Konservierungsstoff) wurde in einer 2 l Flasche geliefert. Der 20-l-Behälter mit Hahn (im Lieferumfang des automated slide stainer enthalten) wurde bei geschlossenem Hahn zu drei Vierteln mit destilliertem Wasser gefüllt. Anschließend wurde der gesamte Inhalt der 2 l Flasche des Reaction Buffer Konzentrates (10x) in den Behälter geschüttet, bis zur Messmarke 20 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt, gemischt und gründlich durchgeschüttelt. Der Verschluss wurde locker auf den 20-l- Behälter gesetzt, damit die gebrauchsfertige Lösung frei aus dem Hahn auslaufen konnte. Die verdünnte Lösung Reaction-Buffer (1x) war dann gebrauchsfertig.

Ultra Liquid Coverslip (ULTRA LCS) von Ventana Medical Systems (Ventana)

ULTRA LCS ist eine vorverdünnte Eindecklösung, die als Barriere zwischen wässrigen Reagenzien und der Luft verwendet wird. Diese Barriere verhindert die Evaporation und bietet so eine stabile wässrige Umgebung für die auf den Färbeautomaten von Ventana durchgeführten immunhistochemischen Tests.

ULTRA LCS (Predilute) besteht aus organischen Ölmolekülen, die eine wesentlich geringere Dichte als Wasser haben. Nach Zugabe zu einem wässrigen Pufferpool führt die Oberflächenspannung dazu, dass sich das leichtere Öl über der Oberfläche des Puffers verteilt, und mit dem Puffer eine Art Kammer bildet. Die dadurch entstehende Barriere zwischen dem Puffer und der Luft verhindert wirksam die Evaporation der wässrigen Reagenzien. Außerdem können andere, nachträglich zugegebene wässrige

Reagenzien durch die Oberflächenschicht von ULTRA LCS hindurch in den Pufferpool auf dem Objektträger gelangen (Produktdatenblatt von Ventana) [63].

EZ Prep Concentrate von Ventana Medical Systems

EZ Prep Concentrate (10x) ist eine Lösung von Ventana Medical Systems (Ventana), die zur Entparaffinierung von Gewebeproben bei immunhistochemischen Reaktionen auf Färbeautomaten von Ventana verwendet wird. Die Gewebeschnitte werden auf den Färbeautomaten von Ventana mit Hilfe von Hitze, der milden Detergenzlösung (EZ Prep) und eines Wirbelmixers entparaffiniert. Durch die Hitze wird das Paraffin in den Gewebeschnitten geschmolzen. Das Detergens reduziert die Oberflächenspannung der wässrigen Lösung, wodurch das geschmolzene Paraffin aus dem Gewebe und von der Glasoberfläche entfernt wird und dann zu der Oberfläche des wässrigen Pools schwimmt. Die Wirbelmixer verhindern, dass sich das Paraffin erneut auf dem Objektträger absetzt, und es kann durch Spülen entfernt werden (Produktdatenblatt von Ventana) [64].

Vor der Verwendung wurde der Puffer mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnt.

Herstellung der Verdünnung:

Das Konzentrat (Detergenzlösung auf wässriger Basis mit 0,5% Pro Clin 300 als Konservierungsmittel) wurde in einer 2 l Flasche geliefert. Der 20 l Behälter mit Hahn (im Lieferumfang des automated slide stainer enthalten) wurde bei geschlossenem Hahn zu drei Vierteln mit destilliertem Wasser gefüllt. Anschließend wurde der gesamte Inhalt der 2-l-Flasche des EZ- Prep Konzentrates (10x) in den Behälter geschüttet, bis zur Messmarke 20 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt, gemischt und gründlich durchgeschüttelt. Der Verschluss wurde locker auf den 20-l- Behälter gesetzt, damit die gebrauchsfertige Lösung frei aus dem Hahn auslaufen konnte. Die verdünnte (1x) EZ Prep-Lösung war dann gebrauchsfertig.

Hämatoxylin II von Ventana Medical Systems

Hämatoxylin II ist ein modifiziertes Mayer's Hämatoxylin und ist für die Färbung von Zellkernen auf Objektträgern bestimmt, die in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete

Gewebeschnitte enthalten. Hämatoxylin färbt eine Reihe von Gewebekomponenten, einschließlich Zellkerne, Mitochondrien, Muzin, Hämoglobin, elastische Fasern und Kollagen. Der Farbstoff Hämatoxylin wird indirekt über ein Beizmittel, Aluminiumsulfat, an das Gewebe gebunden. Allgemein ausgedrückt werden mithilfe der IHC-Färbung Antigene nachgewiesen, indem nacheinander und mit dazwischenliegenden Spülvorgängen ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf das Antigen, ein sekundärer Antikörper (Verknüpfungsantikörper) auf den Primärantikörper, ein Enzymkomplex und ein chromogenes Substrat dazugegeben werden. Das Antigen wird lokalisiert, indem das Reaktionsprodukt mithilfe eines enzymatisch hergestellten Fällungsmittels sichtbar gemacht wird. Die Proben können anschließend mit der Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt werden. Hämatoxylin färbt Zellkerne blau, indem es einen sauren Farbkomplex an Nukleinsäuren und Histon Proteine des Heterochromatins bindet (Produktdatenblatt von Ventana) [65].

Bluing Reagent von Ventana Medical Systems

Bluing Reagent ist eine wasserhaltige Lösung aus gepuffertem Lithiumkarbonat. Das Reagenz ist für die Verwendung mit dem Ventana automated slide stainers und für Gewebeschnitte auf Glasobjektträgern vorgesehen, die mit Hämatoxylin gefärbt sind. Bluing Reagent funktioniert durch den kombinierten Effekt von Lithiumionen und der Erhöhung des pH-Werts des Waschpuffers, um die Hämatoxylin-gefärbten Gewebeschnitte blau zu färben. Das Bluing Reagent wird nach dem Hämatoxylin zugegeben und ändert den Farbton von Hämatoxylin in eine blaue Farbe. Im Anschluss an die Gegenfärbung mit Hämatoxylin wird das Bluing-Reagenz auf den Objektträger gegeben und über den gesamten Probenbereich verteilt. Das Reagenz färbt die Hämatoxylin-gefärbten Gewebeschnitte blau (Produktdatenblatt von Ventana) [66].

Amplification Kit von Ventana Medical Systems

Das Amplification Kit wird zur Verstärkung der Signalintensität von schwach färbenden Maus- und Kaninchen-Primärantikörpern verwendet. Es benutzt schwere und leichte

Ketten des Kaninchen-Anti-Maus-IgGs um sich an den Primärantikörper zu binden. Dadurch erhöht sich die Anzahl der an der Antigenstelle gebundener Antikörper und die Intensität der Färbung verstärkt sich. Das Kit enthält zwei Spender: ein Spender enthält schwere und leichte Ketten Kaninchen-Anti-Maus-IgGs (Amplifier A) und der zweite Spender enthält schwere Ketten Maus-Anti-Kaninchen IgGs (Amplifier B). Amplifier A bindet auf den Gewebeschnitten spezifisch ans Maus-Immunglobulin und Amplifier B bindet spezifisch ans Kaninchen-Immunglobulin. Ein 10 ml-Spender Amplifier A enthält ca. 4 µg/ml von vorverdünntem, schwer- und leichtkettigem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Antikörper in phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit ProClin 300, einem Konservierungsmittel. Ein 10 ml Spender Amplifier B enthält ca. 5 µg/ml von vorverdünntem schwerkettigem Maus-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper in phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit ProClin 300, einem Konservierungsmittel (Produktdatenblatt von Ventana) [67].

OptiView Amplification Kit

Das OptiView Amplification Kit kann zusammen mit dem OptiView DAB IHC Detection Kit verwendet werden, um die Färbung von Maus- und Kaninchen-Primärantikörpern zu verstärken. Es enthält ein HQ-Hapten-Konjugat (OptiView Amplifier), ein entsprechendes Substrat (OptiView Amplification H₂O₂) und einen monoklonalen Maus-Anti-HQ-Antikörper mit HRP (OptiView Amplification Multimer) (Produktdatenblatt von Ventana) [68].

3.4.9. Aufbereitung der Schnitte zur mikroskopischen Auswertung

Nach Ablauf des Färbeprotokolls wurden die Schnitte aus dem BenchMark ULTRA Automat entfernt. Weil diese nun eine Öldeckplatte hatten, wurden sie mit handelsüblichem Spülmittel und ca. 50 Grad Celsius warmen Leitungswasser gespült, in neun Stufen in aufsteigender Alkoholreihe (50%, 50%, 70%, 70%, 96%, 96%) entwässert,

und anschließend sechs Mal in einer Xylol Küvette gespült. Die Objektträger wurden anschließend mit Entellan, einem Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie, eingedeckt und mit Deckgläschen 24 x 50 mm Glasdicke 0,13-0,16 abgedeckt.

3.5. Auswertung, Validierung und Dokumentation der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte in allen Fällen durch zwei Untersucher. Alle Schnitte wurden verblindet von der Autorin ausgewertet und von Herrn Professor Dr. med. R. M. Bohle überprüft (Institut für allgemeine und spezielle Pathologie der Universität des Saarlandes). Bei der Auswertung der TMA Blöcke wurden strikte Kriterien beachtet: Die Autorin hatte vor der Auswertung beim QuiP einen Auswertkurs zur PD-L1-Bestimmung absolviert und Herr Prof. Bohle hat mit seinem Institut erfolgreich an den Ringversuchen vom QuiP zur PD-L1 Bestimmung teilgenommen.

1. Das Probenmaterial musste mindestens 100 auswertbare/vitale Tumorzellen enthalten.
2. Beschädigte oder nekrotische Zelle wurden nicht ausgewertet.
3. Im TMA Block wurden drei Proben von einer Patientin getrennt ausgewertet. Die Ergebnisse der einzelnen Proben wurden anschließend zu einem Ergebnis zusammengefasst. Bei Heterogenität der einzelnen Proben von einer Patientin wurde die prozentuale Verteilung (bezogen auf 100 vitale Tumorzellen) in der gesamten Tumormasse aus den 3 Stenzen einer Patientin ausgewertet.

Färbung mit Anti-PD-L1 Klon 22C3 und Klon 28-8

Die Objektträger mit den gefärbten Proben, gefärbt mit den Anti-PD-L1 Antikörpern 22C3 und 28-8 wurden mit dem Scanner Nikon Supercoolscan ED 5000 eingescannt um eine Übersicht der Blöcke festzuhalten. Anschließend wurden die einzelnen auf dem Objektträger befindlichen Proben der Patientinnen im Mikroskop (Axioskop40, Zeiss, Deutschland) angesehen, ausgewertet, und mit der Fotokamera (AxioCam MRc, Zeiss,

Deutschland) in verschiedenen Vergrößerungen abfotografiert. Zur Übersicht in der 5fachen Vergrößerung, für die Detailansicht in der 10-, 20- und 40-fachen Vergrößerung. Zusätzlich wurden die Objektträger im Nachgang zur Dokumentation der Schnitte von der Firma Sysmex (Norderstedt, Deutschland) per Scanservice eingescannt.

Auswertung der PD-L1 Färbung der Tumorzelle (TC)

Bei der Auswertung der PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran, gefärbt mit den beiden Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 und Klon 28-8 wurde in erster Linie die rote Färbung der Tumorzellmembran positiv gewertet. Die Intensität und das Ausmaß der Membranfärbung (vollständig/unvollständig) spielten dabei keine Rolle [51]. Angegeben wurde der prozentuale Anteil PD-L1 positiver Tumorzellen an der Gesamtzahl der Tumorzellen entsprechend dem TPS (PD-L1 positive Tumorzellen/ PD-L1 positive + PD-L1 negative Tumorzellen). Eine PD-L1 Expression 0 bis <1% wurde „negativ“ bewertet, eine PD-L1 Expression ≥ 1 bis 50% wurde „positiv“ und eine PD-L1 Expression von $\geq 50\%$ wurde „stark positiv“ bewertet (siehe Abb. 8, 9).

Auswertung der cytoplasmatischen PD-L1 Färbung (Cyt)

Zusätzlich zur Tumorzellmembranfärbung (TC) wurde die cytoplasmatische Färbung (Cyt) im Cytoplasma der Tumorzellen ausgewertet (siehe Abb. 8,9). Eine rote Färbung des Cytoplasmas galt als positiv, keine Färbung wurde negativ bewertet.

Färbung mit Anti-PD-L1 Klon SP 142

Bei dieser Färbung wurde zur Fotodokumentation ausschließlich der Scanservice von der Firma Sysmex (Norderstedt, Deutschland) verwendet, d.h. die Objektträger mit den Schnitten wurden nach der Färbung in Transporthüllen verpackt, per Post versendet, und von der Firma Sysmex eingescannt. Die eingescannten Schnitte konnten dann als Slides im Case Viewer von Sysmex (Viewer-Software 3DHistech Case Viewer) in verschiedenen Vergrößerungen abgerufen, angesehen, ausgewertet und dokumentiert werden.

Bei der PD-L1 Färbung der Immunzellen mit Klon SP142 wurden die positiv braun gefärbten einzeln verteilten Immunzellen, die punktuelle Immunzellfärbung und die Immunzellaggregate im intratumoralen Stroma ausgewertet (siehe Abb. 10) [69]. An den ausgezählten Tumorzellen wurde der prozentuale Anteil PD-L1 positiver Immunzellen dokumentiert. Ausgewertet wurde somit der Flächenanteil des Tumors, der von PD-L1 positiven Immunzellen bedeckt ist. Die Tumorzellmembranfärbung wurde nicht berücksichtigt. Alle Proben mit $\geq 1\%$ PD-L1 Expression wurden PD-L1 positiv (IC) gewertet, analog der Zulassungsstudie von Atezolizumab beim triplenegativen Mammakarzinom Impassion 130 [70].

Färbung mit SOX10

Bei dieser Färbung wurde ebenfalls der Scanservice der Firma Sysmex (Norderstedt, Deutschland) genutzt. Die Objektträger mit den gefärbten Schnitten wurden als Slides im Case Viewer von Sysmex in verschiedenen Vergrößerungen angesehen, ausgewertet und dokumentiert (siehe Abb. 11).

Bei der SOX10 Färbung wurde die rote Färbung des Zellkerns in der Tumorzelle ausgewertet. Die Intensität der Färbung wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt. Angegeben wurde der prozentuale Anteil PD-L1 positiv gefärbter Tumorzellkerne an der Gesamtzahl der Tumorzellen. Bei der Auswertung wurde unterschieden zwischen einer SOX10 Expression von 0%, 1 bis 50%, >50 bis <100% und 100%.

3.6. Statistische Auswertung der klinischen Daten

Die klinischen Daten der Patientinnen wurden mit Hilfe des in der Klinik angewandten Softwareprogrammes SAP (Systeme, Anwendungen, Produkte) in Arztbriefen, OP-Berichten, OP-Protokollen und Laborbefunden vom Autor herausgesucht, und mit dem Softwareprogramm Microsoft Excel, Office 365 (Microsoft, Washington, USA) in eine Tabelle eingetragen (siehe Tabelle 6). Die zur Verfügung stehenden Patientinnencharakteristika und die klinikopathologischen Parameter wurden aufgelistet und deren Häufigkeit numerisch und prozentual angegeben. Auch die Ergebnisse der PD-

L1 Expression an der Tumorzellmembran, an den Immunzellen, die cytoplasmatische Färbung, sowie die Ergebnisse der SOX10 Expression wurden in Tabelle 6 numerisch und prozentual dokumentiert. Vom Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose und vom Follow-up wurden jeweils die Mittelwerte bzw. die Standardabweichungen errechnet.

Die weiteren statistischen Auswertungen zum Vergleich der Ergebnisse der PD-L1 Expression und SOX10 Expression mit den vorhandenen klinischen Parametern, erfolgten mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics Version 25 (IBM Deutschland GmbH, Stuttgart) im Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und medizinische Informatik an der Universität in Homburg. Es wurden Kreuztabellen erstellt und die Ermittlung der Signifikanz (exakter zweiseitiger p-Wert) erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test. Zur Überprüfung der Ki67 Werte auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test eingesetzt. Der Gruppenvergleich der Ki67 Werte erfolgte dann mit dem Mann-Whitney-U-Test. Bei SOX10 wurde zum Vergleich mehrerer Gruppen untereinander der der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt.

3.7. Reagenzien, Apparate, Hilfsmittel, Softwareprogramme und Service

Reagenz	Code/Katalog-Nr.	Hersteller
Amplification Kit	760-080	Ventana- Roche, Mannheim, Deutschland
Anti-Human PD-L1, Klon 22C3	M3653	Agilent (Dako); Santa Clara, United States
Anti-Human PD-L1, Klon 28-8	Ab205921	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Human PD-L1, Klon SP142	741-4860	Ventana-Roche, Mannheim, Deutschland
Anti-SOX-10, Klon SP267	CMC49680010	Cell marque, Rocklin, USA

Antibody Diluent with Background Reducing Components	S3022	Agilent (Dako), Santa Clara, United States
Aqua destillata, Ampuwa Plastipur	04801694	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Langenhagen, Deutschland
Bluing Reagent	760-2037	Ventana -Roche, Mannheim, Deutschland
Entellan	107961	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	1.09844.1000	Merck KG Darmstad, Deutschland
Ethanol 50%	1.00983.2511	VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland
Ethanol 70%	32205	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Ethanol 96%	1.00983.2511	VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland
EZ Prep Concentrate (10x)	950-102	Ventana-Roche, Mannheim, Deutschland
Formalin 4 %, neutral gepuffert	99800	Otto Fischar, GmbH & Co.KG Saarbrücken, Deutschland
Haemalaun, sauer nach Mayer	2E-038	Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Deutschland
Hämatoxylin II	790-2208	Ventana -Roche, Mannheim, Deutschland
OptiView Amplification Kit (250)	860-099	Ventana -Roche, Mannheim, Deutschland
OptiView DAB IHC Detection Kit	760-700	Ventana -Roche, Mannheim, Deutschland
Paraffin zum Einbetten	VO-5-1002	Vogel GmbH & Co.KG, Gießen, Deutschland
Prep Kit 86 (22C3)	786-3042	Ventana -Roche, Mannheim, Deutschland
Reagenz	Code/Katalog-Nr	Hersteller
Prep Kit 87 (28-8)	786-3043	Ventana -Roche, Mannheim, Deutschland
Reaction Buffer Concentrate (10x)	950-300	Ventana -Roche, Mannheim, Deutschland
ULTRA CC1	950-224	Ventana -Roche, Mannheim, Deutschland
ULTRA LCS	650-210	Ventana -Roche, Mannheim, Deutschland
Ultra View Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit	760-501	Ventana -Roche, Mannheim, Deutschland
Xylol	XTR-30000-97-2	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland

Tabelle 4: verwendete Reagenzien

Geräte, optische Geräte, Hilfsmittel	Firma
Deckgläschen	R. Langenbrink GmbH, Emmendingen, Deutschland
Einbettkassetten	Klinipath, Duiven, Niederlande
Färbvollautomat: Ventana BenchMark ULTRA	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Kamera: AxioCam MRc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop: Axioskop 40, Durchlichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Objektiv: A-Plan 5x/0,12	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Objektiv: A-Plan 10x/0,25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Objektiv: A-Plan 20x/0,45	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Objektträger: Super Frost Plus	R. Langenbrink GmbH, Emmendingen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotationsmikrotom: RM2035, Jung Supercut 2065	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Scanner: Supercoolscan ED 5000 Einsatz FH-G1	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Wasserbad: Medan	Medax GmbH & Co.KG, Kiel, Deutschland
Wärmeschrank: Köttermann 2737	Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland
Software, Services	Firma
SAP Dokumentationsprogramm der Uni Homburg	SAP, Heidelberg, Deutschland
Scan-Sevice für gefärbte Objektträger	Systemex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland
Software Case Viewer 3D Histech	Systemex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland
Software Excel Office 635	Microsoft, Washington, USA
Software Silverfast	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Software ZEN light blue	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Statistikprogramm IBM SPSS Statistics Version 25	IBM GmbH Stuttgart, Deutschland
TMA-Blöcke, Herstellungsservice	Multiblock GmbH, Hannover

Tabelle 5: verwendete Geräte, optische Geräte, Hilfsmittel, Software, Services

4. Ergebnisse

4.1. Auswertung der Schnitte und Fotodokumentation

Vor der Auswertung und der Interpretation der Ergebnisse wurden jeweils die positiven und die negativen Gewebekontrolle evaluiert. Die gefärbten positiven Kontrollen wurden nach dem Färbeprozess zuerst untersucht, wodurch gewährleistet werden konnte, dass alle Reagenzien ordnungsgemäß funktioniert hatten. Ein ordnungsgemäß gefärbtes Reaktionsprodukt in den Zielzellen war Anzeichen für eine positive Reaktionsfähigkeit.

4.1.1. Positivkontrolle

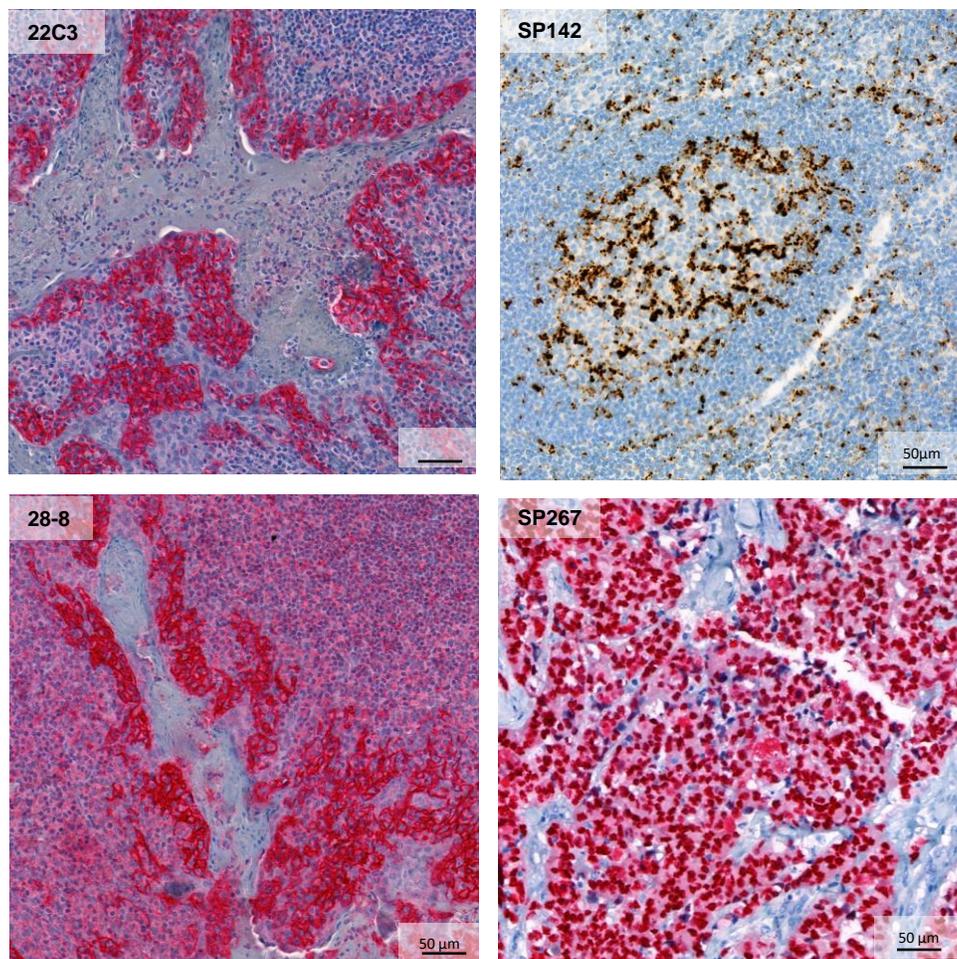


Abbildung 6: Positivkontrolle

Bei der Färbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 (Abb. 6) und Klon 28-8 (Abb. 6) zeigte das Tonsillengewebe im Bereich des Deckepithels kräftig rot gefärbte PD-L1 positive Zelltypen, und in den Follikeln schwach rot gefärbte positive Zellen. Beide Zellpopulationen waren PD-L1 positiv. Bei der Färbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 waren im Tonsillengewebe die PD-L1 positiven Makrophagen und Lymphozyten in den Keimzentren und im retikulierten Kryptenepithel deutlich als braune, teilweise zusammenhängende, teilweise diffuse Färbung erkennbar (SP142, Abb. 6). Bei der SOX10 Immunhistochemie zeigt die Färbung mit dem SOX10 Antikörper Klon SP267 in der Positivkontrolle (Probe F1) eine rote Färbung der Zellkerne (Abb. 6).

4.1.2. Negativkontrolle

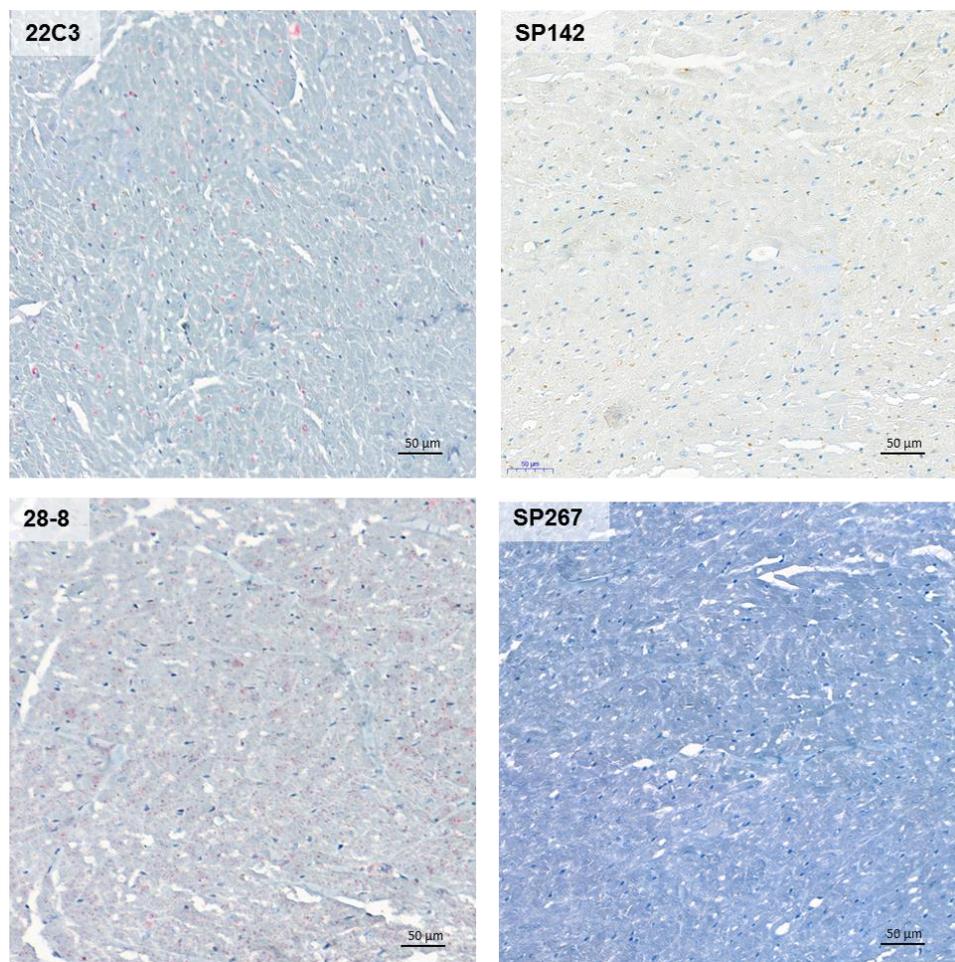


Abbildung 7: Negativkontrolle

In der Abbildung 7 sind die vier Negativkontrollen (Herzmuskelgewebe vom Hund) abgebildet. Bei der Färbung mit den Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3, Klon 28-8, Klon SP142 und dem SOX10 Antikörper Klon SP267 war wie zu erwarten keine Färbung zu sehen.

4.1.3. PD-L1 Färbungen der Tumorzellmembran mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3

Die Auswertung der Färbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 an der Tumorzellmembran (TC) der einzelnen Proben sind im Anhang in Tabelle 9, 10 und 11 festgehalten. Die Ergebnisse der cytoplasmatischen Färbung (Cyt) mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 sind im Anhang in Tabelle 15, 16 und 17 dokumentiert.

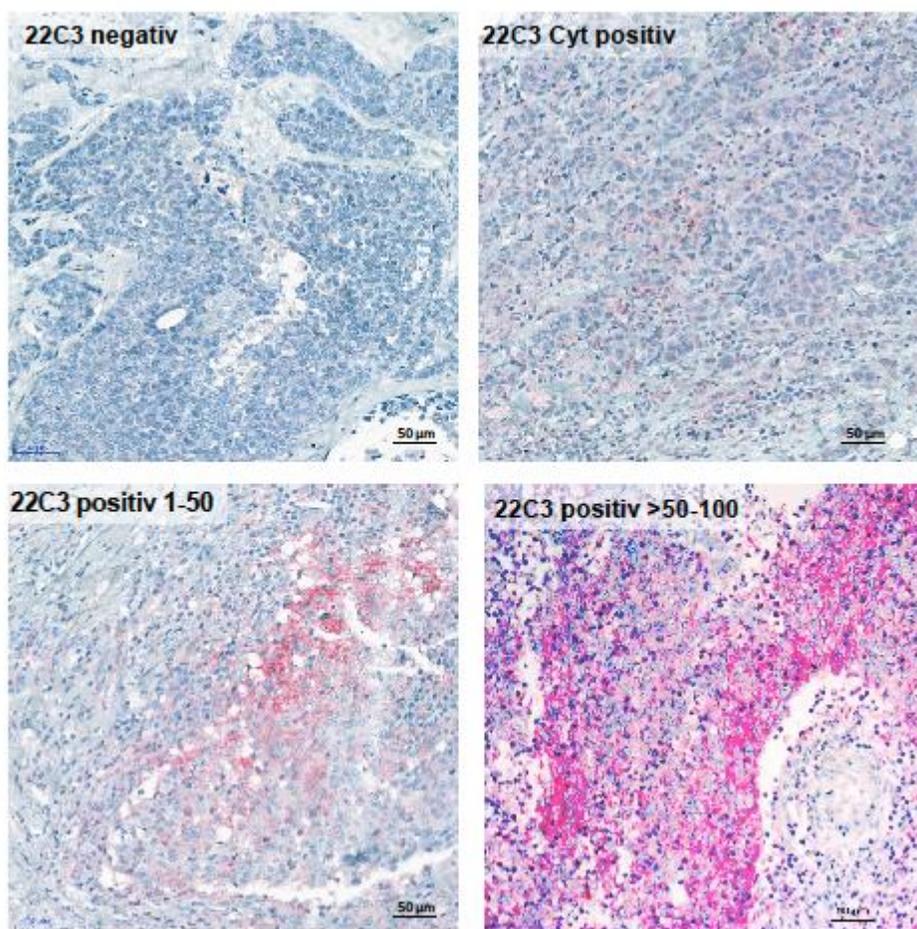


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung mit Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3

Bei der Färbung mit Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 wurde primär die rote membranöse Färbung der Tumorzellen ausgewertet. Es konnten verschiedene Expressionsmuster von PD-L1 beobachtet werden:

- Fehlen einer Anfärbung (22C3 negativ Abb. 8)
- vereinzelt schwach positive Färbung der Tumorzellmembran (22C3 positiv 1-50% Abb. 8)
- durchgehend starke Färbung der Tumorzellmembran (22C3 positiv >50-100% Abb. 8) nahezu aller Tumorzellen

Die Intensität und das Ausmaß der Membranfärbung (vollständig/unvollständig) spielten bei der Auswertung keine Rolle.

Sekundär wurde die schwach rote cytoplasmatische Färbung der Tumorzellen ausgewertet (22C3 Cyt positiv Abb. 8).

4.1.4. PD-L1 Färbungen der Tumorzellmembran mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 28-8

Die Auswertung der einzelnen Proben im TMA Block bei der Färbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 28-8 an der Tumorzellmembran (TC), sind im Anhang in Tabelle 12, 13 und 14 festgehalten. Die Ergebnisse der cytoplasmatischen Färbung (Cyt) gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22-8 sind in Tabelle 18, 19 und 20 dokumentiert.

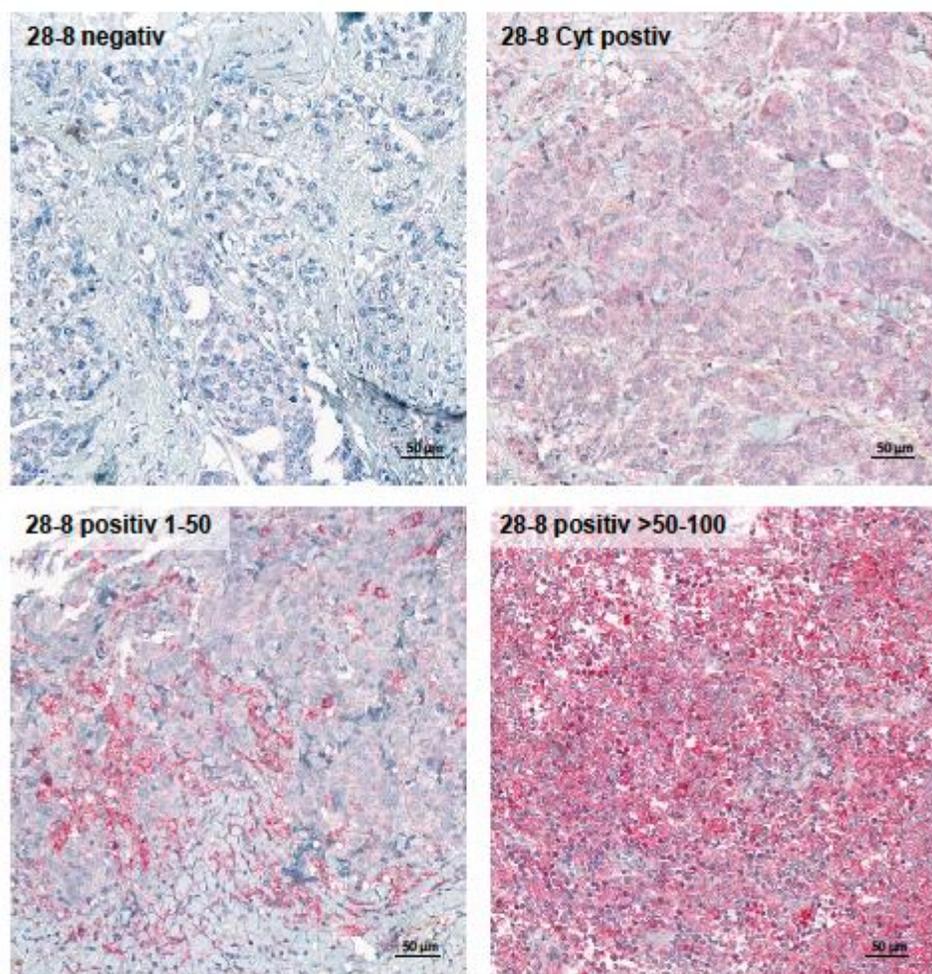


Abbildung 9: Immunhistochemische PD-L1 Färbung mit Anti-PD-L1 Antikörper Klon 28-8

Bei der Färbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 28-8 wurde auch primär die rote Färbung der Tumorzellmembran ausgewertet. Wie bei der Färbung mit dem Anti-PD-L1

Antikörper Klon 22C3 konnten auch hier wieder verschiedene Expressionsmuster von PD-L1 beobachtet werden:

- keiner Färbung (22-8 negativ Abb. 9)
- vereinzelt schwach positive Färbung der Tumorzellmembran (22-8 positiv 1-50 Abb. 9)
- durchgehend starken Färbung der Tumorzellmembran (22-8 positiv >50-100 Abb. 9) nahezu aller Tumorzellen

Die Intensität und das Ausmaß der Membranfärbung (vollständig/unvollständig) spielten bei der Auswertung auch hier keine Rolle, wobei zu erwähnen ist, dass die Färbung mit dem Klon 28-8 stärker und intensiver war als die Färbung mit dem Klon 22C3.

Sekundär wurde auch hier die rote cytoplasmatische Färbung der Tumorzellen ausgewertet (22-8 Cyt positiv Abb. 9).

4.1.5. PD-L1-Färbung der Immunzellen mit Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142

Die Auswertung der einzelnen Proben im TMA Block, bei der Färbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper SP142, sind im Anhang in Tabelle 21, 22 und 23 dokumentiert.

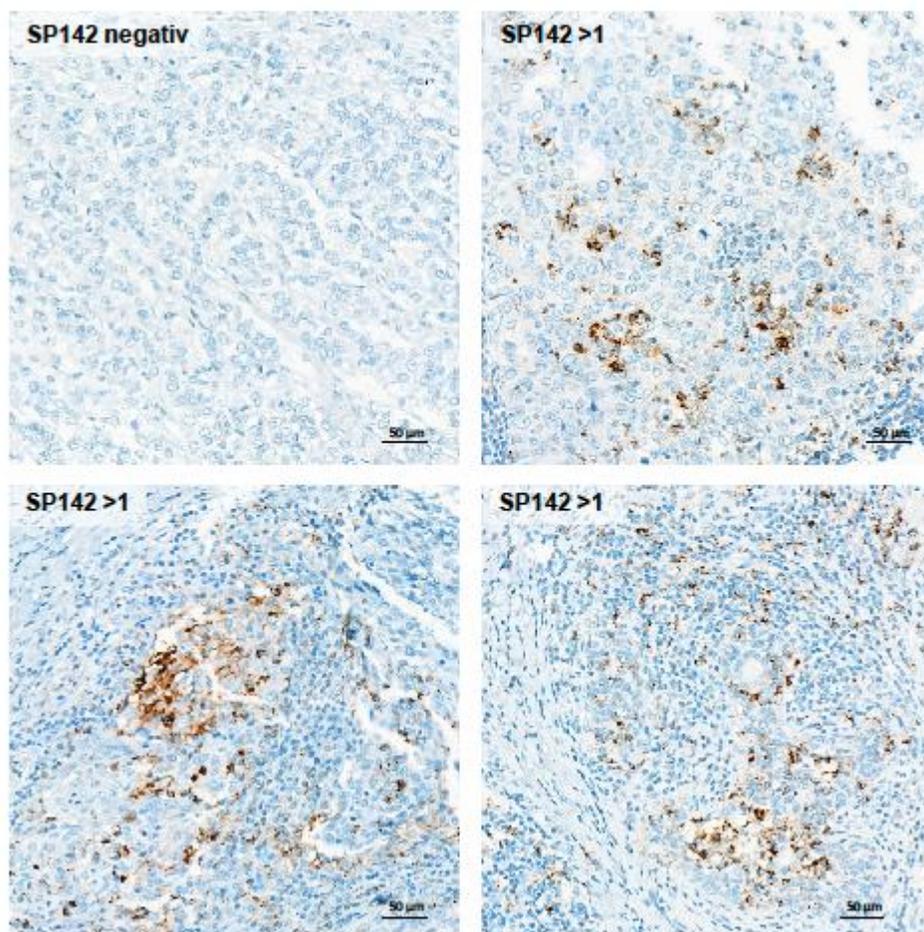


Abbildung 10: Immunhistochemische PD-L1 Färbung mit Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142

Bei dieser Färbung gab es Proben, die keine Färbung der Immunzellen zeigten (SP142 negativ Abb10). Andere Proben bei der Färbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 zeigten eine heterogene Population an Immunzellen, wobei der Großteil dieser Zellen morphologisch mit Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten übereinstimmte. Es waren vereinzelt braun gefärbte Immunzellen, braune

zusammenhängende Immzellaggregate und punktuelle Immzellfärbungen im intratumoralen Stroma zu sehen (SP142 >1% Abb. 10). Alle Proben mit einer PD-L1 Expression $\geq 1\%$ wurden positiv gewertet.

4.1.6. SOX10 Färbung mit dem Antikörper Klon SP267

Die Ergebnisse der einzelnen Proben im TMA Block bei der Färbung mit dem SOX10 Antikörper Klon SP267 sind im Anhang in Tabelle 24, 25 und 26 dokumentiert.

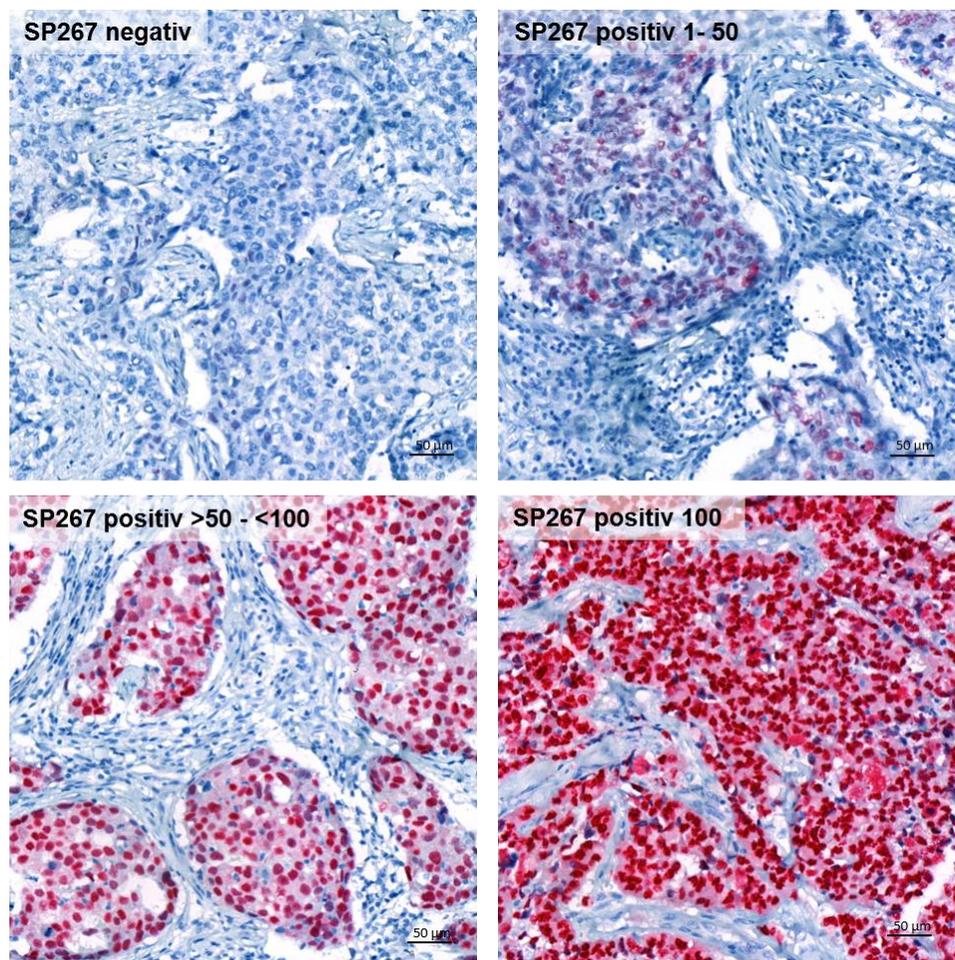


Abbildung 11: Immunhistochemische SOX10 Färbung mit SOX10 Antikörper Klon SP267

Bei der Färbung von SOX10 mit dem SOX10 Antikörper Klon SP267 wurde die rote Färbung der Zellkerne in den Tumorzellen ausgewertet (Abb. 11). Hier wurde die Färbung nach dem vom Institut für Pathologie festgelegten Score 0% (Abb. 11), 1 bis 50% (Abb. 11), > 50 bis 100% (Abb. 11) und 100% (Abb. 11) ausgewertet. Die Intensität der Färbung spielte bei dieser Auswertung keine Rolle.

Tumoranteils in den Gewebeproben

Bei der Untersuchung des Tumoranteils in den Gewebeproben auf den Multiblock-Schnitten wurde festgestellt, dass an einigen Positionen weniger als 100 Tumorzellen vorhanden waren. Diese Positionen wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt und mit nicht auswertbar (na) gekennzeichnet. Bei einer Patientin mit der Nummer 47 (Position M4, N4, O4) konnten in den drei Stenzen in der Summe keine 100 vitalen Tumorzellen gefunden werden, somit wurde diese Patientin für die gesamte Auswertung nicht berücksichtigt. Bei allen Färbungen in dieser Arbeit wurden somit nur 59 Patientinnen ausgewertet.

4.2. Klinische Daten der Patientinnen

In dieser Auswertung wurden alle 60 triplenegativen Patientinnen berücksichtigt. Der Ki67 Wert konnte nur von 49 Patientinnen ermittelt werden, da nicht bei allen Patientinnen dieser Proliferationsindex bestimmt wurde, bzw. weil dieser Wert nicht im SAP dokumentiert war. Folgende Daten wurden erhoben, ausgewertet und in Tabelle 6 eingetragen: Die zur Verfügung stehenden Patientinnencharakteristika, Tumormerkmale und klinischen Daten wurden aufgelistet und deren Häufigkeit numerisch und prozentual angegeben. Vom Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose und Follow-up wurden jeweils die Mittelwerte bzw. die Standardabweichungen errechnet.

- Patientinnen-Nummer
- Histo-Nummer
- Diagnosedatum
- Alter bei Erkrankung
- Art der Operation
- Histologischer Typ
- Her2 (neu) Status (0,1,2)
- Ki67
- Tumorstadium
- Grading
- Nodalstatus
- Metastasen (ja/nein)
- Rezidiv (ja/nein)
- Diagnosedatum eines Zweitkarzinoms
- Diagnosedatum einer späteren Metastasierung
- Tod
- Todesursache
- Letzte Untersuchung im SAP (Follow-up Klinik)

Patientinnencharakteristik/Tumormerkmal	n (%) (n = 60 Patientinnen)
Tumorstadium	
T1	31 (51,7 %)
T2	24 (40,0 %)
T3	3 (5,0 %)
T4	2 (3,3 %)
Tx	0 (0 %)
Grading	
G1	1 (1,6 %)
G2	19 (31,7 %)
G3	39 (65,0 %)
unbekannt	1 (1,6 %)
Nodalstatus	
N0	44 (73,3 %)
N1	10 (16,7 %)
N2	3 (5,0 %)
N3	3 (5,9 %)
unbekannt	0 (0 %)
Metastasen bei Erstdiagnose	
M0	60 (100 %)
M1	0 (0 %)
Rezidiv	
Ja	8 (13,3 %)
Nein	52 (86,7 %)
Spätere Metastasierung	
Ja	14 (23,3 %)
Nein	46 (76,7 %)
Überleben (Tod durch Erkrankung)	
Ja	44 (73,3 %)
Nein	16 (26,7 %)
Her2(neu) Score 0,1,2	
0	31 (51,7 %)
1	27 (45,0 %)
2	2 (3,3 %)

Durchschnittsalter bei Erstdiagnose	56,4 +/- 13.3 Jahre
Follow up	74,8 +/- 34,9 Monate
Tumormerkmal	n (%) (n = 59 Patientinnen)
PD-L1 (TC)	
0	46 (78,0 %)
1 bis <50	12 (20,3 %)
≥ 50 bis 100	1 (1,7 %)
PD-L1 (IC)	
0	35 (59,3 %)
≥1	24 (40,7 %)
PD-L1 (Cyt)	
negativ	35 (59,3 %)
positiv	24 (40,7 %)
SOX10	
0	14 (23,7 %)
≥1 bis < 50	5 (8,5 %)
≥ 50 bis <100	26 (44,1 %)
100	14 (23,7 %)

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Patientinnencharakteristika, deren Tumormerkmale und der vorhandenen klinischen Daten (numerische und prozentuale Angaben)

4.3. Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Vergleich der Tumorzellmembranfärbung (TC) mit den Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 und Klon 28-8

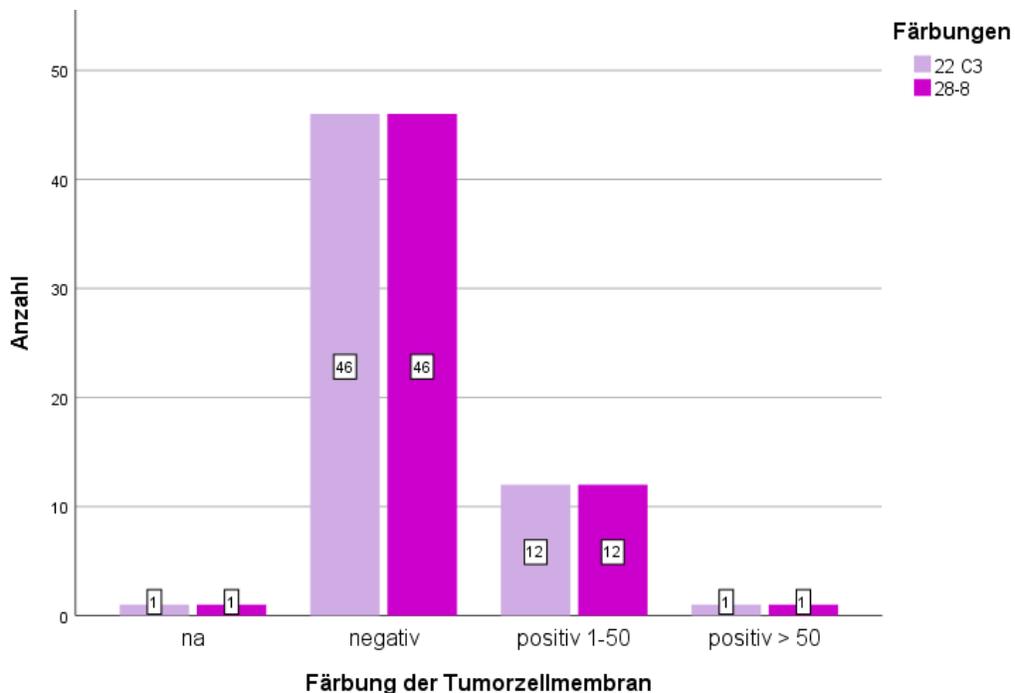


Abbildung 12: PD-L1 Färbungen an der Tumorzellmembran (TC) mit den Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 und Klon 28-8

In Abbildung 12 wird gezeigt, dass bei beiden Färbungen, einmal gefärbt mit Klon 22C3 und zum anderen gefärbt mit Klon 28-8, die gleichen Patientinnen PD-L1 positive bzw. PD-L1 negative Ergebnisse zeigen. Von 60 untersuchten Patientinnen konnte eine Patientin nicht ausgewertet werden, weil weniger als 100 vitale Tumorzellen vorhanden waren. 46 Patientinnen (78%) waren bei beiden Färbungen PD-L1 negativ und 13 Patientinnen (22%) waren PD-L1 positiv. Von den PD-L1 positiven Patientinnen zeigten 12 Patientinnen (20,3%) eine PD-L1 Expression von 1% bis 50% und 1 Patientin (1,7%) zeigte eine starke PD-L1 Expression von >50% bis 100%.

Vergleich der cytoplasmatischen Färbung (Cyt) mit den beiden Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 bzw. Klon 28-8

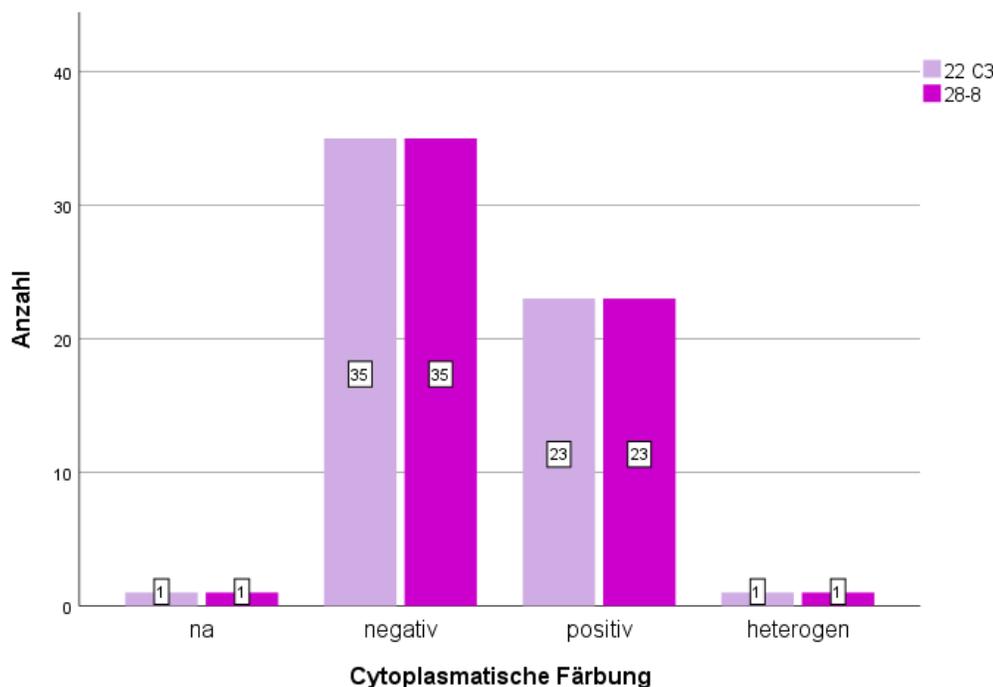


Abbildung 13: Cytoplasmatische Färbung (Cyt) mit den beiden Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 und Klon 28-8

In Abbildung 13 ist zu sehen, dass die Ergebnisse der cytoplasmatische Färbung bei der immunhistochemischen Färbung mit den beiden Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 und Klon 28-8 vergleichbar sind. Bei jeder Färbung waren 35 Patientinnen (59,3%) PD-L1-negativ, 23 Patientinnen (39%) zeigten in beiden Färbungen eine rote Färbung im Cytoplasma. Bei einer Patientin (1,7%) waren bei beiden Färbungen die Einzelstanzen heterogen, d.h. in den drei nebeneinander liegenden Stanzen auf dem Objektträger waren unterschiedliche Ergebnisse zu sehen. Eine Patientin war nicht auswertbar.

Vergleich der Tumorzellmembranfärbung (TC) und der cytoplasmatischen Färbung (Cyt) gefärbt mit den Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 bzw. Klon 28-8

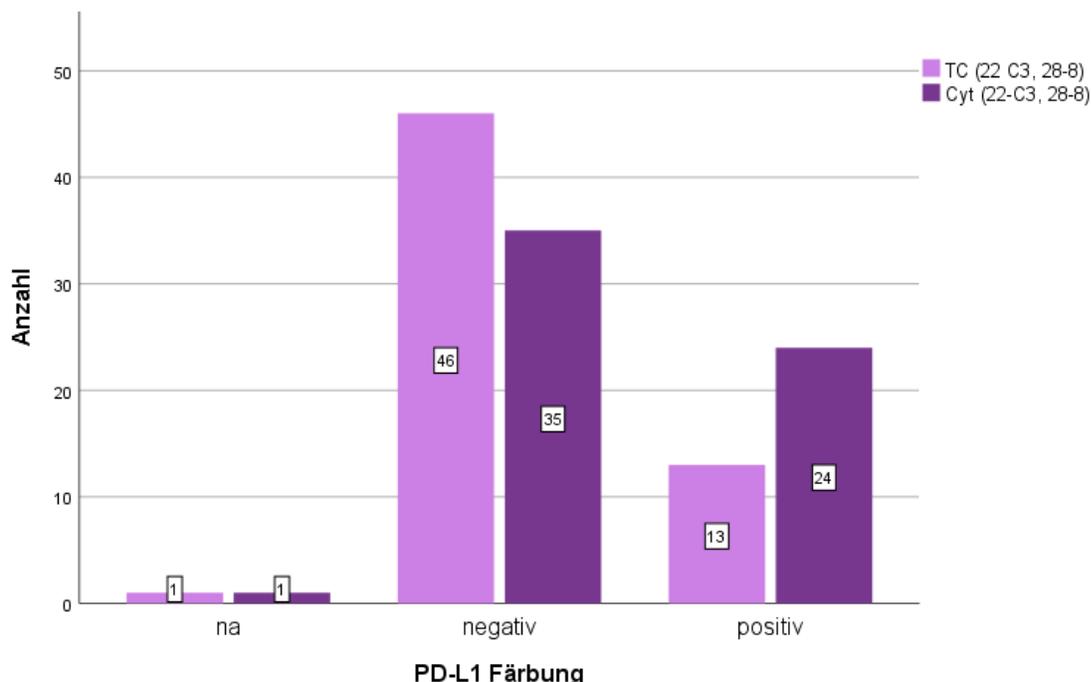


Abbildung 14: PD-L1 Färbung der Tumorzellmembran (TC) und cytoplasmatische Färbung (Cyt) gefärbt mit den beiden Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 bzw Klon 28-8

In Abbildung 14 ist zu sehen, dass bei 46 Patientinnen (78%) keine PD-L1 Expression an der Tumorzelle (TC) nachgewiesen werden konnte, und dass 13 der untersuchten triple negativen Patientinnen (22%) PD-L1 an der Tumorzelle exprimierten. 35 Patientinnen (59,3%) zeigten keine cytoplasmatische Färbung (Cyt). Bei 24 Patientinnen (40,7%) war eine cytoplasmatische Färbung zu sehen. Zu erwähnen ist, dass die Patientin, bei der die Einzelstanzen heterogen waren für diese Analyse positiv gewertet wurde, da die prozentuale Verteilung (bezogen auf 100 vitale Tumorzellen) in der gesamten Tumormasse der 3 Einzelstanzen positiv war. Insgesamt konnte bei 11 Patientinnen (18,6%) zusätzlich zur Tumorzellmembranfärbung (TC) eine cytoplasmatische Färbung (Cyt) erkannt werden. Nach statistischer Auswertung mit dem McNemar-Test ist der Unterschied mit einem p-Wert von 0,001 hochsignifikant.

Vergleich der Tumorzellmembranfärbung (TC) mit den beiden Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 bzw Klon 28-8 und der Immunzellfärbung (IC) mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142

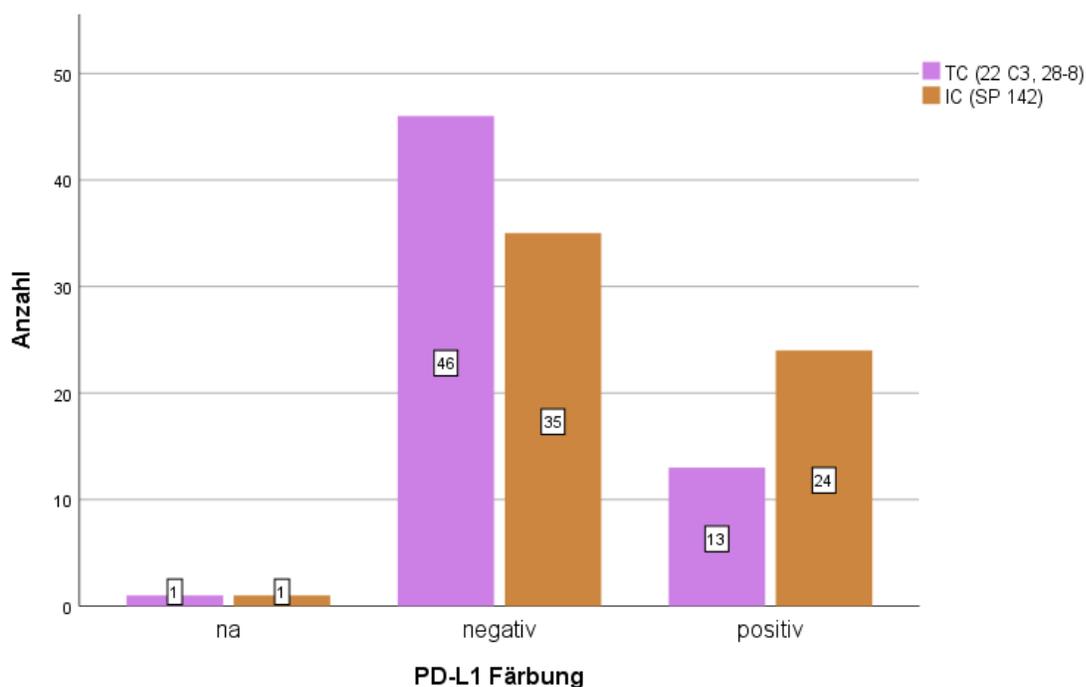


Abbildung 15: PD-L1 Färbung der Tumorzellmembran, gefärbt mit den Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 und Klon 28-8 und Immunzellfärbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142

In Abbildung 15 ist zu sehen, dass bei 13 Patientinnen (22%) eine Expression von PD-L1 an der Tumorzellmembran (TC) zu sehen war. Bei 46 Patientinnen (78%) war keine PD-L1 Expression zu sehen. Bei der Färbung der Immunzellen (IC) konnte bei 24 Patientinnen (40,7%) eine braune Färbung nachgewiesen werden, und bei 35 Patientinnen (59,3%) konnte keine PD-L1 Expression nachgewiesen werden. Eine Patientin war nicht auswertbar. Der Unterschied der PD-L1 Expression zwischen der Färbung von PD-L1 auf den Immunzellen und der Färbung von PD-L1 auf den Tumorzellen ist laut McNemar-Test mit einem p-Wert von 0,001 hochsignifikant. Bei der Auswertung wurde die Patientin, bei der die Einzelstanzen heterogen waren zur Analyse als PD-L1 positiv gewertet, da die prozentuale Verteilung (bezogen auf 100 vitale Tumorzellen) in der gesamten Tumormasse positiv war.

Vergleich der Immunzellfärbung (IC) mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 und der cytoplasmatischen Färbung (Cyt) gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 bzw. Klon 28-8

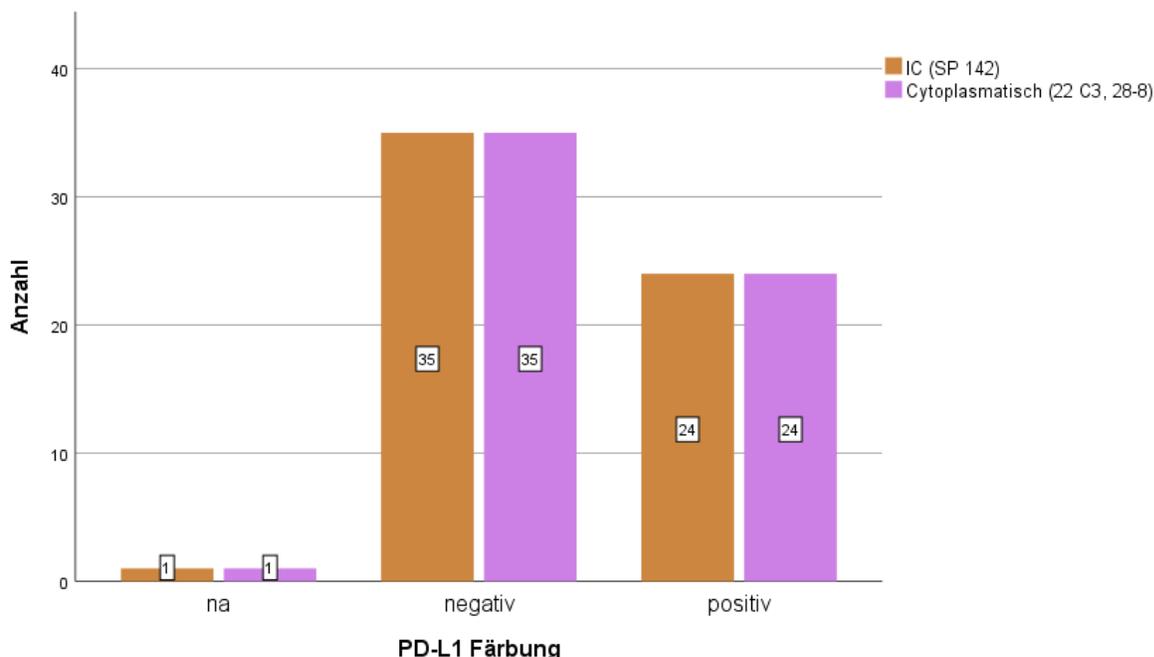


Abbildung 16: Vergleich der Immunzellfärbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 und der cytoplasmatischen Färbung, gefärbt mit den Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 bzw. Klon 28-8

Die 24 Patientinnen (40,7%) die eine cytoplasmatische Färbung (Cyt) bei der Färbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 bzw Klon 28-8 aufwiesen, zeigten auch eine positive Immunzellfärbung (IC) mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142. Bei beiden Färbungen waren 35 Patientinnen (59,3%) PD-L1 negativ. Eine Patientin war bei beiden Färbungen nicht auswertbar (siehe Abbildung 16). Bei der Auswertung wurden die Patientin, die in den Einzelstanzen heterogen waren zur Analyse positiv gewertet, wenn die prozentuale Verteilung (bezogen auf 100 vitale Tumorzellen) in der gesamten Tumormasse positiv war. War die prozentuale Verteilung negativ, wurde die Patientin negativ gewertet. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte in dieser Arbeit eine Übereinstimmung der cytoplasmatischen Färbung mit Klon 22C3 und 28-8 und der PD-L1 Expression auf den Immunzellen mit Klon SP142 gezeigt werden.

4.4. Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen im Bezug zu den vorhandenen klinischen Daten der Patientinnen

PD-L1-Status an der Tumorzellmembran in Korrelation mit den klinischen Daten

PD-L1 (TC) mit Überleben

Hier ist keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,721. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 27 zu entnehmen.

PD-L1 (TC) mit späterer Metastasierung

Hier ist keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 1,00. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 28 zu entnehmen.

PD-L1 (TC) mit Rezidiv

Hier ist keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 1,00. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 29 zu entnehmen.

PD-L1 (TC) mit Tumorstatus

Hier ist keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 1,000. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 30 zu entnehmen.

PD-L1 (TC) mit Nodalstatus

Hier ist keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,513. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 31 zu entnehmen.

PD-L1 (TC) mit Grading

Hier ist keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,630. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 32 zu entnehmen.

PD-L1 (TC) mit Her2(neu) Status Score 0,1,2

Hier ist keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,851. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 33 zu entnehmen.

PD-L1 (TC) mit Ki67

Die Ki67 Werte der untersuchten Patientinnen wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Dieser zeigte, dass Ki67 bei den untersuchten Patientinnen nicht normal verteilt ist. Deshalb wurde der Mann-Whitney-U-Test für den Gruppenvergleich durchgeführt.

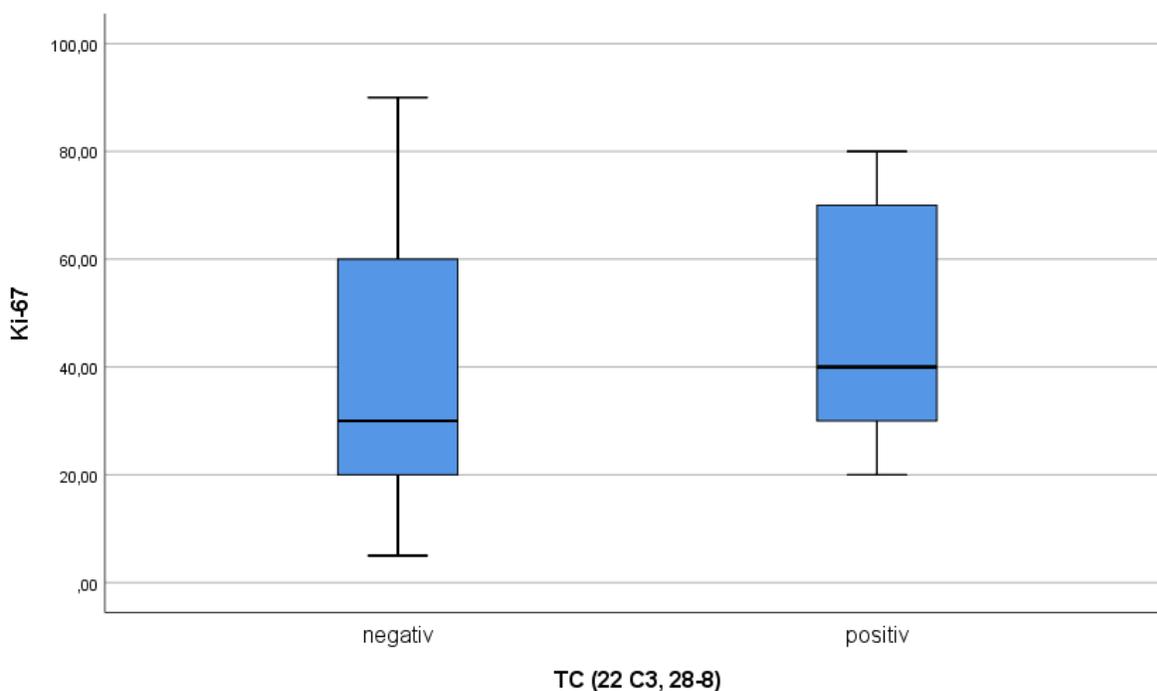


Abbildung 17: Das Boxplot-Diagramm zeigt den Vergleich der PD-L1-Expression an der Tumorzellmembran (TC) gefärbt mit Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 bzw. Klon 28-8 und Ki67 (n = 50)

Im Boxplot (Abb. 17) ist zu sehen, dass bei den PD-L1 (TC) negativen Patientinnen der Ki67 Wert niedriger (unter 30) liegt als bei den positiv gefärbten Patientinnen. Laut Mann-Whitney-U-Test ist der p-Wert mit 0,05 signifikant. Somit konnte ein signifikanter Unterschied der Ki67 Werte zwischen den PD-L1 (TC) negativen und positiven Patientinnen (n=49), gefärbt mit 22C3 bzw. 28-8, festgestellt werden.

PD-L1 Status auf den Immunzellen in Korrelation mit den klinischen Daten

PD-L1 (IC) mit Überleben

Hier ist keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,767. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 34 zu entnehmen.

PD-L1 (IC) mit späterer Metastasierung

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 1,000. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 35 zu entnehmen.

PD-L1 (IC) mit Rezidiv

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 1,000. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 36 zu entnehmen.

PD-L1 (IC) mit Tumorstatus

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,781. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 37 zu entnehmen.

PD-L1 (IC) mit Nodalstatus

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,863. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 38 zu entnehmen.

PD-L1 (IC) mit Grading

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,742. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 39 zu entnehmen.

PD-L1 (IC) mit Her2(neu) Status Score 0,1,2

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,288. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 40 zu entnehmen.

PD-L1 (IC) mit Ki67

Auch hier wurde der Mann-Whitney-U-Test für den Gruppenvergleich durchgeführt, da Ki67 bei den untersuchten Patientinnen nicht normal verteilt war.

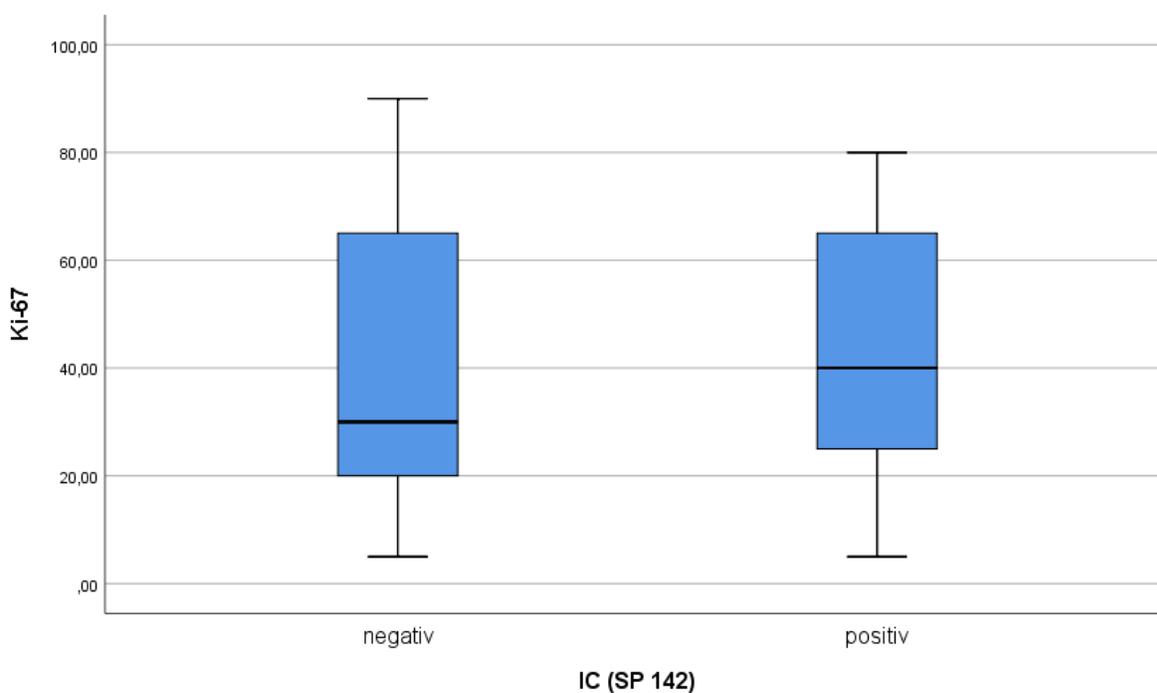


Abbildung 18: Das Boxplot-Diagramm zeigt den Vergleich der PD-L1 Expression auf den Immunzellen gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 und Ki67 (n = 49)

In der Abbildung 18 ist zu sehen, dass die PD-L1 (IC) negativen Patientinnen niedrigere Ki67 Werte hatten als die PD-L1 (IC) positiv gefärbten Patientinnen. Laut Mann-Whitney-U-Test ist der p-Wert 0,566. Somit gab es keine Korrelation zwischen der Ki67 Werte und dem PD-L1 (IC) Status, gefärbt mit SP142 (n=49).

SOX10 Expression in Korrelation mit den klinischen Daten

SOX10 mit Überleben

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,617. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 41 zu entnehmen.

SOX10 mit späterer Metastasierung

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,194. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 42 zu entnehmen.

SOX10 mit Rezidiv

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,573. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 43 zu entnehmen.

SOX10 mit Tumorstatus

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,509. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 44 zu entnehmen.

SOX10 mit Nodalstatus

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,724. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 45 zu entnehmen.

SOX10 mit Grading

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,949. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 46 zu entnehmen.

SOX10 mit Her2(neu) Status Score 0,1,2

Hier war keine Signifikanz erkennbar. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,683. Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind im Anhang der Tabelle 47 zu entnehmen.

SOX10 mit Ki67

Da die Daten nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test auch hier nicht normal verteilt waren, und mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet.

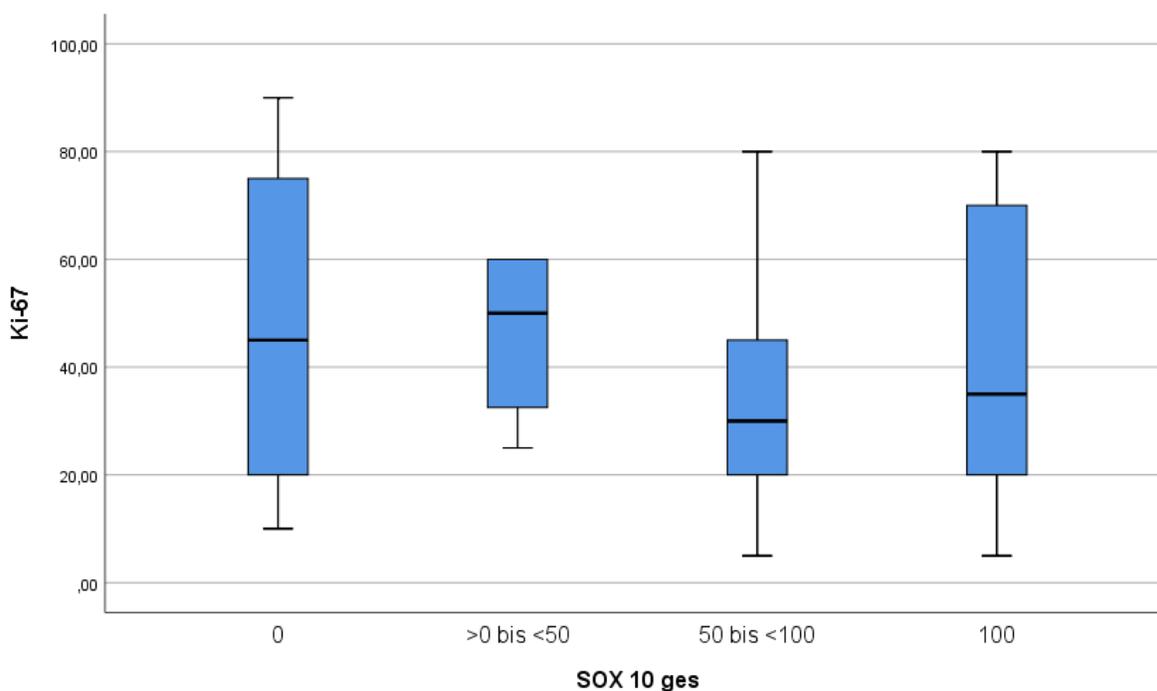


Abbildung 19: Das Boxplot-Diagramm zeigt den Zusammenhang zwischen der SOX10 Expression und Ki67 (n = 49)

Im Boxplot-Diagramm (Abb. 19) war zu sehen, dass Patientinnen die eine SOX10 Expression über 50% hatten (67,8% der Patientinnen) tendenziell einen niedrigeren Ki67 Wert unter 40 aufwiesen. Die Patientinnen, die weniger als 50% SOX10 exprimierten (32,2% aller Patientinnen), zeigten Ki67 Werte über 40. Nach dem Kruskal-Wallis-Test ist dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0,750 nicht signifikant (n = 49).

SOX10 Expression in Korrelation mit der PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran

Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind in der Kreuztabelle (Tabelle 7) dokumentiert. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test ist 0,998. Somit gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der PD-L1 Expression auf den Tumorzellen (TC), gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 bzw Klon 28-8 und der SOX10 Expression bei den untersuchten triple negativen Patientinnen.

			TC (22 C3, 28-8)		Gesamt
			negativ	positiv	
SOX 10	0	Anzahl	11	3	14
		% innerhalb von SOX 10	78,6%	21,4%	100,0%
	>0 bis <50	Anzahl	4	1	5
		% innerhalb von SOX 10	80,0%	20,0%	100,0%
	50 bis <100	Anzahl	20	6	26
		% innerhalb von SOX 10	76,9%	23,1%	100,0%
	100	Anzahl	11	3	14
		% innerhalb von SOX 10	78,6%	21,4%	100,0%
	Gesamt	Anzahl	46	13	59
		% innerhalb von SOX 10	78,0%	22,0%	100,0%

Tabelle 7: Vergleich PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran (TC) und SOX10 Expression bei den untersuchten triple negativen Patientinnen (n=59)

SOX10 Expression in Korrelation mit der PD-L1 Expression auf den Immunzellen

Die Ergebnisse der 59 auswertbaren Patientinnen sind der Kreuztabelle (Tabelle 8) zu entnehmen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Der exakte zweiseitige p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test war 0,498. Erkennbar war eine Tendenz, dass Patientinnen mit einer hohen SOX10 Expression eher PD-L1 positiv waren. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Bei den Patientinnen die 0% SOX10 exprimierten, waren 28,6% PD-L1 positiv im Vergleich zu den Patientinnen die >0% <100% exprimierten mit ca. 40%, und den Patientinnen mit einer SOX10 Expression von 100% mit 57,1%.

		IC (SP 142)		Gesamt	
		negativ	positiv		
SOX 10	0	Anzahl	10	4	14
		% innerhalb von SOX 10	71,4%	28,6%	100,0%
	>0 bis <50	Anzahl	3	2	5
		% innerhalb von SOX 10	60,0%	40,0%	100,0%
	50 bis <100	Anzahl	16	10	26
		% innerhalb von SOX 10	61,5%	38,5%	100,0%
	100	Anzahl	6	8	14
		% innerhalb von SOX 10	42,9%	57,1%	100,0%
Gesamt		Anzahl	35	24	59
		% innerhalb von SOX 10	59,3%	40,7%	100,0%

Tabelle 8: Vergleich PD-L1 Expression auf den Immunzellen (IC) und SOX10 Expression bei den untersuchten triple negativen Patientinnen (n=59)

5. Diskussion

Mit vielen neuen Medikamenten bei verschiedenen Tumoren kamen in den letzten Jahren eine Vielzahl von verschiedenen diagnostischen Antikörpern auf den Markt. Im Rahmen von Studien wurde immunhistochemisch die Expression von PD-L1 an unterschiedlichen Tumoren mit verschiedenen Methoden untersucht. Es wurde festgestellt, dass für jede Substanz der prädiktive Wert des PD-L1 Status für ein Therapieansprechen gesondert betrachtet werden muss [71]. Im Rahmen der Diagnostik ist es bei einigen Tumoren in der Zwischenzeit notwendig geworden, die Bestimmung von PD-L1 anzufordern. Der immunhistochemische Nachweis der PD-L1 Expression ist beim NSCLC in der Zwischenzeit ein aussagekräftiger, etablierter Test zur Einschätzung der Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens eines NSCLC-Patienten auf eine bestimmte Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren geworden, besonders bei Patienten mit hoher PD-L1 Expression [72]. Am Tumorgewebe ist die PD-L1 Immunhistochemie beim NSCLC obligat („companion diagnostic“). Beim metastasierten triple negativen Mammakarzinom findet die Immuntherapie in der Zwischenzeit ebenfalls eine Bedeutung, jedoch ist die Diagnostik von PD-L1 beim TNBC noch nicht ausreichend untersucht. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit verschiedene Fragestellungen zur Diagnostik von PD-L1 beim TNBC beantwortet.

Vergleich der Tumorzellmembranfärbung gefärbt mit Klon 22C3 und Klon 28-8

Es konnte gezeigt werden, dass die bei der immunhistochemischen PD-L1 Färbung verwendeten Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 und Klon 28-8, unter Verwendung des Detektion-Kits ultraView Alkaline Phosphatase Red, beim triple negativen Mammakarzinom zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Übereinstimmende Erkenntnisse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen, jedoch bei anderen Tumorentitäten gezeigt. So wurde an Präparaten von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen in der deutschen Harmonisierungsstudie [51] gezeigt, dass die Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 und Klon 28-8 vergleichbare Ergebnisse liefern, der Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 dagegen zeigte abweichende Ergebnisse. In der internationalen Blueprint-Studie [73], wurde beim NSCLC ebenfalls eine

Übereinstimmung der Färbeergebnisse mit den Antikörper-Klonen 22C3 und 28-8 erreicht, während der Klon SP142 auch hier divergierende Ergebnisse zeigte. Das Ergebnis dieser Arbeit, dass die Verwendung der Klone 28-8 und 22C3 beim TNBC zum gleichen Ergebnis führten, können zum heutigen Zeitpunkt beim NSCLC bestätigt werden.

Vergleich Immunzellfärbung gefärbt mit Klon SP142 und der Tumorzellmembranfärbung gefärbt mit Klon 22C3 und Klon 28-8

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 signifikant mehr PD-L1 positive Patientinnen diagnostiziert werden, als mit den beiden Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 und Klon 28-8. Dabei ist es wichtig zu wissen, dass mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 in erster Linie die PD-L1 positiven Immunzellen gefärbt werden. Die beiden Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 und 28-8 färben die PD-L1-Expression an der Tumorzellmembran. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich beim triple negativen Mammakarzinom der prädiktive Wert zwischen der membranösen PD-L1 Färbung an der Tumorzelle (TC) und der PD-L1 Färbung an den Immunzellen (IC) unterscheidet. In einer Phase III Studie beim metastasierten TNBC (Impassion 130) wurde gezeigt, dass die Patientinnen mit einem PD-L1 Status ≥ 1 % (IC) von der Therapie mit dem Checkpointinhibitor Atezolizumab und nab-Paclitaxel profitieren. Als Antikörper für die PD-L1 Bestimmung wurde in dieser Studie der Klon SP142 verwendet der die PD-L1 Expression auf den Immunzellen bestimmt [41].

Da in unserer Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Testverfahren mit Klon 22C3 und Klon 28-8 (TC) unterschiedliche Ergebnisse zum Klon SP142 (IC) bringen, sollte zukünftig bei der Diagnostik der triple negativen Patientinnen bedacht werden, den in der Studie verwendeten Klon zur PD-L1 Bestimmung einzusetzen. Bislang ist die Diagnostik der positiven Immunzellen (IC) im Tumorgewebe noch bei keiner Medikamentenzulassung beim TNBC in Deutschland relevant. In USA wird bereits auf die PD-L1 Bestimmung mit dem Klon SP142 beim Einsatz von Atezolizumab beim metastasierten triple negativen Mammakarzinom seit der FDA-Zulassung hingewiesen [41]. Wie erwähnt, beschränken sich die Ergebnisse der Impassion 130 Studie beim triple negativen Mammakarzinom auf die PD-L1 Testung der Immunzellen (IC) mit dem Klon SP142. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die PD-L1 Expression auf den TIL's, die ≥ 1 % der Tumorfläche

bedecken, entscheidend für die Wirkung von Atezolizumab sind, d.h. sie sind prädiktiv für die Wirkung von Atezolizumab beim triple negativen Mammakarzinom [70]. Somit profitieren die metastasierten, triple negativen, PD-L1 positiven Patientinnen signifikant von der Therapie mit dem Checkpoint-Inhibitor Atezolizumab und nab-Paclitaxel. Diese Zulassungsstudie konnte eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens von 5 versus 7,5 Monate (HR 0.62, $p < 0,0001$) und eine Verbesserung im Gesamtüberleben von 15,5 vs. 25 Monate gezeigt werden. Die membranöse Färbung der Tumorzellen (TC) war in dieser Studie für den Einsatz von Atezolizumab und nab-Paclitaxel nicht relevant [70]. Zukünftig wird es wahrscheinlich auch in Deutschland beim Mammakarzinom notwendig sein, den prädiktiven Biomarker PD-L1 auf den Immunzellen zu bestimmen, wenn man die Checkpointinhibitor Atezolizumab einsetzen möchte.

Mit neuen Medikamenten ist es in der modernen Medizin in der Zwischenzeit erforderlich, auch den entsprechenden diagnostischen Test festzulegen. Es ist bei einigen Therapien notwendig zu prüfen, ob die PD-L1 Expression auf den Tumorzellen oder auf den Immunzellen oder auf beiden entscheidend für den Einsatz des entsprechenden Immuncheckpointinhibitors ist. Zurzeit häufen sich auch bei anderen Tumoren in klinischen Studien die Hinweise dafür, dass die PD-L1 positiven Immunzellen (der Flächenanteil des Tumors, der von PD-L1-positiven Immunzellen bedeckt wird) einen prädiktiven Wert besitzen. Auch beim Urothelkarzinom soll dieser Wert der PD-L1 positiven Immunzellen den prädiktiven Wert der PD-L1 positiven Tumorzellen übersteigen [74].

Cytoplasmatische Färbung gefärbt mit Klon 22C3 und 28-8 und Vergleich der Ergebnisse mit den Färbungen der Tumorzellmembran und der Immunzellen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob die cytoplasmatische Färbung beim triple negativen Mammakarzinom auswertbar und relevant ist. Deshalb wurde bei der PD-L1 immunhistochemischen Färbung mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 und Klon 28-8, neben der Tumorzellmembranfärbung die cytoplasmatische Färbung ausgewertet. In der deutschen Harmonisierungsstudie [51] wurde die cytoplasmatische Färbung beim NSCLC nicht berücksichtigt. Damals gab es in klinischen Studien beim NSCLC keine Hinweise, dass die cytoplasmatische Färbung und die Färbung der Immunzellen einen prädiktiven Wert haben könnten [75]. Im Vergleich zu anderen

Arbeiten wurde in dieser Arbeit ultraView Alkaline Phosphatase Red als Detektionskit verwendet, welches im Labor des Institutes für Allgemeine und spezielle Pathologie der medizinischen Fakultät des Saarlandes in der Routine für die PD-L1 Bestimmung eingesetzt wird. Es konnte vereinzelt eine rote Färbung im Cytoplasma beobachtet werden, auch wenn die Tumorzellmembran nicht gefärbt war. Auf diese Weise konnte in dieser Arbeit zusätzlich gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Färbung bei der Verwendung der Klone 22C3 und 28-8 mit der PD-L1 Färbung der Immunzellen, die mit dem Klon SP142 bestimmt wurden, korreliert. Wenn der Pathologe die cytoplasmatische Färbung bei der IHC mit den beiden Klonen 22C3 und 28-8 bei der Auswertung in Zukunft mitberücksichtigen könnte, wäre weiterhin zu prüfen, ob man auf dieses Testverfahren mit dem Detektion Kit ultraView Alkaline Phosphatase Red ausweichen kann, im Falle wenn die Verwendung von SP142 vorgeschrieben ist. Dazu sind weitere Untersuchungen an einem größeren Patientinnen Kollektiv notwendig.

Abschließend kann festgehalten werden, dass es zum jetzigen Zeitpunkt wichtig ist zu erkennen, dass es bei den triple negativen Patientinnen zwingend erforderlich ist, die richtige PD-L1 positive Patientin zu diagnostizieren, die für die entsprechende Therapie in Frage kommt. Es ist entscheidend für die Therapie, ob die PD-L1 Expression an den Immunzellen oder an den Tumorzellen untersucht wird, und welcher Test dafür verwendet werden soll.

Beim TNBC wurde gezeigt, dass ein hoher TIL-Spiegel mit einem besseren Ansprechen auf die Therapie einhergeht, wodurch eine bessere Prognose gegeben ist [43]. Die weitere Studienlage zum prognostischen Wert der PD-L1 Expression bei immunhistochemischer Bestimmung scheint in mancher Literatur noch kontrovers, jedoch zeigen auch Untersuchungen auf mRNA-Ebene in zwei Übersichtsarbeiten PD-L1 auch als günstigen Prognosefaktor [76, 77]. Zudem gibt es in der Zwischenzeit neue immunonkologische Studien beim Mammakarzinom, die die Chemotherapie, die zielgerichtete Therapie und die Strahlentherapie mit einer Immuntherapie kombinieren [78]. Weitere präklinische Daten lassen einen synergistischen Effekt zwischen Checkpoint-Inhibitoren und PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase)- Inhibitoren vermuten [79]. Andere wissenschaftliche Arbeiten haben gezeigt, dass die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) beim TNBC von prognostischem und prädiktivem Wert zu sein

scheinen. Ihr Auftreten signalisiert, dass die Immunabwehr gegen den Tumor vorgeht und mit einem klinischen Benefit einhergeht [80-82]. Die PD-L1 Expression auf den tumorinfiltrierenden Lymphozyten sollte deshalb berücksichtigt werden, um Therapieentscheidungen für die Patientinnen zu treffen. Seitz et al. stellten fest, dass die PD-L1 Expression mit der PD-1 Expression sowohl auf Tumor- als auch auf Immunzellen korreliert, und dass in einer retrospektiven Analyse an 103 TNBC-Patientinnen die PD-L1/PD-1 Expression mit einem höheren krankheitsfreien Überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OS) einhergeht [83]. In einer Subanalyse der ADAPT-Studie wurde gezeigt, dass die triple negativen Mammakarzinom Patientinnen mit hoher Immunogenität, messbar durch eine hohe PD/PD-L1-Expression ein längeres Überleben zeigen [84]. Es gibt also bisher schon viele Hinweise darauf, dass die Bestimmung der PD-L1 Expression auf den Immunzellen beim TNBC relevant werden könnte.

Da beim NSCLC auch Patienten mit einer negativen PD-L1 Expression ein Ansprechen zeigen [85], schließt eine negative PD-L1-Expression der Tumorzellmembran eine Immuntherapie nicht vollständig aus. Beim NSCLC werden in der Routine die Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 und Klon 28-8 zur Diagnostik der PD-L1 positiven Tumorzellmembranfärbung verwendet. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit könnte erwogen werden, zusätzlich zur PD-L1 Tumorzellmembranfärbung die cytoplasmatische Färbung, bzw. die PD-L1 Immunzellfärbung beim NSCLC anzuwenden. Auf diese Weise könnten eventuell weitere Patientinnen diagnostiziert werden, die von der Immuntherapie profitieren.

Es ist zwingend erforderlich, die PD-L1-Immunhistochemie möglichst standardisiert und qualitativ hochwertig anzubieten. Mit den gewonnenen Erkenntnissen wird es in Zukunft möglich sein, die individuelle, zielgerichtete Tumorthherapie auch bei den unterschiedlichen Tumoren entscheidend voranzubringen. Die Voraussetzung für jegliche Auswertung, ist eine gute Validierung des verwendeten Antikörpers und des Testsystems im eigenen Labor. Durch die Teilnahme an den Ringversuchen, die von der Qualitätssicherungsinitiative Pathologie (QuIP) angeboten werden, kann sich ein Institut zertifizieren lassen. Das Institut für Pathologie an der Universität in Homburg, wo die Untersuchungen und die Auswertung dieser Arbeit durchgeführt wurden, hat mit

positivem Ergebnis an den Ringversuchen des QuIP teilgenommen und ist somit für die Durchführung der PD-L1 Bestimmung qualifiziert.

Korrelation der PD-L1 Expression mit den klinischen Daten der Patientinnen

Bei der statistischen Auswertung zwischen PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran bzw. an den Immunzellen und den klinischen Parametern (Tod, spätere Metastasierung, Rezidiv, Tumorstadium, Nodalstatus, Grading) konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Der Her2(neu) Status 0,1,2 zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zur PD-L1 Expression.

Ein hoher PD-L1 Status zeigte in Studien eine gute Prognose fürs Überleben [84]. In unsrer Arbeit zeigte sich hier jedoch kein signifikanter Unterschied. Interessant ist jedoch, dass die Patientinnen mit einer PD-L1 Expression von <50-100% noch nach 10 Jahren tumorfrei lebte. Obwohl es nur eine Patientin (1,7%) im gesamten untersuchten Kollektiv war, spiegelt dieses Ergebnis die bereits publizierten wissenschaftlichen Erkenntnisse wieder.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich beim Vergleich der PD-L1 Expression Tumorzellmembranfärbung (TC) und Ki67. Ki67 ist ein Protein welches ausschließlich von sich teilenden Zellen produziert wird [86]. Bei den untersuchten Patientinnen zeigte ein niedriger Ki67 Wert unter 30 einen signifikanten Unterschied zu hohem Ki67 Wert bei der PD-L1 Expression der Tumorzellmembranfärbung mit 22C3 und 28-8. Die PD-L1 negativen Patientinnen (78%) hatten einen niedrigeren Ki67 Wert als die PD-L1 positiven Patientinnen (22%). Bei der PD-L1 Expression der Immunzellfärbung mit SP142 konnte man ebenfalls erkennen, dass die PD-L1 negativen Patientinnen (59,3%) einen niedrigeren Ki67 Wert hatten als die PD-L1 positiven Patientinnen (40,7%), jedoch war dieses Ergebnis nicht signifikant.

SOX10 Expression und dessen Korrelation mit den klinischen Daten der Patientinnen und der PD-L1-Expression

Peevey et al. beschreibt in seiner Arbeit, dass die Diagnostik von SOX10 auch beim metastasierten triple negativen Mammakarzinom nützlich sein könnte [32]. *Nelson et al.* beschreibt dagegen, dass ein konkreter wissenschaftlich untersuchter Nutzen bisher noch nicht gezeigt werden konnte [46]. In dieser Arbeit konnte ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer SOX10 Expression und verschiedenen klinischen Parametern wie Tod, spätere Metastasierung, Rezidiv, Tumorstadium, Nodalstatus, Grading bei den Patientinnen festgestellt werden. Ein Zusammenhang mit der PD-L1 Expression und Her2-Status (0,1,2) war ebenfalls nicht zu erkennen. Die Patientinnen die eine SOX10 Expression von über 50% (67,8% der Patientinnen) hatten, zeigten tendenziell einen niedrigeren Ki67 Wert unter 40 als die Patientinnen, die weniger als 50% SOX10 exprimiert hatten (32,2% der Patientinnen), eine Signifikanz war hier jedoch nicht zu sehen. Tendenzuell zeigten Patientinnen mit einer hohen SOX10 Expression eine PD-L1 Expression auf den Immunzellen. Der Unterschied war jedoch auch nicht signifikant. Somit konnte in dieser Arbeit eine Relevanz von SOX10 beim TNBC nicht gezeigt werden.

Weitere Hinweise

Die Evaluierung der Biomarkerexpression ist aktuell zur klinischen Entscheidungsfindung relevant, im Besonderen die Expression von PD-L1. Um Biomarker wie PD-L1 und andere zukünftig berücksichtigen zu können, ist es notwendig eine Optimierung der Entnahme und Aufarbeitung von Gewebeproben zu ermöglichen [71]. Die Verfügbarkeit der Gewebeproben des Tumors ist essentiell für die Bestimmung von Biomarkern. Im Rahmen der Abklärung stellt die Untersuchung auf Biomarker eine wesentliche Hilfe für das bessere Verständnis des Tumors der Patientin dar [29]. Bereits bei den Strategien zur Entnahme von Gewebeproben gilt es abzuwägen, wieviel Gewebe entnommen werden kann, und wieviel für die Biomarker Analysen benötigt wird [29]. Zu den gängigsten Entnahmemethoden bei Krebs gehören die Nadelbiopsien, chirurgische Eingriffe und andere speziell für bestimmte Tumorarten geeignete Methoden [37]. Abhängig vom Patienten bzw. von der Art des Tumors, ist das bei der ersten Biopsie gewonnene Gewebe, möglicherweise das einzige Gewebe, das für die Biomarker Analyse zur Verfügung steht. Es kommt manchmal vor, dass die Biopsie einiger Tumore nicht ausreichend Gewebe für weiterführende Tests nach der Diagnosestellung ermöglicht, in

manchen Fällen ist gar kein Tumorgewebe verfügbar und weitere Biopsien sind aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums der Krankheit nicht möglich [87, 88]. Manche Krebsarten werden leider erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, in dem die Gewebeentnahme aus vielen Gründen schwierig sein kann, z. B. aufgrund der Lokalisation des Tumors, aufgrund von Begleiterkrankungen oder aufgrund der Entnahmemethode [89]. Hierdurch kann die Durchführung von Biomarker-Analysen eingeschränkt sein [71]. Es ist also notwendig die Entnahmemethoden zu optimieren um geeignete Proben zu erhalten [88, 89]. Bei der Biomarkeranalyse trägt ein fachübergreifender Ansatz wesentlich dazu bei, dass für die Wahl der Behandlungsstrategie auf umfassendere Informationen zurückgegriffen werden kann [29, 90]. Vorteilhaft ist, dass die Effizienz bei der Entnahme und Testung von Tumorgewebeproben verbessert wird, dass geeignete Biomarker-Analysen rechtzeitig angefordert werden, und dadurch die klinische Entscheidungsfindung erleichtert wird [29, 90]. Inzwischen ist die Umsetzung eines fachübergreifenden Ansatzes ein wichtiger Schwerpunktbereich in der Onkologie. Durch die Kommunikation in einem Team aus Pathologen, Chirurgen, Gynäkologen, Internisten und Onkologen kann die Bewertung der Biomarkeranalyse optimiert werden, und die Behandlungsstrategie gemeinsam festgelegt werden. Im Zuge des Weiteren Erkenntnisgewinns zu den Biomarkern, könnte eine Verfeinerung der bestehenden Standards für die pathologische Aufarbeitung erforderlich werden [29].

Positive Aspekte dieser Arbeit

In dieser Arbeit handelt es sich bei dem ausgewählten Patientinnen Kollektiv um klinisch repräsentative Daten. Die eingeschlossenen Patientinnen wurden mit einem langen

Follow-up von 74,8 +/- 34,9 Monaten beobachtet. Am gleichen Patientinnen Kollektiv konnten verschiedene Tests durchgeführt werden, da genügend Tumorgewebe zur Verfügung stand. Durch verschiedene Untersuchungen und durch die vorhandenen klinischen Daten konnten viele verschiedenen Parameter miteinander verglichen werden.

Limitierende Aspekte dieser Arbeit

Das eingeschlossenen Patientinnen Kollektiv war mit 60 Patientinnen relativ klein. Davon konnte bei nur 59 Patientinnen die PD-L1 und SOX10 Färbung ausgewertet werden, bei nur 49 Patientinnen war der Ki67 Wert bekannt.

Die Verwendung der TMA Blöcke für die immunhistochemischen Färbungen erforderte, dass aus dem Tumor heraus drei Stenzen gewonnen wurden, die in den TMA Blöcken fixiert wurden. Somit konnte die prozentuale Auswertung nicht im Ganzen betrachtet werden, sondern nur an Ausschnitten des Tumorgewebes und bei den heterogenen Fällen konnte nur ein Mittelwert bezogen auf je 100 vitale Tumorzellen in den 3 Stenzen gebildet werden.

Ausblick

Da es neue Ansätze zur Immuntherapie beim triple negativen Mammakarzinom gibt, wird die PD-L1 Testung in Zukunft beim TNBC klinisch relevant werden.

Die bisher bei anderen Tumorentitäten am häufigsten verwendeten Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3 und Klon 28-8 zur immunhistochemischen PD-L1 Bestimmung, führten in dieser Arbeit zum gleichen Ergebnis, so dass beide Antikörper für die immunhistochemische Bestimmung von PD-L1 an der Tumorzellmembran ausgetauscht werden können. Seit März 2019 ist PD-L1 in USA ein Prädiktionsmarker für den Einsatz von Atezolizumab beim triple negativen Mammakarzinom [41]. Die Zulassung beschreibt, dass für die PD-L1 Bestimmung der Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 verwendet werden sollte, der in erster Linie PD-L1 auf den Immunzellen bestimmt. Mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142 konnten in dieser Arbeit signifikant mehr PD-L1 positive Patientinnen diagnostiziert werden, als bei der PD-L1 Färbung der Tumorzellen mit den beiden Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 bzw Klon 28-8. Folglich ist das Ergebnis dieser Arbeit ein Hinweis darauf, dass man diesen Anti-PD-L1 Antikörper-Klon SP142 nicht ohne weiteres austauschen kann. Die Tumorzellmembranfärbung mit Klon 22C3 und Klon 28-8 wie sie beim Lungenkarzinom routinemäßig verwendet wird, ist zurzeit eine etablierte immunhistochemische Färbung in der Pathologie. Diese Antikörper können nach den Ergebnissen dieser Arbeit vorerst nicht als Alternative für die Immunzellfärbung beim TNBC mit Klon SP142 verwendet werden. Es sind weitere Untersuchungen an mehreren triple negativen Patientinnen nötig, um abzuklären, ob die cytoplasmatische Färbung mit den Anti-PD-L1 Antikörpern Klon 22C3 und Klon 28-8 die Immunzellfärbung mit Klon SP142 ersetzen kann, um hier eine abschließende Empfehlung geben zu können. Am untersuchten Patientinnen Kollektiv konnte kein direkter Zusammenhang zwischen SOX10, PD-L1 und den klinischen Parametern der Patientinnen nachgewiesen werden, somit scheint SOX10 im Hinblick der erhobenen Daten beim TNBC nicht relevant zu sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. 55(2): p. 74-108.
2. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. 365(9472): p. 1687-717.
3. Kennecke, H., et al., *Metastatic behavior of breast cancer subtypes*. J Clin Oncol, 2010. 28(20): p. 3271-7.
4. Bonotto, M., et al., *Measures of outcome in metastatic breast cancer: insights from a real-world scenario*. Oncologist, 2014. 19(6): p. 608-15.
5. Stovgaard, E.S., et al., *Triple negative breast cancer - prognostic role of immune-related factors: a systematic review*. Acta Oncol, 2018. 57(1): p. 74-82.
6. Metzger-Filho, O., et al., *Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer*. J Clin Oncol, 2012. 30(15): p. 1879-87.
7. Mittendorf, E.A., et al., *PD-L1 expression in triple-negative breast cancer*. Cancer Immunol Res, 2014. 2(4): p. 361-70.
8. Fremd, C., D. Jaeger, and A. Schneeweiss, *Targeted and immuno-biology driven treatment strategies for triple-negative breast cancer: current knowledge and future perspectives*. Expert Rev Anticancer Ther, 2018: p. 1-14.
9. Lehmann, B.D., et al., *Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection*. PLoS One, 2016. 11(6): p. e0157368.
10. Burstein, M.D., et al., *Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer*. Clin Cancer Res, 2015. 21(7): p. 1688-98.
11. Jezequel, P., et al., *Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response*. Breast Cancer Res, 2015. 17: p. 43.
12. Kiely, B.E., et al., *How long have I got? Estimating typical, best-case, and worst-case scenarios for patients starting first-line chemotherapy for metastatic breast cancer: a systematic review of recent randomized trials*. J Clin Oncol, 2011. 29(4): p. 456-63.
13. Verma, S. and M. Clemons, *First-line treatment options for patients with HER-2 negative metastatic breast cancer: the impact of modern adjuvant chemotherapy*. Oncologist, 2007. 12(7): p. 785-97.
14. Cardoso, F., et al., *Second and subsequent lines of chemotherapy for metastatic breast cancer: what did we learn in the last two decades?* Ann Oncol, 2002. 13(2): p. 197-207.
15. Dawood, S., et al., *Trends in survival over the past two decades among white and black patients with newly diagnosed stage IV breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. 26(30): p. 4891-8.
16. Postow, M.A., M.K. Callahan, and J.D. Wolchok, *Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy*. J Clin Oncol, 2015. 33(17): p. 1974-82.
17. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. 12(4): p. 252-64.
18. Disis, M.L., *Immune regulation of cancer*. J Clin Oncol, 2010. 28(29): p. 4531-8.
19. Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, *Cancer immunotherapy comes of age*. Nature, 2011. 480(7378): p. 480-9.
20. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. Immunity, 2013. 39(1): p. 1-10.
21. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. 29: p. 235-71.

22. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. 3(11): p. 991-8.
23. Ahmad, M., R.C. Rees, and S.A. Ali, *Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression*. Cancer Immunol Immunother, 2004. 53(10): p. 844-54.
24. Topfer, K., et al., *Tumor evasion from T cell surveillance*. J Biomed Biotechnol, 2011. 2011: p. 918471.
25. Quezada, S.A. and K.S. Peggs, *Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer*. Br J Cancer, 2013. 108(8): p. 1560-5.
26. Ribas, A., *Tumor immunotherapy directed at PD-1*. N Engl J Med, 2012. 366(26): p. 2517-9.
27. Engstrom, P.F., et al., *NCCN molecular testing white paper: effectiveness, efficiency, and reimbursement*. J Natl Compr Canc Netw, 2011. 9 Suppl 6: p. S1-16.
28. Modur, V., E. Hailman, and J.C. Barrett, *Evidence-based laboratory medicine in oncology drug development: from biomarkers to diagnostics*. Clin Chem, 2013. 59(1): p. 102-9.
29. Cree, I.A., et al., *Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients*. J Clin Pathol, 2014. 67(11): p. 923-31.
30. Mehta, S., et al., *Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine*. Ther Adv Med Oncol, 2010. 2(2): p. 125-48.
31. Patel, S.P. and R. Kurzrock, *PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy*. Mol Cancer Ther, 2015. 14(4): p. 847-56.
32. Joseph Peevey, I.S., Ajit Paintal, William Laskin, Megan Sullivan, *SOX10 Is a Useful Marker for Triple Negative Breast Cancer*. Am J Clin Pathol, 2015. 144.
33. Chen, D.S., B.A. Irving, and F.S. Hodi, *Molecular pathways: next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1*. Clin Cancer Res, 2012. 18(24): p. 6580-7.
34. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. 26: p. 677-704.
35. Blank, C. and A. Mackensen, *Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion*. Cancer Immunol Immunother, 2007. 56(5): p. 739-45.
36. Rozali, E.N., et al., *Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression*. Clin Dev Immunol, 2012. 2012: p. 656340.
37. Guha, M., *Immune checkpoint inhibitors bring new hope to cancer patients*. The pharmaceutical Journal, 2014. 293(7837/8).
38. Somasundaram, A. and T.F. Burns, *The next generation of immunotherapy: keeping lung cancer in check*. J Hematol Oncol, 2017. 10(1): p. 87.
39. Rittmeyer, A., et al., *Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial*. Lancet, 2017. 389(10066): p. 255-265.
40. Balar, A.V., et al., *Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial*. Lancet, 2017. 389(10064): p. 67-76.
41. Schmid, P., S.Y. Chui, and L.A. Emens, *Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. Reply*. N Engl J Med, 2019. 380(10): p. 987-988.
42. Herbst, R.S., et al., *Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients*. Nature, 2014. 515(7528): p. 563-7.
43. Denkert, C., et al., *Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy*. Lancet Oncol, 2018. 19(1): p. 40-50.

44. Rehberg, S., et al., *Sox10 is an active nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for Sox10-mediated transactivation*. Mol Cell Biol, 2002. 22(16): p. 5826-34.
45. Miettinen, M., et al., *Sox10--a marker for not only schwannian and melanocytic neoplasms but also myoepithelial cell tumors of soft tissue: a systematic analysis of 5134 tumors*. Am J Surg Pathol, 2015. 39(6): p. 826-35.
46. Nelson, E.R., et al., *Utility of Sox10 labeling in metastatic breast carcinomas*. Hum Pathol, 2017. 67: p. 205-210.
47. Haggerty, J.M., et al., *Segmentation of epidermal tissue with histopathological damage in images of haematoxylin and eosin stained human skin*. BMC Med Imaging, 2014. 14: p. 7.
48. Ventana Medical Systems, I., *ultraView universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit*. Ventana Produktdatenblatt, 2016. 21100DE Rev G(FT0700-420): p. 1-6.
49. Thunnissen, E., et al., *Immunohistochemistry of Pulmonary Biomarkers: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society*. Arch Pathol Lab Med, 2018. 142(3): p. 408-419.
50. Sholl, L.M., et al., *Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry--A New Challenge for Pathologists: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society*. Arch Pathol Lab Med, 2016. 140(4): p. 341-4.
51. Scheel, A.H., et al., *[Predictive PD-L1 immunohistochemistry for non-small cell lung cancer : Current state of the art and experiences of the first German harmonization study]*. Pathologe, 2016. 37(6): p. 557-567.
52. Tacha, D., et al., *A newly developed mouse monoclonal SOX10 antibody is a highly sensitive and specific marker for malignant melanoma, including spindle cell and desmoplastic melanomas*. Arch Pathol Lab Med, 2015. 139(4): p. 530-6.
53. Tetzlaff, M.T., et al., *Emerging clinical applications of selected biomarkers in melanoma*. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2015. 8: p. 35-46.
54. GmbH, R.D.D., *Ventana BenchMark ULTRA*. Roche Diagnostics Produktdatenblatt, 2012. 06533132001 4 0712 - 0.5 Kn: p. 1-6.
55. abcam, *Anti-PD-L1 antibody (28-8)* abcam Product datasheet, 2015. Q9NZQ7(ab205921): p. 1-11.
56. Dako, *Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1 Clone 22C3*. Dako Produktdatenblatt, 2016. P04435EFG_01(M3653): p. 1-4.
57. Ventana Medical Systems, I., *VENTANA PD-L1 (SP142) Assay*. Ventana Produktdatenblatt, 2018. 1018007DE RevA(FT0700-410p): p. 1-11.
58. Marque, C., *SOX-10 (SP267) Rabbit Monoclonal Primary Antibody*. Cell Marque Produktdatenblatt, 2017. CMC49680010 DE Rev.1,0: p. 1-6.
59. Ventana Medical Systems, I., *OptiView DAB IHC Detection Kit*. Ventana Produktdatenblatt, 2011. 1010323DE Rev A(FT0700-420b): p. 1-5.
60. America, D.N., *Dako Antibody Diluent Produktdatenblatt*. Immunohistochemical Staining Methods, 2006. 4th Edition: p. 1-3.
61. Ventana Medical Systems, I., *ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1)*. Ventana Produktdatenblatt, 2014. 1000297DE Rev E(FT0700-450f): p. 1-2.
62. Ventana Medical Systems, I., *Reaction Buffer*. Ventana Produktdatenblatt, 2009(14475 DE Rev C): p. 1-5.
63. Ventana Medical Systems, I., *LCS (Predilute)*. Ventana Produktdatenblatt, 2011. 12951DE RevD(05264839001): p. 1.
64. Ventana Medical Systems, I., *EZ-Prep Concentrate 10x*. Ventana Produktdatenblatt, 2012(14828DE Rev E): p. 1.
65. Ventana Medical Systems, I., *Hematoxylin II*. Ventana Produktdatenblatt, 2008. 20696DE Rev C: p. 1-5.
66. Ventana Medical Systems, I., *Buling Reagent*. Ventana Produktdatenblatt, 2008. 12479DE Rev B: p. 1-5.

67. Ventana Medical Systems, I., *Amplification Kit*. Ventana Produktdatenblatt, 2012. 12924DE Rev C(FT0700-450a): p. 1-2.
68. Ventana Medical Systems, I., *OptiView Amplification Kit*. Ventana Produktdatenblatt, 2012. 1010526DE Rev B(FT0700-450d): p. 1-2.
69. Vennapusa, B., et al., *Development of a PD-L1 Complementary Diagnostic Immunohistochemistry Assay (SP142) for Atezolizumab*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2019. 27(2): p. 92-100.
70. Schmid, P., et al., *Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2018. 379(22): p. 2108-2121.
71. Normanno, N., et al., *Molecular diagnostics and personalized medicine in oncology: challenges and opportunities*. *J Cell Biochem*, 2013. 114(3): p. 514-24.
72. Herbst, R.S., et al., *Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2016. 387(10027): p. 1540-50.
73. Hirsch, F.R., et al., *PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project*. *J Thorac Oncol*, 2017. 12(2): p. 208-222.
74. Reis, H., et al., *PD-L1 Expression in Urothelial Carcinoma With Predominant or Pure Variant Histology: Concordance Among 3 Commonly Used and Commercially Available Antibodies*. *Am J Surg Pathol*, 2019. 43(7): p. 920-927.
75. Garon, E.B., et al., *Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer*. *N Engl J Med*, 2015. 372(21): p. 2018-28.
76. Monneur, A., A. Goncalves, and F. Bertucci, *[PD-L1 expression and PD-1/PD-L1 inhibitors in breast cancer]*. *Bull Cancer*, 2018. 105(3): p. 263-274.
77. Cottrell, T.R. and J.M. Taube, *PD-L1 and Emerging Biomarkers in Immune Checkpoint Blockade Therapy*. *Cancer J*, 2018. 24(1): p. 41-46.
78. Esteva, F.J., et al., *Immunotherapy and targeted therapy combinations in metastatic breast cancer*. *Lancet Oncol*, 2019. 20(3): p. e175-e186.
79. Jiao, S., et al., *PARP Inhibitor Upregulates PD-L1 Expression and Enhances Cancer-Associated Immunosuppression*. *Clin Cancer Res*, 2017. 23(14): p. 3711-3720.
80. Adams, S., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199*. *J Clin Oncol*, 2014. 32(27): p. 2959-66.
81. de Melo Gagliato, D., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes in Breast Cancer and implications for clinical practice*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017. 1868(2): p. 527-537.
82. Loi, S., et al., *Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98*. *J Clin Oncol*, 2013. 31(7): p. 860-7.
83. Brockhoff, G., et al., *The presence of PD-1 positive tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancers is associated with a favorable outcome of disease*. *Oncotarget*, 2018. 9(5): p. 6201-6212.
84. Gluz, O., et al., *Efficacy of de-escalated chemotherapy according to PAM50 subtypes, immune and proliferation genes in triple-negative early breast cancer: Primary translational analysis of the WSG-ADAPT-TN trial*. *Int J Cancer*, 2019.
85. Borghaei, H., et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. 373(17): p. 1627-39.
86. Tumorzentrum München, B.I., *Mammakarzinome*. Zuckschwerdt Verlag GmbH für Medizin und Naturwissenschaften, 2015. 5. Auflage edition.
87. Aisner, D.L. and C.B. Marshall, *Molecular pathology of non-small cell lung cancer: a practical guide*. *Am J Clin Pathol*, 2012. 138(3): p. 332-46.

88. Venderbosch, S., et al., *Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies*. Clin Cancer Res, 2014. 20(20): p. 5322-30.
89. Kerr, K.M., et al., *Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer*. Ann Oncol, 2014. 25(9): p. 1681-90.
90. Schwaederle, M., et al., *Molecular tumor board: the University of California-San Diego Moores Cancer Center experience*. Oncologist, 2014. 19(6): p. 631-6.

7. Publikation

Die Ergebnisse der Färbung mit 22C3 und 28-8 wurden am 10.11.2016 beim 8. Wissenschaftlichen Symposium der Kommission Translationale Forschung der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (TraFo-Symposium der AGO) in Düsseldorf als Poster vorgestellt.

Titel: Bestimmung der PD-L1-Expression mit 2 verschiedenen Antikörpern am eigenen triple negativen Mammakarzinomkollektiv

Autoren: Guhl Margit, Bohle Rainer, Ertz Martin, Kasoah Mariz, Schmidt Gilda, Hammadeh M.E., Somoayer E.-F., Juhasz-Böss Ingolf

Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes Homburg/Saar

Institut für Allgemeine und spezielle Pathologie, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg Saar

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit werden aktuell zur Publikation eingereicht.

8. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. M.E. Hammadeh und meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Ingolf Juhasz-Böss für die Überlassung des Themas sowie für die hervorragende Betreuung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation. Bei der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes unter der Leitung von Prof. Dr. med. E.-F. Solomayer möchte ich mich bedanken, denn ohne sie wäre meine Arbeit gar nicht erst möglich gewesen. Ebenfalls gilt mein Dank Frau Dr. M. Kasoah und Frau Dr. G. Schmidt für die Bereitstellung der Ergebnisse des Her2(neu) Score (0,1,2) der untersuchten Patientinnen.

Aus dem Institut für Allgemeine und spezielle Pathologie der med. Fakultät der Universität des Saarlandes möchte ich mich im Besonderen bei Herrn Prof. Dr. med. R. M. Bohle bedanken. Herr Bohle hat mir die hervorragende Möglichkeit geboten, meine experimentellen Laborarbeiten in seinem Institut durchführen zu können. Zudem danke ich ihm für seine Unterstützung bei der Auswahl der Schnitte und der Auswertung der Färbungen. Bei Herrn M. Ertz und Frau A. Klein möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Laborarbeiten und der Fotodokumentation bedanken.

Aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik am Universitätsklinikum des Saarlandes danke ich Frau Diplom-Statistikerin Gudrun Wagenpfeil für die Bereitstellung des Statistikprogramms und die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Kinder Ben, Mariella und Tom, die in der Zeit meiner Promotionsarbeit sehr oft auf mich verzichten mussten. Ihr habt stets Verständnis für mich aufgebracht und mich motiviert die Arbeit abzuschließen. Meinen Vorgesetzten Frau Dr. Danuta Schramm, Susanne Schmitt, Andrea Schindler und dem Celgene-Team möchte ich dafür danken, dass sie es mir ermöglicht haben, neben meiner hauptberuflichen Tätigkeit als hämato-onkologische Fachreferentin im Außendienst bei der Firma Celgene die Promotion durchführen zu können.

9. Anhang

A	B	C	D	E	F	X	
n.a.	n.a.	negativ	negativ	negativ	negativ		1
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		2
negativ	3						
negativ	negativ	negativ	1-50	1-50	n.a.		4
1-50	1-50	1-50	negativ	negativ	negativ		5
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		6
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		7
negativ	negativ	negativ	<50-100	<50-100	<50-100		8
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		9
n.a.	negativ	negativ	1-50	1-50	1-50		10

Tabelle 9: TMA Block Probe 1, Tumorzellmembranfärbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3

G	H	I	J	K	L	Y	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		1
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		2
negativ	negativ	n.a.	negativ	n.a.	negativ	negativ	3
n.a.	negativ	negativ	n.a.	negativ	negativ		4
1-50	1-50	1-50	n.a.	negativ	negativ		5
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		6
negativ	negativ	negativ	n.a.	negativ	n.a.		7
negativ	negativ	n.a.	n.a.	negativ	negativ		8
n.a.	n.a.	1-50	negativ	negativ	negativ		9
n.a.	1-50	n.a.	negativ	n.a.	negativ		10

Tabelle 10: TMA Block Probe 2, Tumorzellmembranfärbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3

M	N	O	P	Q	R	Z	
n.a	n.a	1-50	negativ	negativ	negativ		1
negativ	negativ	negativ	1-50	n.a.	n.a.		2
negativ	negativ	negativ	negativ	n.a.	n.a.	negativ	3
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	negativ	negativ		4
negativ	negativ	negativ	n.a.	negativ	negativ		5
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		6
negativ	negativ	negativ	negativ	n.a.	negativ		7
1-50	n.a.	1-50	1-50	n.a.	1-50		8
50-100	50-100	50-100	n.a.	1-50	n.a.		9
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		10

Tabelle 11: TMA Block Probe 3, Tumorzellmembranfärbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3

A	B	C	D	E	F	X	
n.a.	n.a.	negativ	negativ	negativ	negativ		1
n.a.	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		2
negativ	3						
negativ	negativ	negativ	1-50	1-50	n.a.		4
1-50	1-50	1-50	negativ	negativ	negativ		5
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		6
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		7
negativ	negativ	negativ	1-50	1-50	1-50		8
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		9
negativ	negativ	negativ	1-50	n.a.	n.a.		10

Tabelle 12: TMA Block Probe 1, Tumorzellmembranfärbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 28-8

G	H	I	J	K	L	Y	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		1
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		2
negativ	negativ	n.a.	negativ	n.a.	n.a.	negativ	3
n.a.	negativ	negativ	n.a.	negativ	negativ		4
1-50	1-50	1-50	n.a.	negativ	negativ		5
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		6
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	n.a.		7
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		8
n.a.	n.a.	1-50	negativ	negativ	negativ		9
n.a.	1-50	n.a.	negativ	n.a.	negativ		10

Tabelle 13: TMA Block Probe 2, Tumorzellmembranfärbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 28-8

M	N	O	P	Q	R	Z	
n.a.	n.a.	1-50	negativ	negativ	negativ		1
negativ	negativ	negativ	1-50	n.a.	n.a.		2
negativ	negativ	negativ	negativ	n.a.	n.a.	negativ	3
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	negativ	negativ		4
negativ	negativ	n.a.	n.a.	negativ	negativ		5
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		6
negativ	negativ	negativ	negativ	n.a.	negativ		7
1-50	1-50	1-50	1-50	n.a.	1-50		8
50-100	50-100	50-100	n.a.	1-50	n.a.		9
negativ	negativ	negativ	negativ	n.a.	negativ		10

Tabelle 14: TMA Block Probe 3, Tumorzellmembranfärbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 28-8

A	B	C	D	E	F	X	
n.a.	n.a.	negativ	positiv	positiv	positiv		1
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		2
negativ	3						
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	n.a.		4
positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ		5
positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		6
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		7
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv		8
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		9
n.a.	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv		10

Tabelle 15: TMA Block Probe 1, cytoplasmatische Färbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3

G	H	I	J	K	L	Y	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		1
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv		2
positiv	positiv	n.a.	negativ	n.a.	negativ	negativ	3
n.a.	positiv	positiv	n.a.	negativ	negativ		4
positiv	positiv	positiv	n.a.	negativ	negativ		5
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		6
negativ	negativ	negativ	n.a.	negativ	n.a.		7
negativ	negativ	n.a.	n.a.	negativ	negativ		8
n.a.	n.a.	positiv	negativ	negativ	negativ		9
n.a.	positiv	n.a.	negativ	n.a.	negativ		10

Tabelle 16: TMA Block Probe 2, cytoplasmatische Färbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3

M	N	O	P	Q	R	Z	
n.a.	n.a.	positiv	positiv	positiv	positiv		1
positiv	positiv	positiv	positiv	n.a.	n.a.		2
positiv	positiv	positiv	positiv	n.a.	n.a.	negativ	3
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	negativ	negativ		4
negativ	negativ	negativ	n.a.	negativ	negativ		5
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv		6
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		7
positiv	n.a.	positiv	positiv	n.a.	positiv		8
positiv	positiv	positiv	n.a.	positiv	n.a.		9
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		10

Tabelle 17: TMA Block Probe 3, cytoplasmatische Färbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22C3

A	B	C	D	E	F	X	
n.a.	n.a.	negativ	positiv	positiv	positiv		1
n.a.	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		2
negativ	3						
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	n.a.		4
positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ		5
positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ		6
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		7
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv		8
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		9
negativ	negativ	negativ	positiv	n.a.	n.a.		10

Tabelle 18: TMA Block Probe 1, cytoplasmatische Färbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 22-8

G	H	I	J	K	L	Y	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		1
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv		2
positiv	positiv	n.a.	negativ	n.a.	n.a.	negativ	3
n.a.	positiv	positiv	n.a.	negativ	negativ		4
positiv	positiv	positiv	n.a.	negativ	negativ		5
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		6
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	n.a.		7
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ		8
n.a.	n.a.	positiv	negativ	negativ	negativ		9
n.a.	positiv	n.a.	negativ	n.a.	negativ		10

Tabelle 19: TMA Block Probe 2, cytoplasmatische Färbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 28-8

M	N	O	P	Q	R	Z	
n.a.	n.a.	positiv	positiv	positiv	positiv		1
positiv	positiv	positiv	positiv	n.a.	n.a.		2
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	n.a.	negativ	3
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	negativ	negativ		4
negativ	negativ	n.a.	n.a.	negativ	negativ		5
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv		6
negativ	negativ	negativ	negativ	n.a.	negativ		7
positiv	positiv	positiv	positiv	n.a.	positiv		8
positiv	positiv	positiv	n.a.	positiv	n.a.		9
negativ	negativ	negativ	negativ	n.a.	negativ		10

Tabelle 20: TMA Block Probe 3, cytoplasmatische Färbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon 28-8

A	B	C	D	E	F	X	
0	n.a.	0	>1	na	0		1
0	0	0	0	0	<1		2
0	0	0	0	0	0	negativ	3
<1	<1	<1	1	na	na		4
>1	>1	>1	0	0	0		5
>1	0	0	0	0	na		6
0	0	0	na	0	0		7
0	0	0	>1	>1	>1		8
0	0	0	0	0	0		9
0	0	0	>1	>1	>1		10

Tabelle 21: TMA Block Probe 1, Immunzellfärbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142

G	H	I	J	K	L	Y	
<1	<1	0	0	0	0		1
0	0	0	>1	>1	>1		2
0	>1	na	0	na	na	negativ	3
0	0	>1	0	0	0		4
>1	>1	>1	0	0	na		5
0	0	0	<1	<1	0		6
0	0	0	na	0	na		7
0	0	na	0	0	0		8
na	na	>1	0	0	0		9
na	>1	na	0	na	0		10

Tabelle 22: TMA Block Probe 2, Immunzellfärbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142

M	N	O	P	Q	R	Z	
na	na	>1	>1	>1	>1		1
0	>1	1	>1	na	na		2
>1	>1	>1	>1	>1	>1	negativ	3
na	na	na	0	na	na		4
0	0	na	na	0	0		5
>1	>1	>1	>1	>1	>1		6
0	0	0	0	0	0		7
>1	>1	>1	>1	na	>1		8
>1	>1	>1	na	>1	>1		9
0	0	0	0	0	0		10

Tabelle 23: TMA Block Probe 3, Immunzellfärbung, gefärbt mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Klon SP142

A	B	C	D	E	F	X	
na	na	95+++	na	100+	100+++		1
100+++	100+++	100+++	0	na	na		2
0	0	0	100+++	100+++	100+++	negativ	3
100+++	100+++	100+++	100+++	100+++	na		4
40+++	30+++	90+++	9ß+++	80+++	80+++		5
100+++	95+++	70+++	90+++	100+++	100+++		6
30+	70+	50++	20+	50++	40++		7
5+	10+	30+	0	0	0		8
0	0	0	90+++	90++	90+		9
0	0	0	100+++	90+++	100+++		10

Tabelle 24: TMA Block Probe 1, SOX10 Färbung, gefärbt mit dem SOX10 Antikörper Klon SP267

G	H	I	J	K	L	Y	
0	0	0	0	0	0		1
90++	70+	80+	100+++	100+++	90++		2
100++	na	na	0	na	Na	negativ	3
na	100+++	100+++	na	0	0		4
95++	95++	90++	na	90++	70++		5
30+	50+	60++	80+++	60+++	80+++		6
100+++	100++	90++	90++	80++	na		7
80++	100++	na	90+++	100++	100++		8
na	na	100+++	0	0	0		9
na	0	na	80++	na	100+++		10

Tabelle 25: TMA Block Probe 2, SOX10 Färbung, gefärbt mit dem SOX10 Antikörper Klon SP267

M	N	O	P	Q	R	Z	
na	na	90++	100+++	100+++	100+++		1
0	0	0	80+	na	na		2
95++	90++	90++	100+++	na	na	negativ	3
na	na	na	na	100+++	100+++		4
90++	na	na	na	100+++	100+++		5
0	30+	30+	80++	80+	80++		6
100+++	100++	100+++	na	na	0		7
95+	95++	100++	100+++	na	100+++		8
30+	30+	20+	na	0	na		9
0	5+	0	90++	95++	60+		10

Tabelle 26: TMA Block Probe 3, SOX10 Färbung, gefärbt mit dem SOX10 Antikörper Klon SP267

			Tod		Gesamt
			nein	ja	
TC (22 C3, 28-8)	negativ	Anzahl	35	11	46
		% innerhalb von TC	76,1%	23,9%	100,0%
	positiv	Anzahl	9	4	13
		% innerhalb von TC	69,2%	30,8%	100,0%
Gesamt	Anzahl		44	15	59
	% innerhalb von TC		74,6%	25,4%	100,0%

Tabelle 27: Korrelation der PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran, gefärbt mit Klon 22C3 bzw. Klon 28-8 und dem Überleben der Patientinnen

			Spätere Metastasierung		
			ja	nein	
TC (22 C3, 28-8)	negativ	Anzahl	11	35	46
		% innerhalb von TC	23,9%	76,1%	100,0%
	positiv	Anzahl	3	10	13
		% innerhalb von TC	23,1%	76,9%	100,0%
Gesamt	Anzahl		14	45	59
	% innerhalb von TC		23,7%	76,3%	100,0%

Tabelle 28: Korrelation der PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran, gefärbt mit Klon 22C3 bzw. Klon 28-8 und der späteren Metastasierung der Patientinnen

			Rezidiv		Gesamt
			ja	nein	
TC (22 C3, 28-8)	negativ	Anzahl	6	40	46
		% innerhalb von TC	13,0%	87,0%	100,0%
	positiv	Anzahl	2	11	13
		% innerhalb von TC	15,4%	84,6%	100,0%
Gesamt	Anzahl		8	51	59
	% innerhalb von TC		13,6%	86,4%	100,0%

Tabelle 29: Korrelation der PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran, gefärbt mit Klon 22C3 bzw. Klon 28-8 und der Rezidivierung der Patientinnen

			Tumorstatus				Gesamt
			1	2	3	4	
TC (22 C3, 28-8)	negativ	Anzahl	23	19	2	2	46
		% innerhalb von TC	50,0%	41,3%	4,3%	4,3%	100,0%
	positiv	Anzahl	7	5	1	0	13
		% innerhalb von TC	53,8%	38,5%	7,7%	0,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl		30	24	3	2	59
	% innerhalb von TC		50,8%	40,7%	5,1%	3,4%	100,0%

Tabelle 30: Korrelation der PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran, gefärbt mit Klon 22C3 bzw. Klon 28-8 und dem Tumorstatus der Patientinnen

			Nodalstatus				Gesamt
			0	1	2	3	
TC (22 C3, 28-8)	negativ	Anzahl	32	9	3	2	46
		% innerhalb von TC	69,6%	19,6%	6,5%	4,3%	100,0%
	positiv	Anzahl	11	1	0	1	13
		% innerhalb von TC	84,6%	7,7%	0,0%	7,7%	100,0%
Gesamt	Anzahl	43	10	3	3	59	
	% innerhalb von TC	72,9%	16,9%	5,1%	5,1%	100,0%	

Tabelle 31: Korrelation der PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran, gefärbt mit Klon 22C3 bzw. Klon 28-8 und dem Nodalstatus der Patientinnen

			Grading			Gesamt
			1	2	3	
TC (22 C3, 28-8)	negativ	Anzahl	1	15	30	46
		% innerhalb von TC	2,2%	32,6%	65,2%	100,0%
	positiv	Anzahl	0	3	10	13
		% innerhalb von TC	0,0%	23,1%	76,9%	100,0%
Gesamt	Anzahl	1	18	40	59	
	% innerhalb von TC	1,7%	30,5%	67,8%	100,0%	

Tabelle 32: Korrelation der PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran, gefärbt mit Klon 22C3 bzw. Klon 28-8 und dem Grading

			HER2-Score			Gesamt
			0	1	2	
TC (22 C3, 28-8)	negativ	Anzahl	24	20	2	46
		% innerhalb von TC	52,2%	43,5%	4,3%	100,0%
	positiv	Anzahl	6	7	0	13
		% innerhalb von TC	46,2%	53,8%	0,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	30	27	2	59	
	% innerhalb von TC	50,8%	45,8%	3,4%	100,0%	

Tabelle 33: Korrelation der PD-L1 Expression an der Tumorzellmembran, gefärbt mit Klon 22C3 bzw. Klon 28-8 und dem Her2-neu-Score 0,1,2

			Tod		Gesamt
			nein	ja	
IC (SP 142)	negativ	Anzahl	27	8	35
		% innerhalb von IC	77,1%	22,9%	100,0%
	positiv	Anzahl	17	7	24
		% innerhalb von IC	70,8%	29,2%	100,0%
Gesamt	Anzahl	44	15	59	
	% innerhalb von IC	74,6%	25,4%	100,0%	

Tabelle 34: Korrelation der PD-L1 Expression an den Immunzellen, gefärbt mit Klon SP142 und dem Überleben der Patientinnen

			Spätere Metastasierung		Gesamt
			ja	nein	
IC (SP 142)	negativ	Anzahl	8	27	35
		% innerhalb von IC	22,9%	77,1%	100,0%
	positiv	Anzahl	6	18	24
		% innerhalb von IC	25,0%	75,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	14	45	59	
	% innerhalb von IC	23,7%	76,3%	100,0%	

Tabelle 35: Korrelation der PD-L1 Expression an den Immunzellen, gefärbt mit Klon SP142 und der späteren Metastasierung bei den Patientinnen

			Rezidiv		Gesamt
			ja	nein	
IC (SP 142)	negativ	Anzahl	5	30	35
		% innerhalb von IC	14,3%	85,7%	100,0%
	positiv	Anzahl	3	21	24
		% innerhalb von IC	12,5%	87,5%	100,0%
Gesamt	Anzahl	8	51	59	
	% innerhalb von IC	13,6%	86,4%	100,0%	

Tabelle 36: Korrelation der PD-L1 Expression an den Immunzellen, gefärbt mit Klon SP142 und der Rezidivierung der Patientinnen

			Tumorstatus				
			1	2	3	4	Gesamt
IC (SP 142)	negativ	Anzahl	17	16	1	1	35
		% innerhalb von IC	48,6%	45,7%	2,9%	2,9%	100,0%
	positiv	Anzahl	13	8	2	1	24
		% innerhalb von IC	54,2%	33,3%	8,3%	4,2%	100,0%
Gesamt	Anzahl	30	24	3	2	59	
	% innerhalb von IC	50,8%	40,7%	5,1%	3,4%	100,0%	

Tabelle 37: Korrelation der PD-L1 Expression an den Immunzellen, gefärbt mit Klon SP142 und dem Tumorstatus der Patientinnen

			Nodalstatus				
			0	1	2	3	Gesamt
IC (SP 142)	negativ	Anzahl	26	6	1	2	35
		% innerhalb von IC	74,3%	17,1%	2,9%	5,7%	100,0%
	positiv	Anzahl	17	4	2	1	24
		% innerhalb von IC	70,8%	16,7%	8,3%	4,2%	100,0%
Gesamt	Anzahl	43	10	3	3	59	
	% innerhalb von IC	72,9%	16,9%	5,1%	5,1%	100,0%	

Tabelle 38: Korrelation der PD-L1 Expression an den Immunzellen, gefärbt mit Klon SP142 und dem Nodalstatus der Patientinnen

			Grading			
			1	2	3	Gesamt
IC (SP 142)	negativ	Anzahl	1	12	22	35
		% innerhalb von IC	2,9%	34,3%	62,9%	100,0%
	positiv	Anzahl	0	6	18	24
		% innerhalb von IC	0,0%	25,0%	75,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	1	18	40	59	
	% innerhalb von IC	1,7%	30,5%	67,8%	100,0%	

Tabelle 39: Korrelation der PD-L1 Expression an den Immunzellen, gefärbt mit Klon SP142 und dem Grading

			HER2-Score			
			0	1	2	Gesamt
IC (SP 142)	negativ	Anzahl	15	18	2	35
		% innerhalb von IC	42,9%	51,4%	5,7%	100,0%
	positiv	Anzahl	15	9	0	24
		% innerhalb von IC	62,5%	37,5%	0,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	30	27	2	59	
	% innerhalb von IC	50,8%	45,8%	3,4%	100,0%	

Tabelle 40: Korrelation der PD-L1 Expression an den Immunzellen, gefärbt mit Klon SP142 und dem Her2(neu) Score 0,1,2

		Tod		Gesamt	
		0	1		
SOX10	0	Anzahl	11	3	14
		% innerhalb von SOX10	78,6%	21,4%	100,0%
	>0 bis <50	Anzahl	3	2	5
		% innerhalb von SOX10	60,0%	40,0%	100,0%
	50 bis <100	Anzahl	21	5	26
		% innerhalb von SOX10	80,8%	19,2%	100,0%
	100	Anzahl	9	5	14
		% innerhalb von SOX10	64,3%	35,7%	100,0%
	Gesamt	Anzahl	44	15	59
		% innerhalb von SOX10	74,6%	25,4%	100,0%

Tabelle 41: Korrelation der SOX10 Expression, gefärbt mit Klon SP267 und dem Überleben der Patientinnen

			Spätere Metastasierung		Gesamt
			ja	nein	
SOX10	0	Anzahl	3	11	14
		% innerhalb von SOX10	21,4%	78,6%	100,0%
	>0 bis <50	Anzahl	0	5	5
		% innerhalb von SOX10	0,0%	100,0%	100,0%
	50 bis <100	Anzahl	5	21	26
		% innerhalb von SOX10	19,2%	80,8%	100,0%
	100	Anzahl	6	8	14
		% innerhalb von SOX10	42,9%	57,1%	100,0%
	Gesamt	Anzahl	14	45	59
		% innerhalb von SOX10	23,7%	76,3%	100,0%

Tabelle 42: Korrelation der SOX10 Expression gefärbt mit Klon SP267 und späterer Metastasierung

		Rezidiv		Gesamt	
		ja	nein		
SOX10	0	Anzahl	2	12	14
		% innerhalb von SOX10	14,3%	85,7%	100,0%
	>0 bis <50	Anzahl	0	5	5
		% innerhalb von SOX10	0,0%	100,0%	100,0%
	50 bis <100	Anzahl	5	21	26
		% innerhalb von SOX10	19,2%	80,8%	100,0%
	100	Anzahl	1	13	14
		% innerhalb von SOX10	7,1%	92,9%	100,0%
Gesamt	Anzahl	8	51	59	
	% innerhalb von SOX10	13,6%	86,4%	100,0%	

Tabelle 43: Korrelation der SOX10 Expression gefärbt mit Klon SP267 und der Rezidivierung

		Tumorstatus					
		1	2	3	4	Gesamt	
SOX10	0	Anzahl	6	6	2	0	14
		% innerhalb von SOX10	42,9%	42,9%	14,3%	0,0%	100,0%
	>0 bis <50	Anzahl	2	2	1	0	5
		% innerhalb von SOX10	40,0%	40,0%	20,0%	0,0%	100,0%
	50 bis <100	Anzahl	15	10	0	1	26
		% innerhalb von SOX10	57,7%	38,5%	0,0%	3,8%	100,0%
	100	Anzahl	7	6	0	1	14
		% innerhalb von SOX10	50,0%	42,9%	0,0%	7,1%	100,0%
Gesamt		Anzahl	30	24	3	2	59
		% innerhalb von SOX10	50,8%	40,7%	5,1%	3,4%	100,0%

Tabelle 44: Korrelation der SOX10 Expression, gefärbt mit Klon SP267 und dem Tumorstadium der Patientinnen

			Nodalstatus				Gesamt
			0	1	2	3	
SOX10	0	Anzahl	7	5	1	1	14
		% innerhalb von SOX10	50,0%	35,7%	7,1%	7,1%	100,0%
	>0 bis <50	Anzahl	4	1	0	0	5
		% innerhalb von SOX10	80,0%	20,0%	0,0%	0,0%	100,0%
	50 bis <100	Anzahl	21	3	1	1	26
		% innerhalb von SOX10	80,8%	11,5%	3,8%	3,8%	100,0%
	100	Anzahl	11	1	1	1	14
		% innerhalb von SOX10	78,6%	7,1%	7,1%	7,1%	100,0%
	Gesamt	Anzahl	43	10	3	3	59
		% innerhalb von SOX10	72,9%	16,9%	5,1%	5,1%	100,0%

Tabelle 45: Korrelation der SOX10 Expression, gefärbt mit Klon SP267 und dem Nodalstatus der Patientinnen

			Grading			
			1	2	3	Gesamt
SOX10	0	Anzahl	0	4	10	14
		% innerhalb von SOX10	0,0%	28,6%	71,4%	100,0%
	>0 bis <50	Anzahl	0	1	4	5
		% innerhalb von SOX10	0,0%	20,0%	80,0%	100,0%
	50 bis <100	Anzahl	1	9	16	26
		% innerhalb von SOX10	3,8%	34,6%	61,5%	100,0%
	100	Anzahl	0	4	10	14
		% innerhalb von SOX10	0,0%	28,6%	71,4%	100,0%
	Gesamt	Anzahl	1	18	40	59
		% innerhalb von SOX10	1,7%	30,5%	67,8%	100,0%

Tabelle 46: Korrelation der SOX10 Expression, gefärbt mit Klon SP267 und dem Grading

			HER2-Score			Gesamt
			0	1	2	
SOX10	0	Anzahl	6	8	0	14
		% innerhalb von SOX10	42,9%	57,1%	0,0%	100,0%
	>0 bis <50	Anzahl	4	1	0	5
		% innerhalb von SOX10	80,0%	20,0%	0,0%	100,0%
	50 bis <100	Anzahl	12	13	1	26
		% innerhalb von SOX10	46,2%	50,0%	3,8%	100,0%
	100	Anzahl	8	5	1	14
		% innerhalb von SOX10	57,1%	35,7%	7,1%	100,0%
	Gesamt	Anzahl	30	27	2	59
		% innerhalb von SOX10	50,8%	45,8%	3,4%	100,0%

Tabelle 47: Korrelation der SOX10 Expression, gefärbt mit Klon SP267 und dem Her2(neu) Status (Score 0,1,2)

10. Lebenslauf

“Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.”